動物細胞や組織からの RNA 抽出キット

ISOSPIN Cell & Tissue RNA

マニュアル（WEB 版）

Ver.2-2506

Code No. 314-08211

NIPPON GENE CO., LTD.

Ⅰ　製品説明

ISOSPIN Cell & Tissue RNA（アイソスピン セル アンド ティシュー アールエヌエー）は、動物培養細胞や動物組織から RNA を抽出・精製するためのキットです。
本キットは､カオトロピックイオン存在下で RNA がシリカへ吸着する原理を応用しており、フェノールやクロロホルムを使用しません。使用するスピンカラムは、カラム容積を最大限確保しており、内封されたシリカゲル膜は、充分な RNA 吸着容量と高い溶出効率を確保しています。
本キットでは、夾雑物を遠心分離により除去する方法とシリカゲル膜上での DNase I 処理を採用しており、約 1 時間で高純度の RNA を抽出・精製できます。

対象試料	RNA 抽出プロトコール	ページ番号
動物培養細胞	動物培養細胞用抽出プロトコール	P5
動物組織	動物組織用抽出プロトコール	P7
マウス心臓等	【補足】改変プロトコール	P9

II　キット内容

キット内容品	容量（50 回用）	備考
PT Extraction Buffer（組織用）	30 ml × 1 本	
C Extraction Buffer（細胞用）	30 ml × 1 本	
PT Binding Buffer（組織・細胞用）	40 ml × 1 本	エタノール含有
PT Wash1 Buffer	40 ml × 1 本	エタノール含有（洗浄液）
PT Wash2 Buffer	40 ml × 1 本	エタノール含有（洗浄液）
DNase I (RNase free)	2,000 units × 1 本	
10×DNase I Buffer	1 ml × 1 本	
ddWater (RNase free)	1 ml × 8 本	DNase I 溶液調製用・溶出用
Spin Column	50 本 × 1 袋	上部パーツ：カラム 下部パーツ：Collection Tube

III　保存

- DNase I (RNase free)　　冷凍保存（－20℃）
- 上記以外の試薬と Spin Column　　室温保存

※エタノール含有の PT Binding Buffer（組織・細胞用）、PT Wash1 Buffer、PT Wash2 Buffer をご使用後は、蒸発を防ぐため速やかに蓋を閉め、保管して下さい。

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。
- 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。
- 本品の取り扱いは、マニュアル記載内容通りに行って下さい。
- 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）は、ニッポンジーンホームページよりご覧になれます。
  https://www.nippongene.com/siyaku/list.html

