

RNA 抽出用試薬

ISOGEN with Spin Column

マニュアル（第6版）

Code No. 318-07511

NIPPON GENE CO., LTD.

目 次

I	製品説明	2
II	製品内容	2
III	保存	2
IV	使用上の注意	3
V	プロトコール	3
	<本キット以外に必要な試薬、機器など>	3
	<必要に応じて用意する試薬、機器など>	3
	<操作手順>	4
	<簡易操作フロー>	7
VI	トラブルシューティング	9
VII	データ	10

I 製品説明

ISOGEN with Spin Column（アイソジェン スピんカラム付き）は、total RNA 抽出用試薬の ISOGEN とシリカゲル膜内封スピんカラムを組み合わせた製品です。 ISOGEN で試料の溶解と液相分離による RNA の抽出までを行い、夾雑物の除去のため、カオトロピックイオン存在下で核酸がシリカに吸着する原理（Boom technology）を採用した自社設計のスピんカラムを用いることで、より高純度の total RNA を約 1 時間で抽出することができます。

■ 特長

- ・ total RNA を高純度に抽出可能。
- ・ アルコール沈殿不要。
- ・ 夾雑物の多い植物からも高純度に total RNA の抽出が可能。

II 製品内容

製品	(50 回用)	保存温度	備考
ISOGEN	50 ml	冷蔵・遮光	
IsoWash I	30 ml	室温	
IsoWash II	30 ml	室温	
TE (pH8.0)	5 ml	室温	
Spin Column	50 本	室温	

III 保存

輸送・保管温度： 室温（到着後、ISOGEN は冷蔵保存）

- ・ 本品は室温で送付しております。製品到着後、ISOGEN は 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下さい。
- ・ ISOGEN は医薬用外劇物（フェノール製剤）ですので、取り扱いにはご注意下さい。
- ・ ご使用の際には適切な保護具（手袋、眼鏡等）を着用して下さい。
- ・ 蒸気を吸入しないようにし、換気を十分に行って下さい。
- ・ 目に入ったり皮膚に付着したりした場合は、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下さい。
- ・ 本品の取扱いは、マニュアル記載内容通りに行ってください。
- ・ マニュアル記載内容と異なった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。
- ・ 安全データシート（SDS）は、ニッポンジーン WEB サイト（www.nippongene.com）よりご覧になれます。

V プロトコール

<本キット以外に必要な試薬、機器など>

- ・ 試料（新鮮組織、凍結組織、培養細胞、植物など）
- ・ クロロホルム
- ・ 70%エタノール
- ・ イソプロパノール
- ・ マイクロピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ 1.5 ml マイクロチューブ
- ・ 遠心分離機（4℃）

<必要に応じて用意する試薬、機器など>

- ・ RNase フリー水
- ・ 液体窒素
- ・ ポリトロンホモジナイザーまたはガラステフロンホモジナイザー
- ・ ウォーターバス（50℃）

ISOGEN で試料を溶解するときのチューブは、透明なポリプロピレン製をお勧めします。使用前に、遠心分離の強度（12K×g）と ISOGEN（フェノール）およびクロロホルムに対する耐性があるか確認して下さい。

<操作手順>

1. 試料（組織の場合、25～100 mg）に ISOGEN 1 ml を添加し、細胞を溶解する。

注）RNA の純度と収量を維持するため、組織の抽出を素早くすることと効果的にホモジナイズすることが重要である。

- ・ 抽出した組織は ISOGEN 中ですぐにホモジナイズするか、速やかに液体窒素中で凍結させる。
- ・ ホモジナイズ方法は、ハイスピードにセットしたポリトロンホモジナイザーで 2～3 分破碎する方法が最も効果的である。
- ・ 組織の重量を測定する際には、チューブにあらかじめ ISOGEN を 1～5 ml 入れ、電子天秤に載せてゼロ合わせする。その中に抽出直後の新鮮な組織または凍結組織を入れて重量を測定し、すぐにホモジナイズする。組織をいったん破碎した後、不足分の ISOGEN を追加し、再懸濁する。
- ・ ホモジネートは 4℃で一晩、-20℃または-70℃で少なくとも 1 年間保存できる。

