

パラフィン包埋組織切片からの RNA 抽出キット

ISOGEN PB Kit

マニュアル（第 3 版）

Code No. 315-06421

NIPPON GENE CO., LTD.

目 次

I	製品説明	2
II	ご使用前に	2
III	キット内容	3
IV	保 存	3
V	使用上の注意	3
VI	プロトコール	4
VII	実験例	9
VIII	関連製品	11

I 製品説明

ISOGEN PB Kit は、パラフィン包埋組織切片から RNA を抽出するためのキットです。脱パラフィン → Proteinase K 処理 → RNA 抽出 (ISOGEN-LS) という簡単な操作で、短時間 (約 2 時間) で RNA を抽出することができます。

■ 抽出した RNA の用途

- ・ RT-PCR による RNA ウイルスの検出
- ・ RT-PCR による mRNA の検出
- ・ パラフィン包埋組織切片における RNA の保存度チェック など

II ご使用の前に

パラフィン包埋組織から抽出される RNA は、包埋までの過程で RNA の分解が進行しているため、新鮮組織から抽出したものと比較して、RNA の完全度が劣っています。

哺乳動物の新鮮組織から抽出した total RNA は、電気泳動において、28S rRNA と 18S rRNA の明るいバンドが検出でき、その比率は約 2 : 1 になりますが、パラフィン包埋組織から抽出した場合には必ずしもそのような結果にはなりません。実際に、マウスのパラフィン包埋組織を用いた抽出実験では、28S rRNA はほとんど確認できませんでした。したがって、包埋までの過程で RNA が分解されていることが示唆されます。さらに、RNA の分解の程度はパラフィン包埋ブロックの状態に大きく依存します。18S rRNA がはっきりと確認できるブロックもあれば、18S rRNA も確認できないほどに分解が進んでいるものもあります。

そこで、弊社では 18S rRNA の残存を 1 つの判断基準としています。In situ hybridization 等、RNA の保存度が重要な場合には、これを 1 つの指標とすることをお勧めします。

また、RNA が分解されていても (18S rRNA を確認できない場合でも)、RT-PCR による遺伝子の検出は可能な場合が多いので、抽出した RNA を RT-PCR に用いる場合は、RNA の完全度は通常は特に問題にはなりません。ただし、パラフィン包埋組織切片からの PCR は、通常のものに比べ、増幅効率が低いので、プライマーの設定は増幅サイズが大きくなりすぎないように (400 bp 以下、できれば 200 bp 以下) 注意して下さい。

Ⅲ キット内容

(20 回分)

Proteinase K (20 mg/ml)	100 μ l	× 1 本
Extraction Buffer *	3 ml	× 1 本
ISOGEN-LS	10 ml	× 1 本
Ethachinmate	60 μ l	× 1 本
Deoxyribonuclease (RT Grade)	20 μ l	× 1 本
10 × DNase (RT Grade) Buffer II	100 μ l	× 1 本
Stop Solution (RT Grade)	100 μ l	× 1 本
DEPC treated Water	500 μ l	× 2 本

* Extraction Buffer 中に白い結晶が現れることがありますが、品質には問題ありません。
このような場合は、37～50℃でインキュベートし、結晶を完全に溶解させてからご使用下さい。

Ⅳ 保 存

－20℃保存

- ・ Extraction Buffer は室温でも保存可能です。
- ・ ISOGEN-LS は2～10℃でも保存可能です。

Ⅴ 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わないで下さい。
- ・ ISOGEN-LS 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）を着用して下さい。
- ・ 蒸気を吸入しないようにし、換気を十分に行ってください。
- ・ 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。
- ・ 安全性データシート（SDS）につきましては、ニッポンジーン WEB ページ
（www.nippongene.com）にてご覧になれます。

