

液体試料からの small RNA 精製キット

---

---

# ISOSPIN Liquid Sample miRNA

マニュアル（第 1 版）

---

---

Code No. 318-09191

NIPPON GENE CO., LTD.

# 目次

I	製品説明 .....	2
II	キット内容・保存温度 .....	3
III	使用上の注意 .....	4
IV	プロトコール .....	4
	■ small RNA 精製プロトコール (large RNA 除去あり) .....	5
	■ small RNA 精製プロトコール .....	7
	■ スケールアップ small RNA 精製プロトコール (large RNA 除去あり) .....	9
	■ スケールアップ small RNA 精製プロトコール .....	10
	■ 200 $\mu$ l 核酸溶液からの small RNA 濃縮プロトコール .....	11
	■ 370 $\mu$ l 核酸溶液からの small RNA 濃縮プロトコール (スケールアップ) .....	12
	■ オプションプロトコール (DNA 回収) .....	13
V	トラブルシューティング .....	14

## I 製品説明

ISOSPIN Liquid Sample miRNA (アイソスピン リキッドサンプル マイクロ RNA) は、液体試料から micro RNA (miRNA) などの small RNA を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核酸がシリカへ吸着する原理を応用しており、操作にフェノールやクロロホルムなどの毒劇物を使用しません。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、十分な核酸の吸着容量を確保し、高い溶出効率を有しています。また、ゲノム DNA の除去にスピncラムを用いた効率的な方法を採用しているため DNase 処理等で生じる短鎖 DNA の混入が少なく、高純度の small RNA を約 90 分間で抽出することができます。

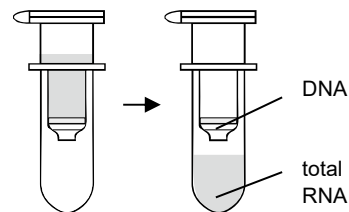
### <特長>

- ・ 血漿、血清、全血、唾液、尿などの液体試料から約 90 分間で small RNA を精製可能
- ・ フェノールやクロロホルムなどの毒劇物を使用しない
- ・ 自社開発のスピncラムにより、高い操作性を実現
- ・ DNase を使用せず、ゲノム DNA を除去可能

### small RNA 精製の流れ

#### Step 1. DNA の除去

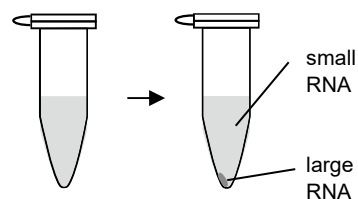
Spin Column へ選択的に DNA を吸着



#### Step 2. large RNA の除去

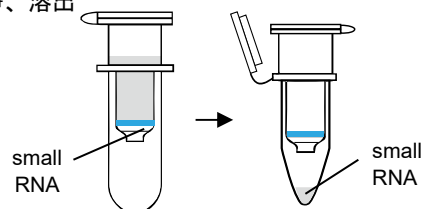
遠心分離で large RNA を沈殿

※血漿、血清の場合、省略可能



#### Step 3. small RNA の精製

Spin Column Blue に small RNA を吸着、洗浄、溶出



## II キット内容・保存温度

### ISOSPIN Liquid Sample miRNA (Code No. 318-09191)

キット構成	容量 (50 回用)	保存温度	備考
Proteinase K	1 ml × 1 本	-20°C	* 1)
LR Extraction Buffer	18 ml × 1 本	室温	
LR Wash1 Buffer	60 ml × 1 本	室温	エタノール含有 * 2)
LR Wash2 Buffer	60 ml × 1 本	室温	エタノール含有 * 2)
ddWater	1 ml × 5 本	室温	
Spin Column	50 本	室温	* 3)
Spin Column Blue	50 本	室温	* 3)

\* 1) キットは室温で輸送します。製品到着後、Proteinase K は-20°C保存して下さい。

\* 2) LR Wash1 Buffer、LR 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。

\* 3) Spin Column、Spin Column Blue は、蓋付きのシリカメンブレンカラム（上部パーツ）と Collection Tube（下部パーツ）で構成されています。

