

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（第 3 版）

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 ティッシュ 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nc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、十分な 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。

II キット内容

キット内容品	(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°C)
- ・ 上記以外の試薬と Spin Column 室温保存

PT Binding Buffer (組織・細胞用)、PT Wash1 Buffer、PT Wash2 Buffer にはエタノールが含まれています。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。
- ・ 製品安全性データシート（MSDS）につきましては、ニッポンジーンホームページ（<http://www.nippongene.com/>）にてご覧になれます。

V プロトコール

全ての遠心操作は4°Cで行ってください。

*ただし、4°C冷却できない場合は室温（25°C）での遠心も可能です。

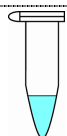
<キット以外に必要なもの>

- ・ マイクロピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ ペッスル
- ・ 1.5 ml マイクロチューブ
- ・ 遠心分離機（4~25°C）

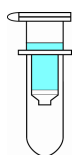
<必要に応じて別途用意するもの>

- ・ 液体窒素

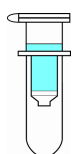
<動物培養細胞用抽出プロトコール>



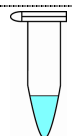
- ① 最大 6×10^6 細胞までの動物培養細胞に 600 μ l の C Extraction Buffer (細胞用) を加え、ピペティングで細胞を溶解する。
注) 培養液などは可能な限り除去し、細胞に直接 C Extraction Buffer (細胞用) を添加する。
- ② 30 秒間以上ボルテックスする。
注) ボルテックスの不足は Spin Column の目詰まりにつながるので確実に行う。
- ③ 遠心 (13,000 \times g、10 分間) し、上清を新しいマイクロチューブに回収する。
注) 沈殿が見えない場合は、全量を回収する。
- ④ 上清に等量の PT Binding Buffer (組織・細胞用) を加えて、数回転倒混和する。軽くスピンドウンする。
例) 上清 550 μ l の場合は 550 μ l の PT Binding Buffer (組織・細胞用) を添加する。



- ⑤ メンブレンに RNA を吸着させるため、600 μ l の④の混合液を Spin Column に添加し、遠心 (13,000 \times g、1 分間) する。
- ⑥ Spin Column のカラムを外し、Collection Tube 中のろ液を捨てた後、カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。
- ⑦ ④の残りの混合液を Spin Column に添加し、⑤、⑥を繰り返す。

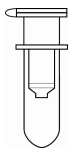


- ⑧ 500 μ l の PT Wash1 Buffer を Spin Column に添加する。
- ⑨ 遠心 (13,000 \times g、1 分間) する。
- ⑩ ろ液を捨てて、カラムを Collection Tube に再度戻す。
注) サンプル数が多い場合は、本ステップを省略することができる。

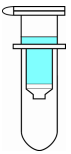


- ⑪ 1.5 ml マイクロチューブに以下の試薬を加えて、DNase I 溶液 100 μ l を調製する。

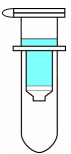
10 \times DNase I Buffer	10 μ l
DNase I (RNase free)	30 units
ddWater (RNase free)	up to 100 μ l



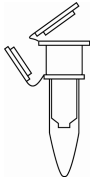
- ⑫ 100 μ l の DNase I 溶液を Spin Column に添加し、静置（15 分間、室温）する。



- ⑬ 300 μ l の PT Wash1 Buffer を Spin Column に添加する。
- ⑭ 遠心（13,000 \times g、1 分間）する。
- ⑮ ろ液を捨てて、カラムを Collection Tube に再度戻す。



- ⑯ 洗浄のため 600 μ l の PT Wash2 Buffer を Spin Column に添加する。
- ⑰ 遠心（13,000 \times g、2 分間）する。ろ液と Collection Tube を捨てる。



- ⑱ Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上へのせる。
- ⑲ RNA を溶出させるため、50 μ l の ddWater (RNase free) をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置する。
- ⑳ 遠心（13,000 \times g、1 分間）する。
- ㉑ RNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される。

<動物培養細胞用簡易プロトコール>

動物培養細胞試料 ($\leq 6 \times 10^6$ cells)

