

Code No. 317-05641

Poly(A)⁺ Isolation Kit
from Total RNA

MANUAL (Ver.1)

NIPPON GENE Co.,LTD.

目次

1. 製品説明	1
2. キット内容	1
3. 保存方法	2
4. Total RNA の調製	2
5. 実験プロトコール	
実験前の準備	2
Total RNA 溶液の調製	2
Total RNA 量と反応液組成	3
操作	3
6. Ethachinmate について	5
7. 実験例	
①RT PCR による Utrophin mRNA の検出	6
②ノーザンハイブリダイゼーションによる Utrophin mRNA の検出	6
8. トラブルシューティング	7
9. 関連製品	7

1. 製品説明

Poly(A)⁺ Isolation Kit form Total RNA は Total RNA から Poly(A)⁺ RNA を抽出するためのキットです。ISOGEN や ISOGEN-LS によって得られた Total RNA から Poly(A)⁺ RNA を抽出するのに最適です。

細胞や組織の種類によって異なりますが、一般的に Poly(A)⁺ RNA は Total RNA 中に 1～5%含まれています。そこで、よりコピー数の少ない mRNA を解析する場合、Poly(A)⁺ RNA を濃縮する必要があります。本キットでは、Poly(A)⁺ RNA と反応性の高い OligotexTM-dT30 <Super> を用いることによって Poly(A)⁺ RNA を効率よくキャッチし、その後スピнкаラムを用いて迅速に洗浄・溶出操作を行うことによって、効率よく短時間で高純度の Poly(A)⁺ RNA を得ることができます。

また、本キットには Ethachinmate も添付されており、得られた Poly(A)⁺ RNA の濃縮が必要な際には大変便利です。

2. キット内容

・Solution Set		1セット
Oligotex TM -dT30 <Super>	300 μl	
2 × Binding buffer	5ml	
Wash buffer	20ml	
DEPC treated Water	10ml	
Ethachinmate	60 μl	
3M Sodium Acetate	300 μl	
・スピнкаラムセット		20セット
・スピнкаラム用遠心チューブ		40個

<OligotexTM-dT30 <Super> について>

・長期間保存しておくと、OligotexTM-dT30 <Super>の粒子が沈殿します。ご使用になる前に必ず懸濁し、均一にしてください。

3. 保存方法

2～8℃保存。

注意 : Oligotex™-dT30 <Super> は絶対に凍結させないで下さい。

4. Total RNA の調製

本キットは Total RNA からの Poly(A)⁺ RNA 精製キットです。Total RNA は ISOGEN または ISOGEN-LS での調製をお勧めします。Total RNA の調製は ISOGEN または ISOGEN-LS に付属のマニュアルを参照して下さい。

5. 実験プロトコール

<実験前の準備>

- Oligotex™-dT30 <Super> を 37℃に保温して下さい。
- 2 × Binding buffer に析出がみられる場合は、37℃に保温し完全に溶かして下さい。
- ブロックヒーターなどを 70℃に設定して下さい。
- 溶出するときに使用する DEPC 処理水を 70℃に保温して下さい。

<Total RNA 溶液の調製>

Total RNA 溶液は、以下の容量になるように DEPC 処理水を用いて調製して下さい。
(この時使用するチューブは、本キット以外に別途準備して下さい。)

Total RNA ~250 μg^(注) 200 μl

(注)一度の精製に使用する Total RNA は 250 μg 以下にして下さい。

<Total RNA 量と反応液組成>

以下の表に従って反応液を調製して下さい。

	Total RNA	2 × Binding buffer	Oligotex™-dT30
Total RNA 100 μg 以下	200 μl	200 μl	10 μl
Total RNA 100~250 μg	200 μl	200 μl	15 μl

<操作>



① 前述の反応液をチューブに入れ^(注1)、ブロックヒーターなどを使用し、70°Cで5分間加熱する。(RNAの変性)

② 加熱後、室温で10分間放置。

(Oligotex™-dT30 <Super>と Poly(A)⁺RNA のハイブリダイゼーション)