動物組織の場合、ISOGEN 1 ml あたり 100 mg を上限として、ガラステフロンホモジナイザーまたはポリトロンホモジナイザーでホモジナイゼーションする。夾雑物の多い組織（肝臓や脾臓など）の場合、ISOGEN 1 ml あたり使用する組織の量は 25～50 mg にする。

脂質が多い試料の場合、ホモジネートを一度遠心（12 K×g, 5 分間, 4℃）する。このとき脂肪はチューブの最上層に集まるので、ピペットやシリンジで脂肪層を貫通して上清を取り、新しいチューブに移す。

培養細胞の場合、トリプシン処理や洗浄などの前処理をすると、RNA の分解が起こる可能性があるため、培地の除去後すぐに ISOGEN を加える。

A: 接着細胞の場合、培養ディッシュから培地を除去し、3.5 cm ディッシュまたは 6 ウェルプレート（10 cm²）あたり少なくとも 1 ml の ISOGEN を加え、ピペッティングして完全に溶解する。使用する ISOGEN の量は、細胞数ではなく培養ディッシュの面積をもとにする。

B: 浮遊細胞の場合、遠心分離して細胞を沈殿させた後、培地を除去し、 1×10^7 細胞あたり少なくとも 1 ml の ISOGEN を加え、ピペッティングして細胞を溶解する（細胞数が不明な場合は、試料の体積に対して 10 倍量の ISOGEN を添加する）。

植物試料の場合、ISOGEN 1 ml あたり 100 mg を上限とし、夾雑物が特に多い試料の場合は ISOGEN 1 ml あたり 25 mg にする。

液体窒素中で凍結粉碎した試料を、あらかじめ 50℃に温めておいた ISOGEN 中に入れてホモジナイズし、50℃で 10 分間温浴する。温浴後、激しく混和してから遠心（12 K×g, 10 分間, 4℃）し、沈殿物を取らないよう上清を 1 ml ずつ別のチューブに移す。

夾雑物の多い試料（種子、球根など）は、この上清をいったん凍結（-80℃, 1 時間放置）させて室温で融解してから遠心して、析出した残さを取らないよう上清を 1 ml ずつ新しいチューブに移す。

2. 1.のホモジネートを室温で5分間放置したら、200 μ l（使用した ISOGEN 量の 0.2 倍量）のクロロホルムを添加する。
15秒間激しく混和し、室温で2分間放置した後、遠心（12 K \times g, 15分間, 4 $^{\circ}$ C）する。

注)

- ・ イソamilアルコールの添加されたクロロホルム（24 : 1 CIA など）は使用できない。
- ・ ホモジネートは遠心分離により、下層の有機相、中間層および上層の水相に分かれる。RNA は水相に含まれ、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 の約 60%である。極端に水相の量が少なく、再度激しく混和してから遠心分離を試みても水相の体積が 30%以下の場合は、ISOGEN 量に対する組織量を減らすなどして、再度抽出しなおすことを推奨する。

3. 上層の RNA を含む水相を 400 μ l 取り、新しいチューブに移す。

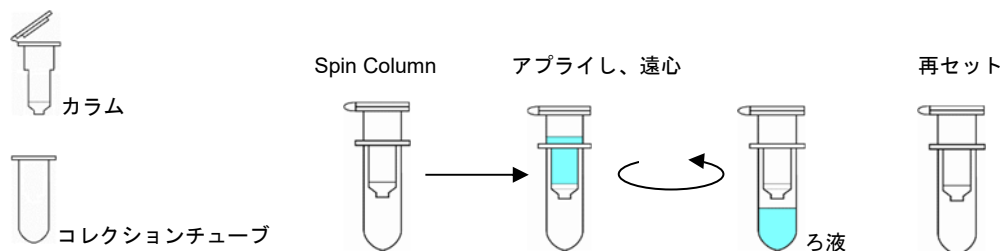
注)