← 600 μ l の C Extraction Buffer (細胞用) を添加し、ピペティングで細胞を溶解
ボルテックスで 30 秒間以上激しく攪拌

← 遠心 (13,000 \times g, 10 分間)

上清を回収

← 上清と等量の PT Binding Buffer (組織・細胞用) を添加し、転倒混和

混合液 600 μ l を Spin Column に添加 (2 回に分けて全量添加)

← 遠心 (13,000 \times g, 1 分間)
ろ液を捨てる

← 残りの混合液を添加

← 遠心 (13,000 \times g, 1 分間)
ろ液を捨てる

← 500 μ l の PT Wash1 Buffer を添加

← 遠心 (13,000 \times g, 1 分間)
ろ液を捨てる

← 100 μ l の DNase I 溶液を添加
室温静置 15 分間

DNase I 溶液 (用時調製) 全量 100 μ l

- ddWater (RNase free)
- 10 x DNase I Buffer 10 μ l
- DNase I (RNase free) 30 units

← 300 μ l の PT Wash1 Buffer を添加

← 遠心 (13,000 \times g, 1 分間)
ろ液を捨てる

← 600 μ l の PT Wash2 Buffer を添加

← 遠心 (13,000 \times g, 2 分間)

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 μ l の ddWater (RNase free) をメンブレン中央に滴下
室温静置 3 分間

← 遠心 (13,000 \times g, 1 分間)

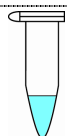
RNA 溶液

<動物組織用抽出プロトコール>

- ① 最大 20 mg までの新鮮な動物組織または凍結組織を 1.5 ml マイクロチューブに採取する。

注)・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。

・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 試料に 600 μ l の PT Extraction Buffer (組織用) を加え、直ちにペッスルですり潰し、30 秒間以上ボルテックスする。試料が液中で浮遊する場合、スピンドア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念入りにすり潰す。

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

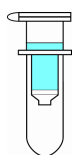
- ③ 遠心 (13,000 \times g、10 分間) し、上清を新しいマイクロチューブに回収する。

注)・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。

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

- ④ 上清に等量の PT Binding Buffer (組織・細胞用) を加えて、数回転倒混和する。軽くスピンドアウンする。

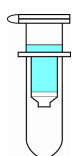
例) 上清 550 μ l の場合は 550 μ l の PT Binding Buffer (組織・細胞用) を添加する。



- ⑤ メンブレンに RNA を吸着させるため、600 μ l の④の混合液を Spin Column に添加し、遠心 (13,000 \times g、1 分間) する。

- ⑥ Spin Column のカラムを外し、Collection Tube 中のろ液を捨てた後、カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。

- ⑦ ④の残りの混合液を Spin Column に添加し、⑤、⑥を繰り返す。

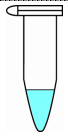


- ⑧ 500 μ l の PT Wash1 Buffer を Spin Column に添加する。

- ⑨ 遠心 (13,000 \times g、1 分間) する。

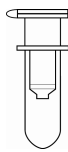
- ⑩ ろ液を捨てて、カラムを Collection Tube に再度戻す。

注) サンプル数が多い場合は、本ステップを省略することができる。

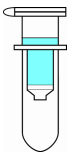


- ⑪ 1.5 ml マイクロチューブに以下の試薬を加えて、DNase I 溶液 100 μ l を調製する。

10×DNase I Buffer	10 μ l
DNase I (RNase free)	30 units
ddWater (RNase free)	up to 100 μ l



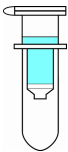
- ⑫ 100 μ l の DNase I 溶液を Spin Column に添加し、静置（15 分間、室温）する。



- ⑬ 300 μ l の PT Wash1 Buffer を Spin Column に添加する。

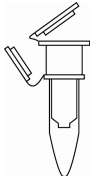
- ⑭ 遠心（13,000×g、1 分間）する。

- ⑮ ろ液を捨てて、カラムを Collection Tube に再度戻す。



- ⑯ 洗浄のため 600 μ l の PT Wash2 Buffer を Spin Column に添加する。

- ⑰ 遠心（13,000×g、2 分間）する。ろ液と Collection Tube を捨てる。



- ⑱ Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上へのせる。

- ⑲ RNA を溶出させるため、50 μ l の ddWater (RNase free) をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置する。