③ 12K × g で5分間遠心し、上清を除去^(注2)。



④ 沈殿に Wash buffer 350 μl を加えて懸濁する^(注3)。



⑤ 懸濁した Oligotex™-dT30 <Super> - Poly(A)⁺RNA 複合体をスピニングカラムのフィルターカップに入れる。

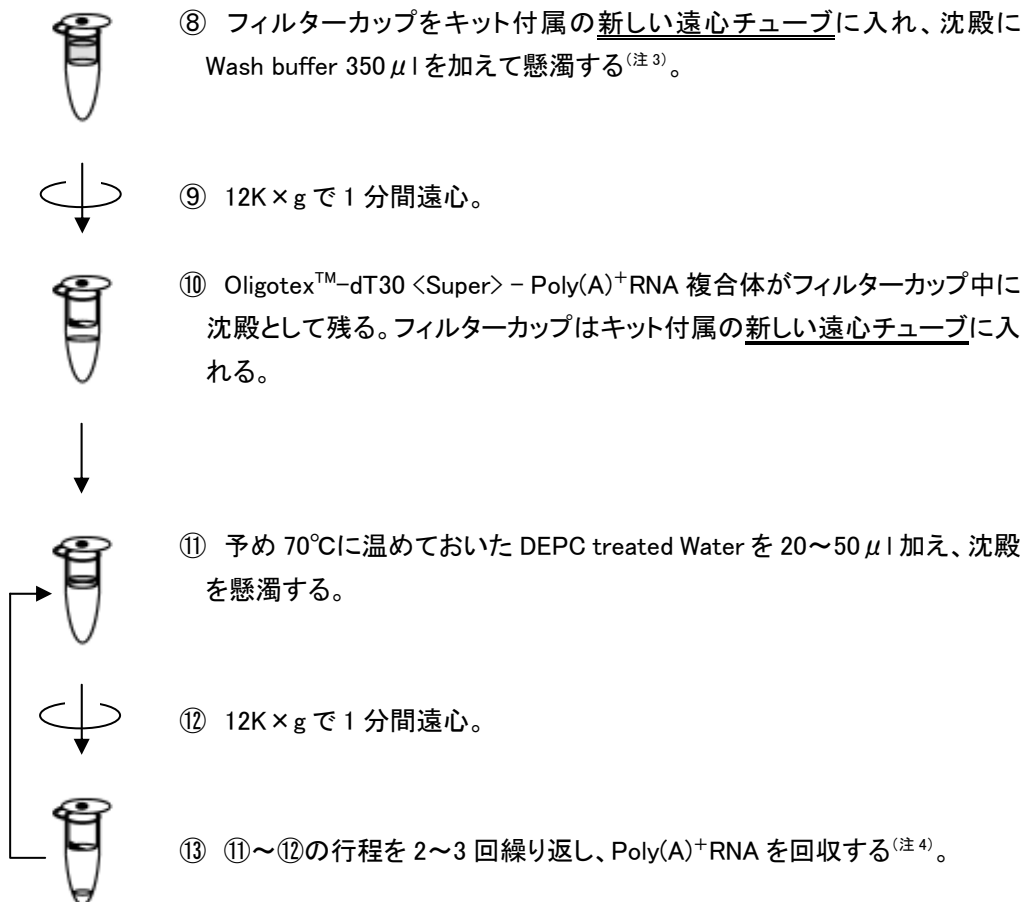


⑥ 12K × g で1分間遠心。



⑦ Oligotex™-dT30 <Super> - Poly(A)⁺RNA 複合体がフィルターカップ中に沈殿として残る。



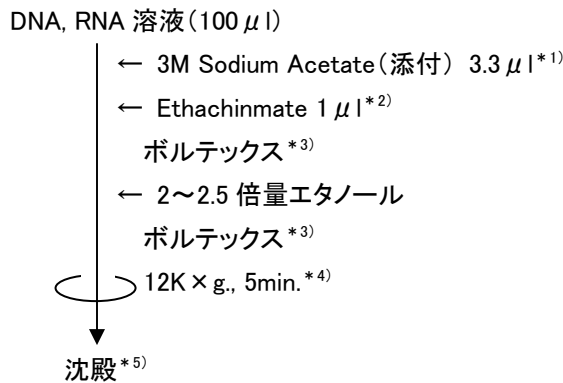


- (注1) この時使用するチューブは、本キット以外に別途準備したチューブを使用する。
- (注2) Poly(A)⁺RNA が得られるまで、この時点での上清を保存しておくことよい。
- (注3) OligotexTM-dT30 <Super>の固まりが完全に無くなるまで、完全に懸濁する。
- (注4) 溶出を繰り返し行うことで、Poly(A)⁺RNA の回収量は多くなるが、濃度は薄くなる。この時、使用目的に応じて本キット付属の Ethachinmate を用いてエタノール沈殿を行い、Poly(A)⁺RNA を効率よく濃縮することができる。Ethachinmate を用いることで、-80°Cでのインキュベートが不要になり、沈殿を目で確認できる。また、エタノール沈殿での Poly(A)⁺RNA 回収率を上げることができる。

6. Ethachinmate について

Ethachinmate は核酸をエタノール沈殿またはイソプロパノール沈殿する際に使用するアクリルアミド系の高分子キャリアーです。塩の存在下 (例えば $>0.1\text{M}$ Sodium Acetate) で Ethachinmate を用いることによって、以下のような効果を得ることができます。