- ・ 慎重に上の方から水相を取り、中間層近くの水相を残して DNA やフェノールが混入しないようにする。

4. 3.に同量（400 μ l）の 70%エタノールを添加し、転倒混和する。

5. 4.を全量（800 μ l）、Spin Column にアプライし、蓋を閉めて遠心（12 K \times g, 15 秒間, 4 $^{\circ}$ C）する。

Spin Column は、カラムにコレクションチューブをセットして使用します。



6. ろ液を 700 μ l 取って新しいマイクロチューブに移し、200 μ l のイソプロパノールを加えて混和する。この混合液は 8.で用いる。
ろ液回収後のコレクションチューブは、カラム部に再度セットして 7.に進む。

注)

- ・ このとき、Spin Column のカラム部に RNA が吸着しますが、試料由来の夾雑物によってはこの時点で吸着されないことがあります。
- ・ ろ液は全量回収しない。底にたまる夾雑物（目に見えない場合もある）を取らないよう一部ろ液を残して上の方から慎重に取る。
- ・ Spin Column 上で DNase 処理を行いたい場合は、この時点（7.の前）で行うことができる。（p.9 トラブルシューティング・オプション参照）

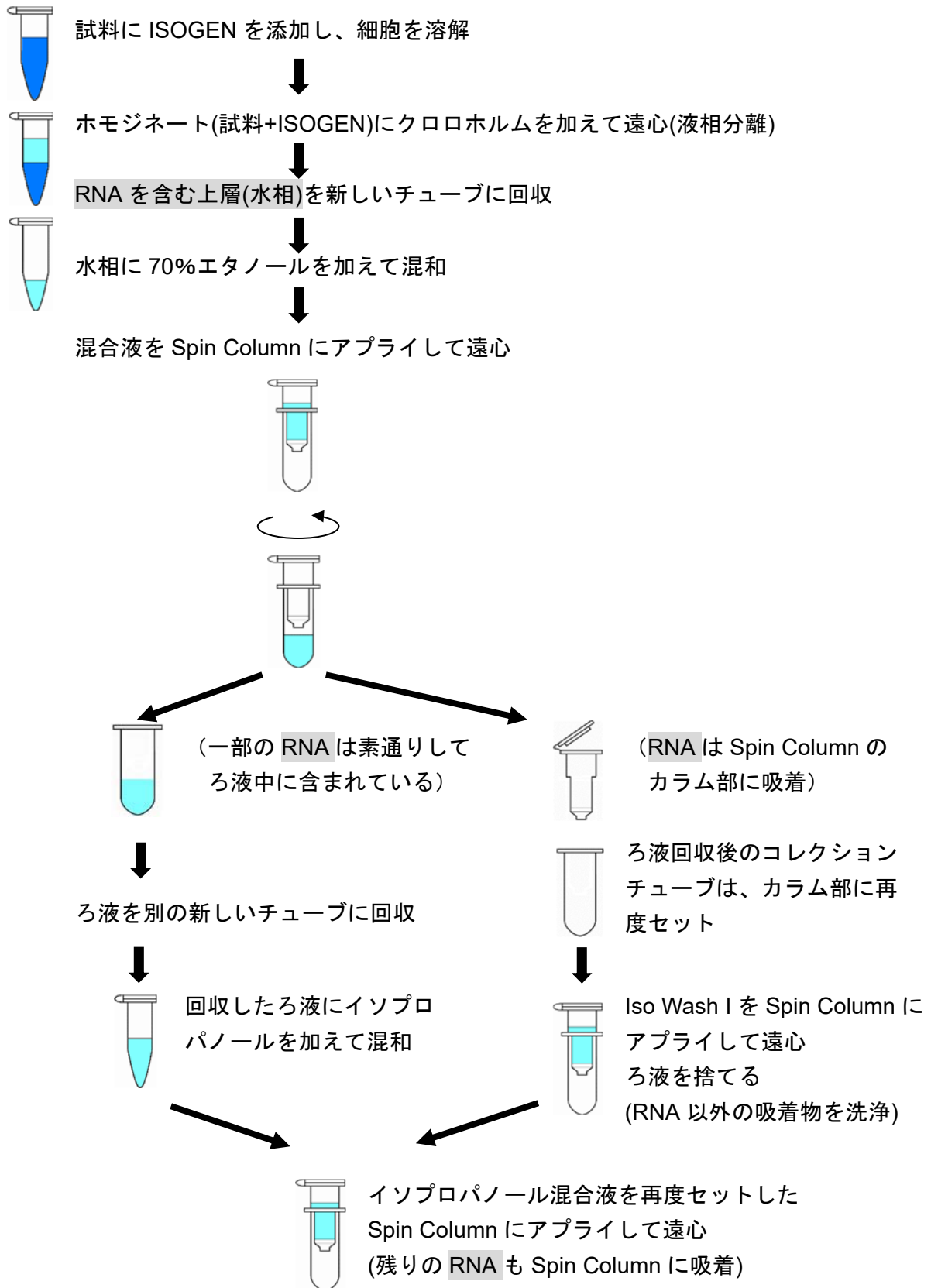
7. 6.の Spin Column に、500 μ l の IsoWash I をアプライし、遠心（12 K \times g, 15 秒間, 4 $^{\circ}$ C）してろ液を捨てる。
8. 7.の Spin Column に 6.の混合液（ろ液+イソプロパノール）を全量アプライし、遠心（12 K \times g, 15 秒間, 4 $^{\circ}$ C）してろ液を捨てる。
注）
 - ・ これにより残りの RNA を吸着させている。その後、Spin Column のフィルター上に多くの析出物がある場合は、IsoWash I による洗浄を再度行う。300 μ l の IsoWash I をアプライし、遠心（12 K \times g, 15 秒間, 4 $^{\circ}$ C）してろ液を捨てる。