### III 使用上の注意

- ・ 作業検査環境への汚染を防ぐため、使用の際には溶液を飛散させたり、溶液に触れたピペットチップが他の器具や試薬に接触したりしないようご注意ください。
- ・ 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。
- ・ 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。
- ・ 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。
- ・ 安全性データシート（SDS）は、ニッポンジーン Web サイト（[www.nippongene.com](http://www.nippongene.com)）よりご覧になれます。

### IV プロトコール

#### 液体試料の例：

- ・ 血漿
- ・ 血清
- ・ 全血
- ・ 唾液
- ・ 尿
- ・ 細胞懸濁液
- ・ 培養細胞上清
- ・ 核酸溶液

#### 本品以外に必要な試薬、機器など：

- ・ エタノール（96～100%）
- ・ マイクロピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ ヒートブロック（37℃）
- ・ 卓上遠心機
- ・ 遠心分離機
- ・ 1.5 ml マイクロチューブ
- ・ 2.0 ml マイクロチューブ（スタート試料量が 350～370  $\mu$ l の場合）

\* RNase free の試薬、チューブを使用して下さい。

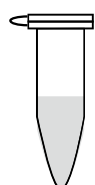
\* 核酸低吸着チューブの使用をお勧めします。

## ■ small RNA 精製プロトコール (large RNA 除去あり)

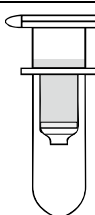
対象 : large RNA と small RNA を含む液体試料

血清や血漿など large RNA が含まれない試料の場合、「small RNA 精製プロトコール」(p. 7) をご参照下さい。

### Step 1. DNA の除去 (カラムへ選択的に DNA を吸着) \*



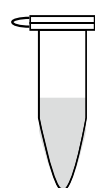
- ① 1.5 ml チューブに 180  $\mu$ l の液体試料、20  $\mu$ l の Proteinase K、180  $\mu$ l の LR Extraction Buffer を加えた後、15 秒間ボルテックスで攪拌する。
- ② 37°C で 15 分間インキュベート (5 分間おきに計 3 回攪拌する)。
- ③ 軽くスピンドウンしてチューブの壁面に付着している液体を落とす。



- ④ Spin Column に③の混合液を全量 (380  $\mu$ l) 添加する。
- ⑤ 遠心 (13,000  $\times$  g、15 秒間、室温) する。

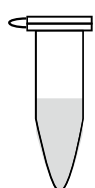
\* カラムに DNA と一部の large RNA が吸着する。ろ液には、small RNA と large RNA が含まれている。

### Step 2. large RNA の除去 (遠心分離で large RNA を沈殿)

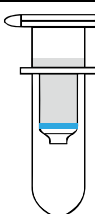


- ⑥ ろ液を新しい 1.5 ml チューブに移す。
- ⑦ 190  $\mu$ l のエタノールを⑥に加えて 15 秒間ボルテックスする。
- ⑧ 遠心 (13,000  $\times$  g、15 分間、室温) する。

### Step 3. a) small RNA 精製 (カラム吸着)



- ⑨ 上清を全量 (~570  $\mu$ l) 回収して、新しい 1.5 ml チューブに移す。
- ⑩ 380  $\mu$ l のエタノールを加えて 15 秒間ボルテックスした後、軽くスピンドウンする。



- ⑪ Spin Column Blue に混合液を全量 (~950  $\mu$ l) 添加する。
- ⑫ 遠心 (13,000  $\times$  g、15 秒間、室温) する。
- ⑬ ろ液を廃棄し、カラムを Collection Tube に戻す。

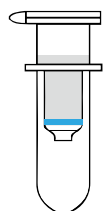


(次のページに続く)

(前のページからの続き)

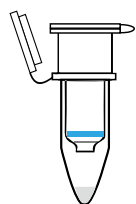


**Step 3. b) small RNA 精製 (カラム洗浄)**



- ⑭ Spin Column Blue に 500  $\mu$ l の LR Wash1 Buffer を添加する。
- ⑮ 遠心 (13,000  $\times$ g、15 秒間、室温) する。
- ⑯ ろ液を廃棄し、カラムを Collection Tube に戻す。
- ⑰ Spin Column Blue に 500  $\mu$ l の LR Wash2 Buffer を添加する。
- ