

ISOGEN

ISOGEN - LS

ISOGEN, ISOGEN-LS 簡易マニュアル (第2版) 1608-1807

I 製品説明

RNA 抽出用試薬 ISOGEN

ISOGEN (アイソジェン) は、ヒト、動物、植物および細菌からの RNA 抽出用試薬です。液相分離による方法を用いており、同一試料から DNA およびタンパク質も単離することが可能です。一連の操作で RNA、DNA、タンパク質を単離できるので、貴重な試料の分析に有効で、また、操作が簡単なので試料数が多い場合にも便利です。

<対象試料： 組織、細胞、植物、細菌>

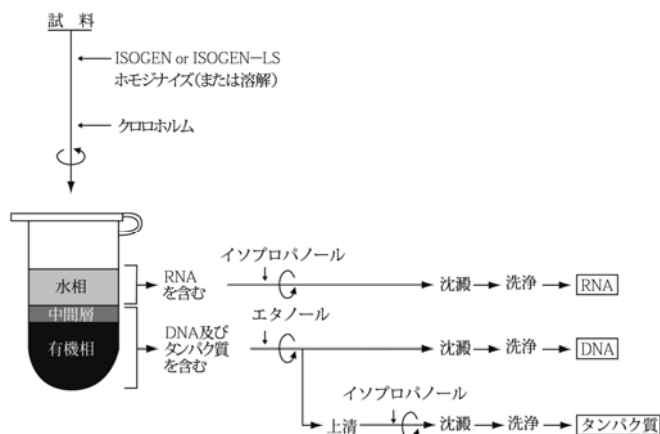
液体試料からの RNA 抽出用試薬 ISOGEN-LS

ISOGEN-LS (アイソジェン-エルエス) は、血液や血清のような、容量が大きく (>100 μl : 1.5 ml プラスチックチューブで処理する場合) 濃縮が面倒な液体試料からの RNA 抽出用試薬で、ISOGEN を液体試料用に改良したものです。

<対象試料： 全血、液体試料>

原理

本品は、フェノールとチオシアン酸 Guanidinium を含む均一な液体で、試料に ISOGEN または ISOGEN-LS を加えて溶解またはホモジナイズした後、クロロホルムを加えて遠心分離すると、ホモジネートは水相、中間相、有機相の3相に分離します。水相には RNA のみが存在し、DNA およびタンパク質は中間相以下に存在します。従って、まず水相を採取してイソプロパノールを加えて RNA を沈殿させ、残った中間相と有機相にエタノールを加えて DNA を、さらにイソプロパノールを加えてタンパク質を沈殿させることにより、RNA、DNA およびタンパク質を順次単離することができます。



II 製品内容

ISOGEN (Code No. 315-02504, 317-02503, 311-02501, 319-90211)

- ・ ISOGEN (10 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml) 1本
- ・ 簡易マニュアル 1部

ISOGEN-LS (Code No. 317-02623, 311-02621)

- ・ ISOGEN-LS (10 ml, 100 ml) 1本
- ・ 簡易マニュアル 1部

III 保存

冷蔵保存 (2~10℃)

- ・ 本品は、開封後なるべく早く(お買い求めになった日から6か月以内)にご使用ください。
- ・ 本品に変色性が認められた場合にはご使用にならないでください。
- ・ 弊社では本品を室温で送付しておりますが、製品到着後ただちに2~10℃で保存していただくことにより、問題なくご使用いただけます。

IV 使用上の注意

- ・ 本品は試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。また、試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱いしないでください。
- ・ ISOGEN 及び ISOGEN-LS は医薬用外劇物 (フェノール製剤) ですので、お取り扱いにはご注意ください。
- ・ ご使用の際には適切な保護具 (手袋、眼鏡等) を着用してください。
- ・ もし目に入ったり皮膚に付着した場合は、大量の水で少なくとも 15 分間は洗い流し、医師の診察を受けてください。
- ・ 本品のお取り扱い、マニュアル記載内容通りに行なってください。
- ・ マニュアル記載内容と異なったお取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。
- ・ 安全性データシート (SDS) につきましては弊社 WEB ページ (www.nippongene.com) にてご覧になれます。