9. 8.の Spin Column に、300 μ l の IsoWash II をアプライし、遠心（12 K \times g, 15 秒間, 4 $^{\circ}$ C）する。
10. 9.の Spin Column に再度 300 μ l の IsoWash II をアプライし、遠心（12 K \times g, 1 分間, 4 $^{\circ}$ C）してろ液とコレクションチューブを捨てる。
11. 10.の Spin Column のカラム部に新しいマイクロチューブをセットする。TE または RNase フリー水を 20~50 μ l アプライし、1 分間放置する。
12. 遠心（12 K \times g, 1 分間, 4 $^{\circ}$ Cまたは室温）して RNA を溶出する。

本品で得られる RNA の収量の目安は次の通りである。

試料		収量の目安
動物組織 (マウス)	脳	0.5 μ g RNA/mg tissue
	肝臓	3 μ g RNA/mg tissue
	腎臓	2 μ g RNA/mg tissue
	精巣	2 μ g RNA/mg tissue
培養細胞	Jurkat 細胞	4 μ g RNA/ 1×10^6 cells
	HeLa 細胞	4 μ g RNA/ 1×10^6 cells
植 物	キャベツ(芽ばえ)	0.3 μ g RNA/mg tissue
	イネ(葉)	0.3 μ g RNA/mg tissue
	ダイズ種子	0.5 μ g RNA/mg tissue
	トウモロコシ種子	0.5 μ g RNA/mg tissue
	キャベツ種子	0.3 μ g RNA/mg tissue
	チューリップ球根	0.2 μ g RNA/mg tissue
	イネ(籾)	0.2 μ g RNA/mg tissue

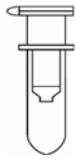
正確な吸光度を測定するには、TE (pH 8.0) など pH 8.0 以上のバッファーを使用する。