Ⅴ　プロトコール

全ての遠心操作は 4℃で行って下さい。
＊ただし、4℃冷却できない場合は室温（25℃）での遠心も可能です。

＜キット以外に必要なもの＞
・遠心分離機（4～25℃）
・マイクロピペット
・ピペットチップ
・ペッスル注）
・1.5 ml マイクロチューブ注）

注）効率よく組織を破砕できるようにチューブの形状に応じたペッスルをご使用下さい。

＜必要に応じて別途用意するもの＞
・液体窒素
・Proteinase K (20 mg/ml) 注）
・エタノール注）

注）改変プロトコールで使用する Proteinase K とエタノールは、キットに含まれておりません。別途ご用意下さい。

＜動物培養細胞用抽出プロトコール＞

① 最大 6×10^6 細胞までの**動物培養細胞**

注）培養液などは可能な限り除去し、必要に応じて PBS 等で軽く洗浄する。

注）1×10^4 個など少ない細胞数から抽出する場合は、精製プロトコール⑪で添加する溶出液の量を減らして RNA の濃度を調整する。

② ← 600 µl の **C Extraction Buffer (細胞用)** を加え、ピペッティングで細胞溶解

注）細胞全体に直接 C Extraction Buffer (細胞用) をマイクロピペットでふりかけ、細胞が溶けて粘性の高い液体状になるまでピペッティングする。

注）はがれにくい接着細胞の場合は、C Extraction Buffer (細胞用) を加えた後、溶解しやすくなるようセルスクレーパーで細胞をはがし集める。

注）遠心で回収した細胞がペレット状になっている場合は、タッピング等でペレットをほぐしてから C Extraction Buffer (細胞用) を加える。

③ 溶解した細胞を含む溶液を全量 1.5 ml マイクロチューブへ移し替える

注）はじめから 1.5 ml マイクロチューブを使用していた場合は、移し替えは省略してそのまま進める。

30 秒間以上ボルテックス

注）ボルテックス不足は Spin Column の目詰まりにつながるので確実に行う。

遠心（13,000×g、10 分間、4℃）

注）細胞数や細胞の種類によっては沈殿が見えない場合がある。

注）沈殿が見えない場合は、上清を全量回収する。

④ 上清を新しいマイクロチューブに回収

← 上清と等量の PT Binding Buffer (組織・細胞用) を加えて、数回転倒混和

例）上清 550 µl の場合は 550 µl の PT Binding Buffer(組織・細胞用)を添加する。

混合液を軽くスピンダウン

（次のページ、精製プロトコールの⑤に続く）

＜精製プロトコール＞

（動物培養細胞用抽出プロトコール④からの続き）

⑤ Spin Column に④の混合液を 600 µl 添加（残りは⑥で全量添加）

遠心（13,000×g、1 分間、4℃）

ろ液を捨てる

注）Spin Column のカラムを外し、Collection Tube の中のろ液を捨てた後、カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。（以降、「ろ液を捨てる」は同様）

⑥ ← 残りの④の混合液を Spin Column に全量添加

遠心（13,000×g、1 分間、4℃）

ろ液を捨てる

⑦ ← 500 µl の PT Wash1 Buffer を Spin Column に添加

遠心（13,000×g、1 分間、4℃）

ろ液を捨てる

注）⑦のろ液を捨てる操作は省略することができる。

⑧ ← 用事調製した 100 µl の DNase I 溶液を Spin Column に添加

用事調製	
10×DNase I Buffer	10 µl
DNase I (RNase free)	30 units
ddWater (RNase free)	up to 100 µl

静置（15 分間、室温）

⑨ ← 300 µl の PT Wash1 Buffer を Spin Column に添加

遠心（13,000×g、1 分間、4℃）

ろ液を捨てる

⑩ ← 600 µl の PT Wash2 Buffer を Spin Column に添加

遠心（13,000×g、2 分間、4℃）し、ろ液と Collection Tube を捨てる

⑪ Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す

← 50 µl の ddWater (RNase free)をメンブレン中央に滴下

注）溶出液量を減らしてもよいが、20 µl より減らさない。

静置（3 分間、室温）

遠心（13,000×g、1 分間、4℃）

RNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される

＜動物組織用抽出プロトコール＞

❶ 最大 20 mg までの**動物組織**を 1.5 ml マイクロチューブに採取

注）新鮮な動物組織または凍結組織を使用する。採取した組織は速やかに液体窒素中で凍結させるか、すぐに❷の処理に進む。

注）試料量が少ない場合は、精製プロトコール⑪で添加する溶出液の量を減らして RNA の濃度を調整する。

注）秤量の際は RNase の活性を抑制するため、氷冷しながら速やかに行うか、マイクロチューブにあらかじめ PT Extraction Buffer（組織用）を入れておく。

❷ ← 600 µl の **PT Extraction Buffer（組織用）**を加え、ペッスルですり潰す

注）試料が液中で浮遊する場合、スピンダウンするとすり潰しやすくなる。

注）ホモジナイズの不足は低収量につながるので直ちに念入りにすり潰す。

❸ 30 秒間以上ボルテックス

注）ボルテックス不足は Spin Column の目詰まりにつながるので確実に行う。

遠心（13,000×g、10 分間、4℃）

注）遠心後に上清を回収する際、脂質を多く含む試料は液表面に油分が浮遊していることがあるのでなるべく取らないようにする。

注）析出物を多く含む場合は回収した上清を再度、遠心（13,000×g、10 分間）し、上清を回収する。

❹ 上清を新しいマイクロチューブに回収

← 上清と等量の PT Binding Buffer（組織・細胞用）を加えて、数回転倒混和

例）上清 550 µl の場合は 550 µl の PT Binding Buffer (組織・細胞用)を添加する。

混合液を軽くスピンダウン

（次のページ、精製プロトコールの⑤に続く）

＜精製プロトコール＞

（動物組織用抽出プロトコール❹からの続き）

⑤ Spin Column に❹の混合液を 600 µl 添加（残りは⑥で全量添加）

遠心（13,000×g、1 分間、4℃）

ろ液を捨てる

注）Spin Column のカラムを外し、Collection Tube の中のろ液を捨てた後、カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。（以降、「ろ液を捨てる」は同様）