- ① 微量核酸の回収が可能。
20ng/ml 以上の DNA および RNA が通常のエタノール沈殿よりも効率よく回収できる。
- ② 迅速なアルコール沈殿が可能。
 -20°C あるいは -80°C のインキュベーションが不要となるので、アルコール添加後、直ちに遠心することができる。
- ③ 酵素反応を阻害しない。
回収した核酸は水やバッファーに容易に溶解する。しかも、混在する Ethachinmate は酵素反応を全く阻害しない。
- ④ 沈殿を目で確認できる。
Ethachinmate 自身がアルコール沈殿によって沈殿を形成するので、微量な核酸の場合でも大切な試料を洗い流してしまう心配がない。



- * 1) 塩濃度は終濃度 0.1M 以上とする。
- * 2) 通常、試料 100 μl あたり 1 μl 加える。100 μl 以下の場合は 1 μl 、300 μl 以上の場合は 3 μl を加える。
- * 3) 必ずボルテックス等で混合する。この操作によって微量核酸が効率よく回収できるようになる。
- * 4) 必ずしも冷却の必要はない。
- * 5) 溶解後はそのまま各種酵素の基質として使用できる。必要に応じて 70%エタノール等で洗浄する。

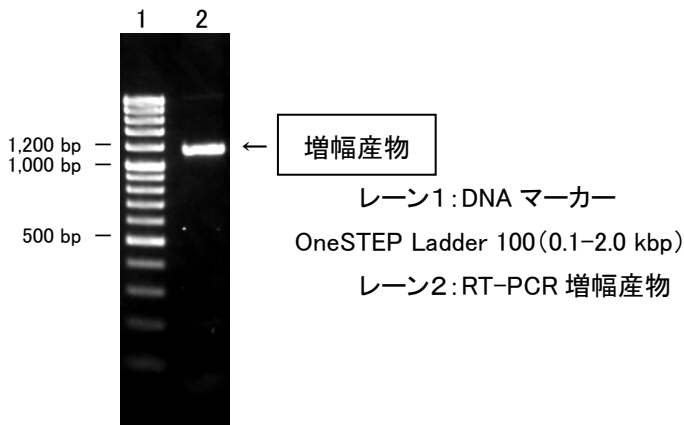
7. 実験例

マウスの脳 5 匹分より ISOGEN を用いて Total RNA を 3.75mg 抽出し、その内の 150 μ g から Poly(A)⁺ Isolation Kit from Total RNA を用いて Poly(A)⁺ RNA を 5.2 μ g 抽出した。操作は全て本マニュアルの実験プロトコールに従った。RNA 収量は 260nm の O.D. 値より算出した。