<簡易操作フロー>



次のページにつづく

前のページのつづき



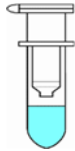
ろ液を捨てる
(このとき、Spin Column のフィルター上に多くの析出物がある場合は、IsoWash I による洗浄を再度行う)



Iso Wash II をアプライして遠心(15 秒間)



Iso Wash II をアプライして遠心(1 分間)



ろ液とコレクションチューブを捨てる



Spin Column のカラム部に新しいマイクロチューブを
セット



TE または RNase フリー水をアプライして遠心



RNA を溶出

VI トラブルシューティング

トラブル	原因と対策
低収量	サンプルのホモジナイゼーションまたは溶解が不十分だと、ISOGEN 溶液に触れていない細胞内部での RNA 分解が進む。組織の摘出を素早くすることと効果的にホモジナイズすることが重要である。 p.4 プロトコール 1.の 注) を参照。
RNA の分解	新鮮な組織を摘出後、すぐに ISOGEN で処理する。または速やかに液体窒素で凍結させる。
	凍結試料は -70°C 以下で保存する。
	RNA 溶解用の溶液やチューブは、RNase フリーのものを使用する。
DNA の混入	サンプルの量に対して添加する ISOGEN の量を増やす。
	有機溶媒、強緩衝液、塩、アルカリ性溶液を含む試料を用いない。
	液相分離後の水相は全量取らないで、中間層近くの水相を残すように分取して DNA を混入させないようにする。
	DNase 処理を行う。下記オプション参照。
吸光値のばらつき	吸光度測定に水を用いると値がばらつくことがある。TE (pH 8.0) など pH 8.0 以上のバッファーを使用すると再現性よく測定できる。
	低純度である。多糖類などの夾雑物が混入している。トラブル「低純度」および「夾雑物の混入」の対策を参照。
低純度	ISOGEN 量が不足するとサンプルの溶解が不十分となるので、サンプル量を半分に減らすか、または添加する ISOGEN 量を 2 倍に増やす。
	脂肪、プロテオグリカン、ポリサッカライド（多糖類）などが混入している。トラブル「夾雑物の混入」の対策を参照。
夾雑物の混入	ホモジネートを遠心（12K×g、10 分間）して、脂肪や不溶物を除去する。
	植物試料の中でも夾雑物が特に多い種子や球根などの場合、ホモジネートをいったん凍結させてから遠心して、残さを除去する。

<オプション>

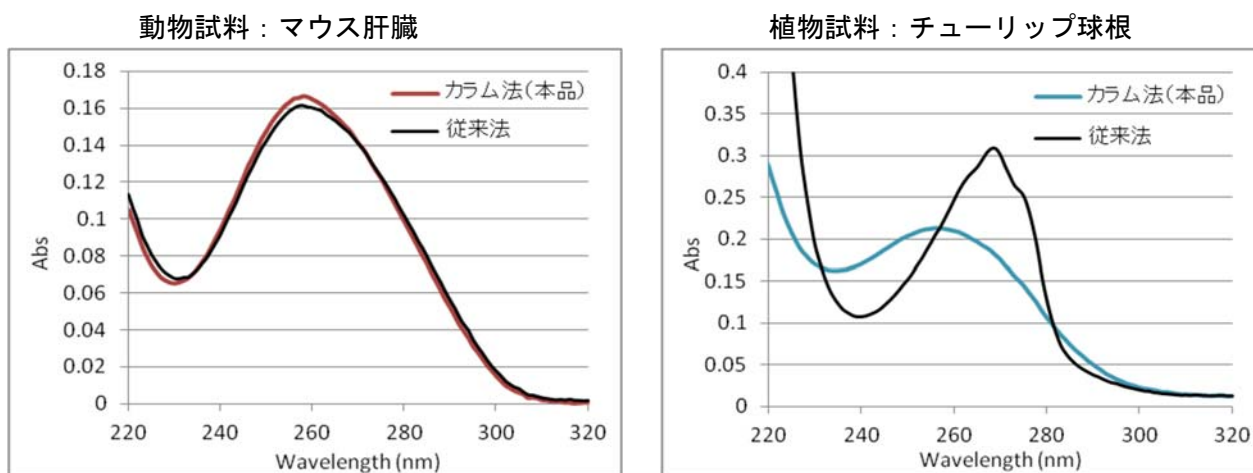
・ **RT-PCR 用鑄型 RNA 調製のため DNase 処理をしたい場合**、Deoxyribonuclease (RT Grade) for Heat Stop (Code No. 312-05951) を用いて、得られた RNA 溶液の DNase 処理を行う。