V 関連製品

Code No.	製品名	包装単位
315-02504	ISOGEN	10 ml
317-02503	ISOGEN	50 ml
311-02501	ISOGEN	100 ml
319-90211	ISOGEN	200 ml
317-02623	ISOGEN-LS	10 ml
311-02621	ISOGEN-LS	100 ml
317-07363	ISOGEN II	10 ml
311-07361	ISOGEN II	100 ml
314-07513	ISOGEN with Spin Column	10 回用
318-07511	ISOGEN with Spin Column	50 回用
315-06421	ISOGEN PB Kit	20 回分
318-01793	Ethachinmate	0.02 ml
312-01791	Ethachinmate	0.2 ml
313-06341	High-Salt Precipitation Solution	50 ml

・ 記載内容や製品仕様に関しては予告なしに変更する場合があります。

VI 参考文献

- 1) Chomczynski, P. and Sacchi, N., *Anal. Biochem.*, 162, 156-159 (1987)
- 2) Chomczynski, P., *BioTechniques*, 15, 532-535 (1993)
- 3) Chomczynski, P., Bowser-Finn, R. and Sabatini, M. L., *THE JOURNAL OF NIH RESEARCH*, 6, 83 (1994)
- 4) Chomczynski, P. and Mackey, K., *BioTechniques*, 19, 942-945 (1995)
- 5) Mackey, K. and Chomczynski, P., *THE JOURNAL OF NIH RESEARCH*, 8, 72 (1996)
- 6) Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K., *Molecular Biology*, vol.2, A.1.5, (1990)
- 7) Wilfinger, W., Mackey, K. and Chomczynski, P., *BioTechniques*, 22, 474-481 (1997)
- 8) Varela, L. and Margot, Ip., *Endocrinology*, 137 (11), 4915-4924 (1996)

プロトコルやデータ集などの詳細については
ニッポンジーンの WEB ページをご覧ください。

株式会社ニッポンジーン

遺伝子工学研究用試薬

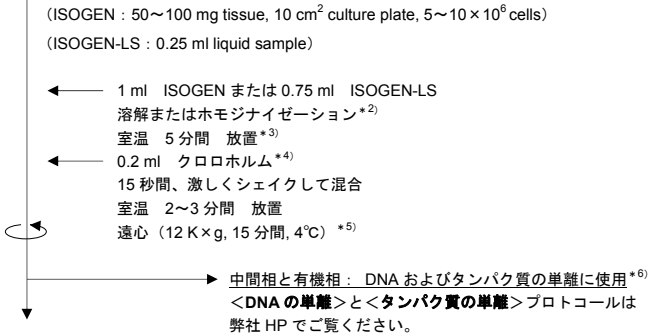
<https://www.nippongene.com/siyaku/>

Ⅶ プロトコール <RNAの単離>

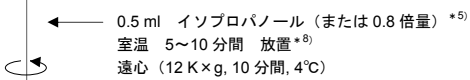
ISOGEN または ISOGEN-LS を用いて RNA を単離すると、約 1 時間で無傷の RNA を高収率で単離することができます。得られた RNA は、DNA やタンパク質の混入がほとんどなく、そのままノーザン分析、ドットプロットハイブリダイゼーション等に用いることができます。

- 以下の操作は RNase のコンタミを防ぐとともに安全のために手袋を着用し、清潔な環境で行ってください。
- 本品以外にクロロホルム、イソプロパノール及びエタノールを用意してください。
- チューブは透明なポリプロピレン製を用いることができます。

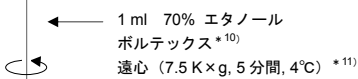
サンプル^{*1)}



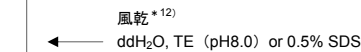
水相^{*7)}



沈殿^{*9)}



沈殿



Total RNA 溶液^{*7) *13)}

*1) 1.5 ml プラスチックチューブを用いて処理する場合、組織や培養細胞等、試料の体積が 100 µl 以下のものには ISOGEN、血液等、試料の体積が大きい (100 µl を越える) ものには ISOGEN-LS が有効である。試料の体積が大きくても、濃縮により 100 µl 以下にできる場合には ISOGEN を使用することができる。