- ⑳ 遠心（13,000×g、1 分間）する。

- ㉑ RNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される。

<動物組織用簡易プロトコール>

動物組織試料 (≦20 mg)

← 600 μ l の PT Extraction Buffer (組織用) を添加
PT Extraction Buffer (組織用) 中でペッスルを用いて試料をよくすり潰し、
ボルテックスで 30 秒間以上激しく攪拌
遠心 (13,000 \times g, 10 分間)

上清を回収

← 上清と等量の PT Binding Buffer (組織・細胞用) を添加し、転倒混和

混合液 600 μ l を Spin Column に添加 (2 回に分けて全量添加)

遠心 (13,000 \times g, 1 分間)
ろ液を捨てる

← 残りの混合液を添加

遠心 (13,000 \times g, 1 分間)
ろ液を捨てる

← 500 μ l の PT Wash1 Buffer を添加

遠心 (13,000 \times g, 1 分間)
ろ液を捨てる

← 100 μ l の DNase I 溶液を添加
室温静置 15 分間

DNase I 溶液 (用時調製) 全量 100 μ l

- ddWater (RNase free)
- 10 x DNase I Buffer 10 μ l
- DNase I (RNase free) 30 units

← 300 μ l の PT Wash1 Buffer を添加

遠心 (13,000 \times g, 1 分間)
ろ液を捨てる

← 600 μ l の PT Wash2 Buffer を添加

遠心 (13,000 \times g, 2 分間)

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 μ l の ddWater (RNase free) をメンブレン中央に滴下
室温静置 3 分間

遠心 (13,000 \times g, 1 分間)

RNA 溶液

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。
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°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	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 ⑪・⑫ 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（ $13\text{K} \times \text{g}$ 、10 分間）して、油分や不溶物を除去する。

VII データ

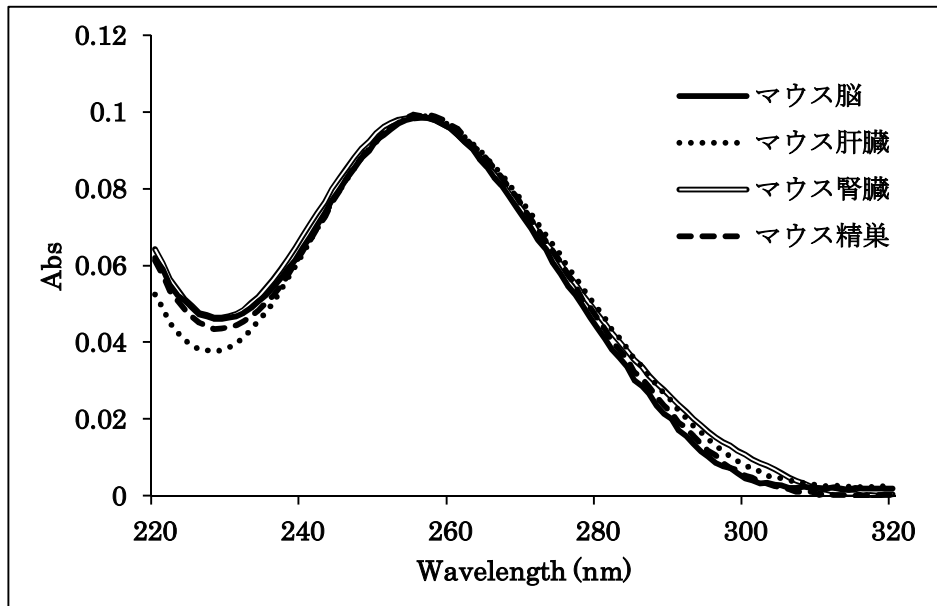
<製品性能>

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>



VIII 関連製品

Code No.	製品名	包装単位
318-90105	Distilled Water, Deionized, Sterile	500 ml
314-08071	DNase I (RNase free)	2,000 units
315-08121	RNase Inhibitor	2,000 units

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
研究試薬部 学術営業課

TEL 076 - 451 - 6548

URL <http://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。