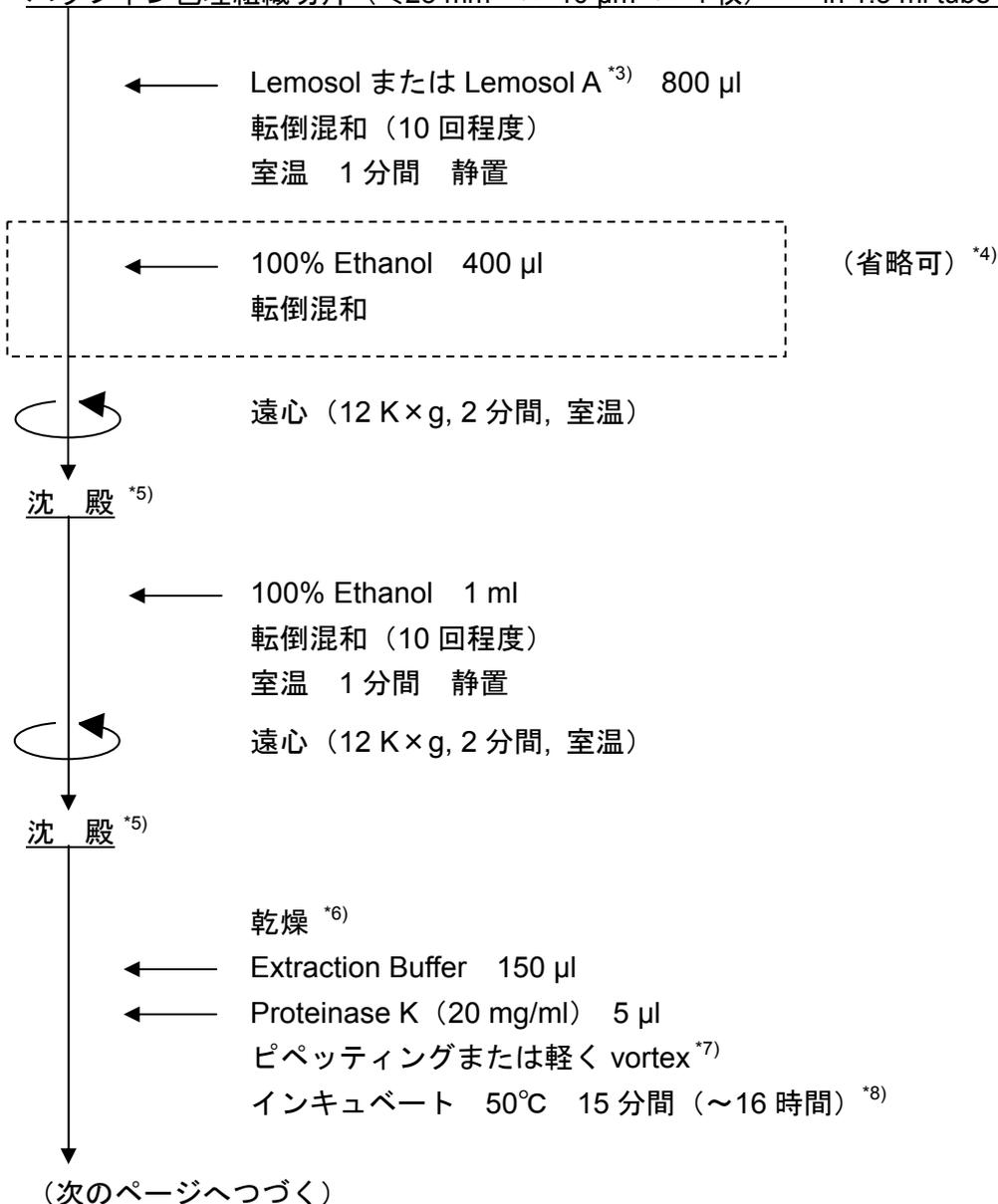
VI プロトコール

<キット以外に必要な試薬>

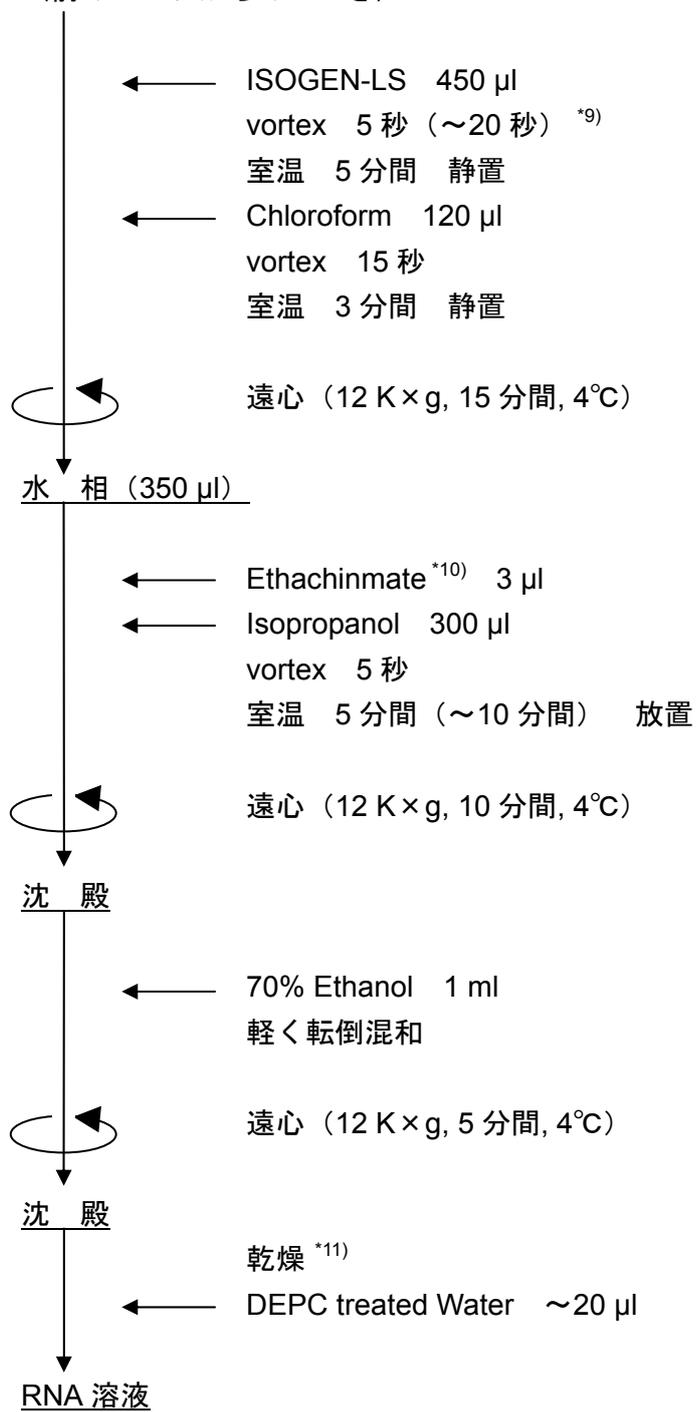
- Lemosol または Lemosol A (Xylene でも可)
- Ethanol
- Chloroform
- Isopropanol

<RNA 抽出プロトコール>

パラフィン包埋組織切片 (<25 mm² × 10 μm × 4 枚)^{*1)} in 1.5 ml tube^{*2)}



(前のページからのつづき)



*1) 1回の抽出あたり、パラフィン包埋組織切片 (<25 mm² × 10 μm) を4枚程度使用します。組織のまわりの余分なパラフィンをカッターナイフなどで落としてから、組織をスライスして下さい。パラフィンはLemosol、Lemosol A、Xyleneに溶けるので、パラフィンを完全に切り落とす必要はありません。

また、スライドガラス上の組織切片からRNAを抽出する場合は、脱パラフィン前に、マイクロスパーテル等で削って、スライドガラスから組織を剥がして下さい。

*2) 1.5 ml 容量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 (12 K×g) と ISOGEN-LS (フェノール) に対する耐性があるか確認して下さい。

*3) Xylene でも可能ですが、安全性の高い Lemosol または Lemosol A の使用をお勧めします。

*4) このときの Ethanol の添加は省略することができます。上清に浮き上がりやすいサンプルの場合、Ethanol を加えた方が、組織が沈殿しやすく操作が容易になります。

ただし、パラフィンを多く含むサンプルを用いた場合、この Ethanol の添加でパラフィンが析出する (白濁する) 恐れがありますので、Ethanol を加えずに遠心分離を行うことをお勧めします。パラフィンの析出が見られた場合は、遠心分離して上清を除去後、再度 Lemosol または Lemosol A を加え「100% Ethanol 400 μl」は添加せずに、その後の操作を行って下さい。

*5) 上清はマイクロピペットにて除去します。このとき組織が浮いてくることがあるので、吸い込まないように注意して下さい。

*6) Ethanol が見えなくなるまで風乾または真空乾燥して下さい。

*7) 泡立ちやすいので注意して下さい。

*8) 組織サイズの大きいサンプルを用いる場合や、RNA の収量が低い場合、Proteinase K の反応時間を長くすることで RNA の抽出効率が改善できる場合があります。