⑥ ← 残りの❹の混合液を Spin Column に全量添加

遠心（13,000×g、1 分間、4℃）

ろ液を捨てる

⑦ ← 500 µl の PT Wash1 Buffer を Spin Column に添加

遠心（13,000×g、1 分間、4℃）

ろ液を捨てる

注）⑦のろ液を捨てる操作は省略することができる。

⑧ ← 用事調製した 100 µl の DNase I 溶液を Spin Column に添加

用事調製	
10×DNase I Buffer	10 µl
DNase I (RNase free)	30 units
ddWater (RNase free)	up to 100 µl

静置（15 分間、室温）

⑨ ← 300 µl の PT Wash1 Buffer を Spin Column に添加

遠心（13,000×g、1 分間、4℃）

ろ液を捨てる

⑩ ← 600 µl の PT Wash2 Buffer を Spin Column に添加

遠心（13,000×g、2 分間、4℃）し、ろ液と Collection Tube を捨てる

⑪ Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す

← 50 µl の ddWater (RNase free)をメンブレン中央に滴下

注）溶出液量を減らしてもよいが、20 µl より減らさない。

静置（3 分間、室温）

遠心（13,000×g、1 分間、4℃）

RNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される

【補足】改変プロトコール（マウス心臓からの RNA 抽出）

心臓、骨格筋組織、軟骨などは硬く繊維等も多いため、通常プロトコールでは RNA 抽出が困難です。Proteinase K を用いる改変プロトコールをご紹介いたします（データはニッポンジーンホームページ参照）。

Proteinase K (20 mg/ml) とエタノールは本キットに含まれておりません。別途ご用意下さい。

① **マウス心臓（5 mg 前後）**を 1.5 ml マイクロチューブに測り取る

注）新鮮な動物組織または凍結組織を使用する。採取した組織は速やかに液体窒素中で凍結させるか、すぐに②の処理に進む。

注）秤量の際は RNase の活性を抑制するため、氷冷しながら速やかに行うか、マイクロチューブにあらかじめ PT Extraction Buffer（組織用）を入れておく。

② ← 450 µl の **PT Extraction Buffer（組織用）**を加え、ペッスルですり潰す

注）試料が液中で浮遊する場合、スピンダウンするとすり潰しやすくなる。

注）ホモジナイズの不足は低収量につながるので直ちに念入りにすり潰す。

③ ← 140 µl の ddWater (RNase free)と、

← 10 µl の **Proteinase K (20 mg/ml)**を加え、よく混和する

56℃で 10 分間加温

遠心（10,000×g～13,000×g、3 分間、4℃）

注）遠心後に上清を回収する際、脂質を多く含む試料は液表面に油分が浮遊していることがあるのでなるべく取らないようにする。

注）析出物を多く含む場合は回収した上清を再度遠心し、上清を回収する。

④ 上清を新しいマイクロチューブに回収

← 上清（通常 600 µl）に 1/2 量（300 µl）の**エタノール**を加え、よく混和する

エタノール混合液を軽くスピンダウン

（次のページの⑤に続く）

（改変プロトコール④からの続き）

⑤ Spin Column に④のエタノール混合液を全量（900 µl）添加

遠心（8,000×g～13,000×g、15 秒間～1 分間、4℃）

ろ液を捨てる

注）Spin Column のカラムを外し、Collection Tube の中のろ液を捨てた後、カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。（以降、「ろ液を捨てる」は同様）

⑥ ← 500 µl の PT Wash1 Buffer を Spin Column に添加

遠心（8,000×g～13,000×g、15 秒間～1 分間、4℃）

ろ液を捨てる

⑦ ← 用事調製した 100 µl の DNase I 溶液を Spin Column に添加

用事調製	
10×DNase I Buffer	10 µl
DNase I (RNase free)	30 units
ddWater (RNase free)	up to 100 µl