培養細胞の場合、培地等の水分は可能な限り除去する。

液体試料から ISOGEN-LS を用いて抽出する場合、試料の容量が 0.25 ml 以下の時には、水を加えて 0.25 ml にする。ISOGEN-LS と試料の容量比が常に 3 : 1 になるようにする。血液や血清のように多くの成分が含まれる液体試料は、水で 2 倍に希釈してから ISOGEN-LS を加える。ヘパリンが逆転写酵素活性を阻害するため、ヘパリン採血した試料より抽出した total RNA を、RT-PCR や PCR に用いるとうまくいかないことがある。EDTA 採血した試料由来の場合は逆転写酵素活性を阻害しない。

*2) 組織の場合は、ガラス・テフロンあるいはポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイゼーションする。

培養皿に付着して増殖した細胞の場合には、10 cm² 当たり 1 ml の ISOGEN を直接加えてピペットで吸出して溶解する。

細胞懸濁液の場合には遠心して沈殿させた後、5~10 × 10⁶ cells 当たり 1 ml の ISOGEN を加えて同様にピペットで吸出して溶解する。

筋、脂肪細胞、植物のようにタンパク質、脂質、糖等を多く含む試料の場合は、ホモジナイゼーション後に一度遠心 (12 K × g, 10 分間, 4°C) して、上清を以下の操作に用いる。この時、脂肪は最上層に位置することに注意する。

*3) この状態で -70°C で少なくとも 1 ヶ月は保存できる。

*4) イソアミルアルコールの添加されたクロロホルムは使用できない。

*5) ホモジネートは、遠心分離により下層の有機相、中間層及び上層の水相に分かれる。RNA は水相に含まれるが、この水相には DNA やタンパク質はほとんど含まれない。この時の水相の体積は、加えた ISOGEN の体積の約 60% である。

もし 60% より少ない場合には、この後の操作で添加するイソプロパノール量は分取した水相の体積に対して 0.8 倍容を添加する。30% 以下の場合、組織量を減らすなどして、再度抽出し直すことを推奨する。

*6) ここで得られた中間相と有機相から DNA 及びタンパク質を単離する場合、4°C にて保存する。ただし、中間相や有機相中に多量の不溶物 (カス状、繊維状のもの等) がある場合、DNA 及びタンパク質の単離には適さない。

*7) RNA の回収率や純度を上げる必要がある場合は、有機相や中間相ができるだけ混入しないように、水相を新しいチューブに移して以下の操作を行う。

・ゲノム DNA のコンタミが予想される場合には新しいチューブに移した水相に等量のクロロホルムを加え、再抽出を行う。

・ポリサッカライド、プロテオグリカン、グリコーゲン等の来雑物が含まれることが予想される場合、あるいは最終的に得られた RNA に含まれていることが確認された場合には、High-Salt Precipitation Solution (Code No. 313-06341) とイソプロパノールをそれぞれ水相の 1/2 容量加えてイソプロパノール沈殿を行い、遠心 (10 K × g, 15 分間) して RNA のみを沈殿させると効果的である。この後 70% エタノールによる洗浄を行う。

・RNA 量が 10 µg 以下の場合、ホモジナイゼーション後に 3 µl の Ethachinmate (Code No. 312-01791) を加えるか、水相に Ethachinmate を加えることにより、RNA の収率を上げることができる。

*8) この状態で、通常 RNA の沈殿は見えない。

*9) RNA の沈殿は、ゲル様のペレットとしてチューブの内壁と底に付着する。

*10) この状態で、4°C で少なくとも 1 週間、-20°C であれば 1 年間は保存することができる。

*11) もし RNA の沈殿がチューブの内壁から流れ出しそうな状態の場合は、エタノール洗浄後の遠心は 12 K × g にて行う。

*12) RNA の沈殿は、風乾または 5~10 分間真空乾燥する。真空遠心機を用いて乾燥してはいけな。沈殿を完全に乾燥してしまうと溶解性が著しく減少する。溶解性が減少した RNA の OD₂₆₀/OD₂₈₀ は、1.6 以下なので目安となる。