*9) Extraction Buffer と ISOGEN-LS が均一になるまで混合して下さい。

*10) Ethachinmate (エタチンメイト) は核酸をアルコール沈殿させる際に使用するアクリルアミド系の高分子キャリアー溶液です。Ethachinmate を添加すると、効率よく RNA を回収することができます。沈殿を目で確認することができます。

*11) Ethanol が見えなくなるまで風乾して下さい。ただし RNA 沈殿を完全に乾燥してしまうと、RNA が溶けにくくなる場合があります。

<抽出した RNA の取り扱いについて>

- ・ 電気泳動および濃度測定を行う場合は、そのままご使用下さい。
- ・ 本品で抽出した RNA を RT-PCR に用いる場合は、キットに添付の Deoxyribonuclease (RT Grade) で処理して下さい。

<RT-PCR 用鑄型 RNA 溶液の準備 : DNase 処理>

抽出した RNA 溶液	(0.1~5 µg)
10×DNase (RT Grade) Buffer II	2.5 µl
Deoxyribonuclease (RT Grade)	0.5 µl
DEPC treated Water	

Total 25 µl ^{*1)}

↓

酵素反応 37°C 15 分間 ^{*2)}

↓

↓ ^{*3)}

↓

Stop Solution (RT Grade) 2.5 µl

↓

熱処理 70°C 10 分間 ^{*4)}

↓

RT-PCR ^{*5)}

*1) 25 µl 以外の反応系で行う場合、Deoxyribonuclease (RT Grade) : 10×DNase (RT Grade) Buffer II : Stop Solution (RT Grade) は、必ず 1 : 5 : 5 の量比で使用して下さい。他の比率では Stop Solution (RT Grade) の効果が十分に得られない場合があります。反応液中の Ca²⁺ をキレートすることが、DNase の反応停止にとっても重要です。

*2) 15 分以上は反応させないで下さい。

*3) この時点で中断する場合は、フェノール/クロロホルム処理による DNase の失活と除去を行って下さい。その場合、Stop Solution (RT Grade) を添加する以降の操作は必要ありません。(次ページ参照)

*4) RNA は高温では不安定です。熱処理は 70°Cで行って下さい。この温度では、DNase は完全に失活しませんが、逆転写反応において特に問題はありません。

*5) 逆転写反応後には、95°C 5 分間の熱処理による逆転写酵素の反応停止を行って下さい。

<DNase 処理に関する注意>

- ・ 前記反応液による DNA の除去は、できるだけ RT-PCR の直前に行ってください。
- ・ DNase 処理した RNA を長期間保存する場合には、フェノール/クロロホルム処理による DNase の失活と除去を行ってください。
- ・ DNase 処理した RNA の電気泳動を行う場合も、フェノール/クロロホルム処理とエタノール沈殿による RNA の回収を行ってください。10×DNase (RT Grade) Buffer II および Stop Solution (RT Grade) の影響により移動度に異常をきたします。
- ・ フェノール/クロロホルム処理による DNase の失活と除去を行う場合、Stop Solution (RT Grade) の添加および 70°C、10 分間の熱処理は必要ありません。

(フェノール/クロロホルム処理による DNase 失活の例)

DNase 処理済 RNA 溶液 25 µl に DEPC treated Water を 75 µl 加えて 100 µl にした後、等量 (100 µl) のフェノール/クロロホルム^{*1)}を加え、混合する。

↓

遠心 (12 K×g, 5~10 分間, 室温) し、上層 (水相) を新しいチューブに移す。

↓

上層と等量 (100 µl) のクロロホルムを加え、混合する。

↓

遠心 (12 K×g, 5~10 分間, 室温) し、上層 (水相) を新しいチューブに移す。

↓

上層に対して 1/10 量 (10 µl) の 3M 酢酸ナトリウム溶液と、2.5 倍量 (250 µl) のエタノールを加えて混合し、室温で 5~10 分間 (あるいは -20°C で 30 分間) 静置する。

↓

遠心 (12 K×g, 10 分間, 4°C) し、上清を除去する。

↓

沈殿を 70%エタノールで洗浄 (1 ml 程度加え軽く転倒混和し、遠心分離して上清を除去) する。

↓

沈殿を 5~10 分間風乾し、DEPC 処理水に溶解する。

↓

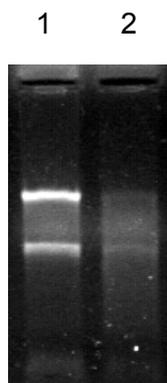
RNA 溶液

*1) 「Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)」 (Code No. 311-90151)