ここで得られた Poly(A)⁺ RNA を用いて Utrophin mRNA (約 11kb) の検出を行った。

① RT-PCR による Utrophin mRNA の検出

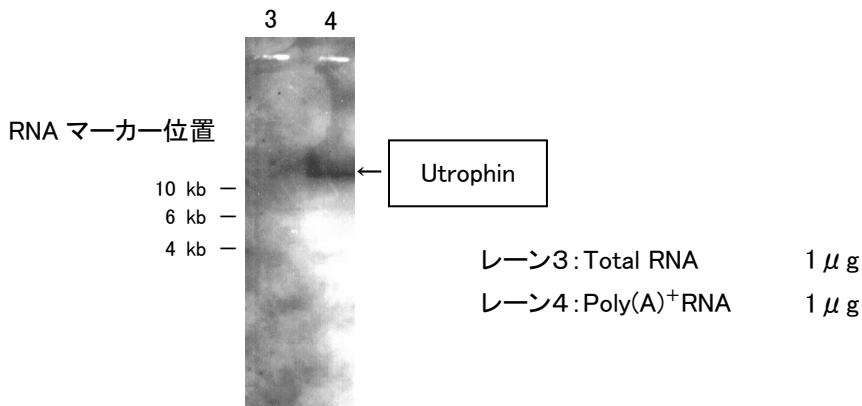
2step RT-PCR によって、Utrophin mRNA の 5' 末端側 (1153base) を増幅した。



RT-PCR によって、目的とするサイズの増幅産物が得られた。

② ノーザンハイブリダイゼーションによる Utrophin mRNA の検出

Utrophin mRNA の 5' 末端側に特異的な RNA プローブを用いて、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。



本品によって Poly(A)⁺ RNA が精製・濃縮され、所定の位置に Utrophin mRNA が検出された。

8. トラブルシューティング

現象	考えられる原因	対策
カラムが詰まる。	Total RNA の量が多すぎる。	使用する Total RNA は 250 μ g までにする。
	Total RNA に夾雑物が多量に含まれている。	Total RNA の精製には ISOGEN または ISOGEN-LS を使用する。
Poly(A) ⁺ RNA の回収率が悪い。	溶出時の液量が少なすぎる。	溶出の液量を増やすか、回数を増やす。
	溶出時に使用する DEPC 処理水の温度が低い。	DEPC 処理水は 70°C のものを使用し、温度の低下したものは使用しない。
	溶出時の Oligotex TM -dT30 の懸濁が不十分。	Oligotex TM -dT30 を完全に懸濁してから遠心溶出を行う。
	エタノール沈殿の時にロスをした。	Ethachinmate を使用してエタノール沈殿を行う。
Poly(A) ⁺ RNA が分解している。	RNase がコンタミした。	RNase のコンタミを防ぐため使用する器具は RNA 専用のものを使用する。
rRNA が混入する。	洗浄操作が不十分。	洗浄の際、Oligotex TM -dT30 の懸濁を完全に行う。
	若干の混入は避けられませんが。	さらに精製が必要な場合は、もう一度精製操作を行う。

9. 関連製品

ISOGEN Poly(A) ⁺ Isolation Pack	314-05651	20 回用	50,000
ISOGEN-LS Poly(A) ⁺ Isolation Pack	311-05661	20 回用	54,000
ISOGEN	317-02503	50ml	19,000
	311-02501	100ml	28,000
ISOGEN-LS	311-02621	100ml	32,000
Ethachinmate	312-01791	0.2ml	15,000
DEPC treated Water	314-90205	500ml	9,000
Deoxyribonuclease (RT Grade)	313-03161	1,000units	11,000
SP6 RNA Synthesis Set	313-02441	50 回分	50,000
T3 RNA Synthesis Set	310-02451	50 回分	45,000
T7 RNA Synthesis Set	317-02461	50 回分	40,000

株式会社ニッポンジーン

〒930-0834 富山市問屋町 1-29

TEL 076-451-6548

FAX 076-451-6547

URL <http://www.nippongene.jp/>

E-mail info@nippongene.jp