得られた RNA は、滅菌蒸留水、TE (pH8.0) または 0.5% SDS にピペットチップで吸出して溶解し、55~60°C にて 10~15 分間保温するとよい。溶解する蒸留水、0.5% SDS は、予めジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理によって RNase フリーにしておくか、RNase フリーグレードの市販品を用いること。また、TE (pH8.0) を使用する場合は、RNase フリーグレードの市販品を用いること (TE に含まれる Tris-HCl は、DEPC 処理にて分解してしまう為)。

*13) 得られた RNA をアガロースゲル電気泳動すると、主に約 2 kb と 5 kb のリボソーム RNA のバンドの他に 0.1~0.3 kb の低分子 RNA と、7~15 kb の高分子 RNA を観察することができる。得られた RNA の OD₂₆₀/OD₂₈₀ は、1.6~1.8 である。OD₂₆₀/OD₂₈₀ を測定する際は、pH7.5~8.0 の水もしくは buffer に希釈して測定する。

RNA の収量の目安は次の通りである。

試料		収量
組織	肝臓	6~10 µg RNA/mg tissue
	脾臓	6~10 µg RNA/mg tissue
	腎臓	3~4 µg RNA/mg tissue
	骨格筋	1~1.5 µg RNA/mg tissue
	脳	1~1.5 µg RNA/mg tissue
	胎盤	1~4 µg RNA/mg tissue
植物	ラット下垂体 または ヒト肝針生検材料 (微量試料)	4~8 µg RNA/1~5 mg tissue
	シロイヌナズナ または タバコ	150~200 µg RNA/0.5~1 g fresh weight tissue
培養細胞	上皮細胞	8~15 µg RNA/10 ⁶ cells
細胞	線維芽細胞	5~7 µg RNA/10 ⁶ cells
血液	ヒトまたは動物	7~15 µg RNA/ml blood

Ⅷ トラブルシューティング

トラブル	対策
低収量	ISOGEN または ISOGEN-LS 添加後の溶解 (またはホモジナイゼーション) を十分に行う。
	得られた RNA 沈殿を十分溶解する。
A ₂₆₀ /A ₂₈₀ < 1.65	試料に加える ISOGEN または ISOGEN-LS 量を増やす。この場合、後の操作は加えた ISOGEN または ISOGEN-LS 量に比例して増やす。
	ISOGEN または ISOGEN-LS による溶解 (またはホモジナイゼーション) 後、室温で 5 分置かず、直ちにクロロホルムを加える。
	水相を採取する際、中間相やフェノール相を混入させない。
	得られた RNA 沈殿を十分溶解する。
RNA の分解	試料にクロロホルムを加える前に 12 K × g で 5 分間遠心し、沈殿物を除去した後にクロロホルムを加える。
	吸光度を測定する際、pH7.5~8.0 の水もしくは buffer に希釈して測定することにより、再現性のある値が得られる。
	新鮮な試料を用いる。
DNA のコンタミ	細胞の場合、トリブシン消化により十分分散させる。
	用いる溶液や容器は、RNase フリーのものを使用する。
	アガロースゲル電気泳動の際、用いるホルムアルデヒドの pH が、中性であることを確認する (pH3.5 以下だと分解が起こる)。
DNA のコンタミ	試料に加える ISOGEN または ISOGEN-LS 量を増やす。この場合、後の操作は加えた ISOGEN または ISOGEN-LS 量に比例して増やす。
	溶液 (~100 µl) に ISOGEN 1 ml または ISOGEN-LS 0.75 ml を加え、再度処理を行う。
	エタノールや DMSO 等の有機溶媒、強緩衝液、アルカリ性溶液を含む試料を用いない。