VII 実験例

<マウス顎下腺パラフィン包埋組織切片からの RNA 抽出>

マウス顎下腺パラフィン包埋組織切片 10 μm \times 4 枚から、プロトコールに従って RNA を抽出し、1/4 量 (5 μl) を、1% ホルマリン変性 Agarose S で電気泳動した。



- 1 新鮮組織から抽出した RNA
(ISOGEN で抽出)
- 2 パラフィン包埋組織切片から抽出した RNA
(ISOGEN PB Kit で抽出)

<RT-PCR によるマウス glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapd) 遺伝子の検出>

マウス顎下腺パラフィン包埋組織切片より抽出した RNA 500 ng を、プロトコールに従って DNase 処理した後、RT-PCR によりマウス Gapd 遺伝子エクソン 5 (258 bp) の検出を行った。

逆転写反応

反応液組成

10 \times Reaction Buffer *	2 μl
25 mM MgCl ₂ *	4 μl
2.5 mM dNTP *	4 μl
50 μM Random Nonamer *	1 μl
RNase Inhibitor (20 U/ μl) *	0.5 μl
EuroScript RT (50 U/ μl) *	0.5 μl
DNase 処理済み RNA	8 μl
Total	20 μl

逆転写反応条件

Total 20 μl
25°C 10 分
48°C 30 分
95°C 5 分
↓
1st strand cDNA

* 逆転写反应用の試薬は Reverse Transcriptase qPCR Core Kit (EUROGENTEC 社) を使用した。

PCR

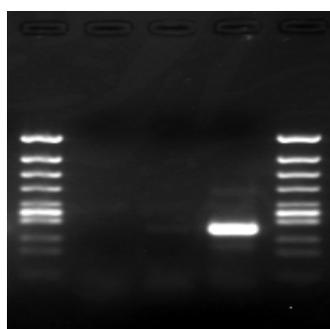
反応液組成

10 × Gene Taq Universal Buffer	2.5 μl
2.5 mM dNTP Mixture	2 μl
3 μM Gapd Primer Mixture	2.5 μl
Gene Taq NT (5 U/μl)	0.25 μl
1st strand cDNA	5 μl
Distilled Water	12.75 μl
<hr/>	
Total	25 μl

PCR 条件

94°C	2分	} × 35
95°C	15秒	
60°C	30秒	
72°C	30秒	

1 2 3 4 5



- 1 OneSTEP Marker 5 (ΦX174 / Hinc II digest)
- 2 Template なし
- 3 逆転写反応を行っていない RNA
- 4 逆転写反応を行った RNA
- 5 OneSTEP Marker 5 (ΦX174 / Hinc II digest)

PCR 産物の 1 / 2 量 (12.5 μl) を 2% Agarose S で泳動

<微量試料の RT-PCR について>

抽出した RNA が電気泳動で確認できない場合や 10 ng 以下である場合には、RTmate (Code No. 315-05941) を添加して逆転写反応を行うことをお勧めします。RTmate の添加により、RT-PCR での検出限界感度が上昇します。

配列など RTmate に関する詳細は、弊社 WEB ページ (www.nippongene.com) をご覧下さい。

VIII 関連製品

Code No.	製品名	包装単位
311-07361	ISOGEN II	100 ml
311-02501	ISOGEN	100 ml
317-02623	ISOGEN-LS	10 ml
311-02621		100 ml
312-01791	Ethachinmate	0.2 ml
312-05951	Deoxyribonuclease (RT Grade) for Heat Stop	1,000 units
318-05953		1,000 units × 2
315-05941	RTmate	500 µl
316-90101	Distilled Water, Deionized, Sterile	100 ml
318-90105		500 ml
312-90201	DEPC treated Water	100 ml
314-90205		500 ml
311-90151	Phenol / Chloroform / Isoamyl alcohol	250 ml
312-01193	Agarose S	100 g
318-03231	Gene Taq NT	250 units
311-05801	OneSTEP Marker 5 (φX174/Hinc II digest)	375 µl
317-05803		375 µl × 5

・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
<p>株式会社ニッポンジーン 研究試薬部 学術営業課</p> <p>TEL 076 (451) 6548 www.nippongene.com</p>