・ **Spin Column 上で DNase 処理をしたい場合**、プロトコール 6.の段階で (IsoWash I での洗浄前に)、DNase I (RNase free) (Code No. 314-08071) を用いて行える。あらかじめ下記のとおり調製した DNase 溶液 100 µl を Spin Column にアプライして、15 分間室温で放置する。その後は次のプロトコール 7.に進む。

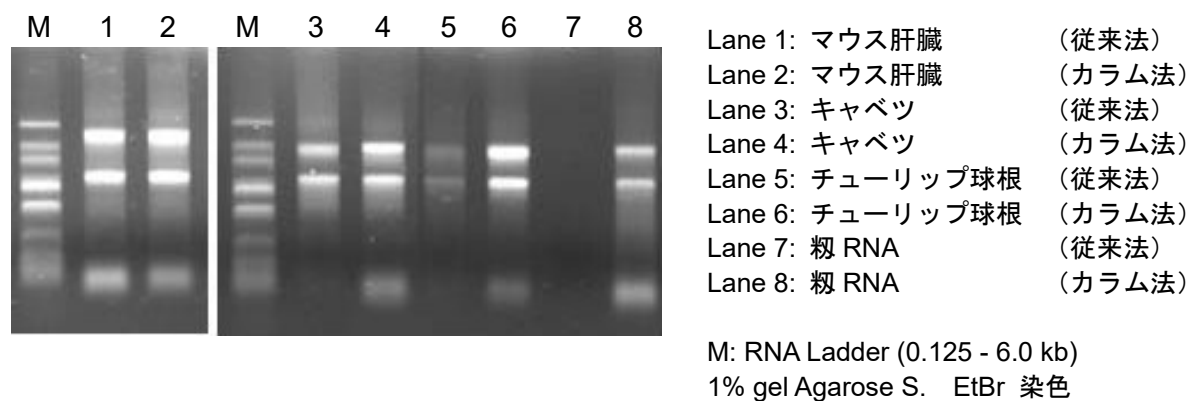
DNase 溶液 (用事調製) : チューブに 30 units の DNase I (RNase free) と、酵素添付の反応用バッファー(10×Buffer)を 10 µl 加え、RNase フリー水で 100 µl にし、軽くピペティングして混合する。

VII データ

本マニュアルに従ってマウス肝臓（50 mg）と凍結粉碎した植物試料（各 25 mg）から RNA を抽出し、吸光スペクトルを測定した。並行して、従来法（ISOGEN 抽出後にイソプロパノール沈殿で精製）も行った。



また、各 RNA 溶液の吸光値をもとに算出した 0.5 μ g の RNA をホルムアルデヒド変性アガロースゲルにて電気泳動を行なった。



動物組織の場合、従来法と同等の高純度 RNA が得られた（培養細胞を試料にした場合も同様であった）。

植物試料（特に球根、粳など）の場合では、カラム法（本品）の方が 230 nm 付近に吸収波長をもつ多糖類などの夾雑物が除かれた純度の高い RNA が得られた。そのことは、電気泳動結果からも確認できる。

・記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。

お問い合わせ先

株式会社ニッポンジーン
研究試薬部 学術営業課

TEL 076 (451) 6548

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

お問い合わせは、お電話もしくはWEB フォームより承っております。