静置（15 分間、室温）

⑧ ← 300 µl の PT Wash1 Buffer を Spin Column に添加

遠心（8,000×g～13,000×g、15 秒間～1 分間、4℃）

ろ液を捨てる

⑨ ← 600 µl の PT Wash2 Buffer を Spin Column に添加

遠心（8,000×g～13,000×g、2 分間、4℃）し、

ろ液と Collection Tube を捨てる

⑩ Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す

← 20～50 µl の ddWater (RNase free)をメンブレン中央に滴下

注）溶出液量を減らしてもよいが、20 µl より減らさない。

静置（3 分間、室温）

遠心（8,000×g～13,000×g、2 分間、4℃）

RNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される

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が不十分または溶解を速やかに行わないと操作中に 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。
RNA の分解	新鮮な試料を採取後、すぐに Extraction Buffer 中でホモジナイズする。または速やかに液体窒素で凍結させる。
	凍結試料は－70℃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	最終産物の DNase 処理を行う。DNase 処理を行ったサンプルはプロトコールの最初から行うことで精製することができる（この時メンブレン上での DNase 処理 ⑧ は不要）。
吸光値のばらつき	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	Extraction Buffer に対してサンプルが多すぎると夾雑物の除去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 Extraction Buffer の量を 2 倍に増やす。
夾雑物の混入	上清を再度、遠心（13,000×g、10 分間、4℃）して、油分や不溶物を除去する。
上記の対策を行っても解決しない	心臓、骨格筋組織、軟骨などは硬く繊維等も多いため、通常プロトコールでは RNA 抽出が困難です。Proteinase K を用いる改変プロトコールをお試し下さい。

VII　データ

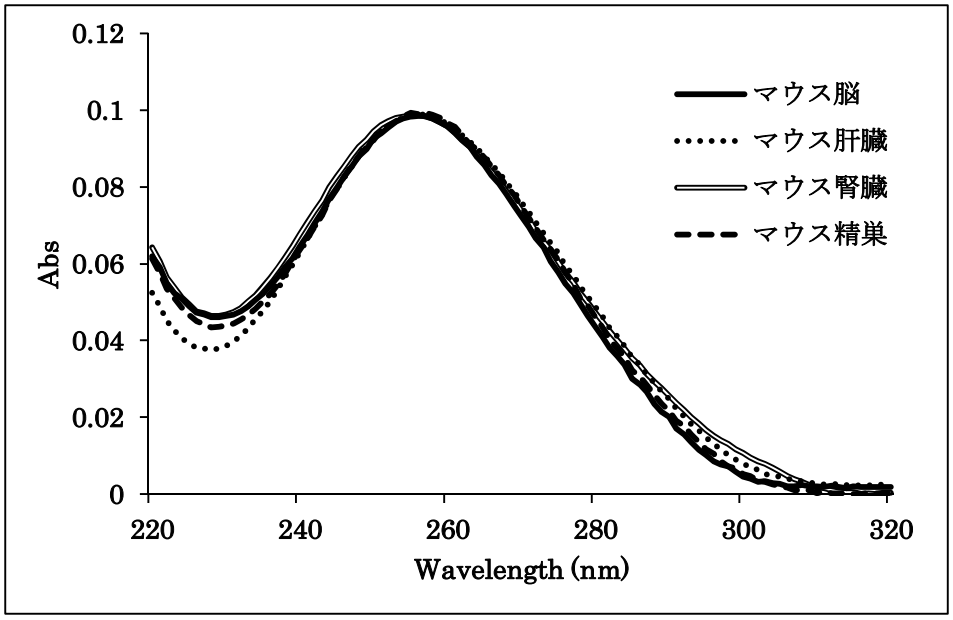
＜製品性能＞

RNA 吸着容量	100 µg
カラム容量	900 µl

＜RNA の収量の目安＞

試　料	収量の目安
HeLa 細胞	15 µg RNA/10^6 cells
Jurkat 細胞	10 µg RNA/10^6 cells
Vero 細胞	15 µg RNA/10^6 cells
マウス脳	1.0 µg RNA/mg tissue
マウス肝臓	3.5 µg RNA/mg tissue
マウス腎臓	3.0 µg RNA/mg tissue
マウス精巣	1.5 µg RNA/mg tissue

＜RNA の吸光スペクトル＞



その他のデータは、ニッポンジーンホームページをご参照下さい。

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。
マニュアル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　TEL 076-451-6548 （受付：平日 9 時-12 時、13 時-17 時）
ホームページ URL　https://www.nippongene.com/siyaku/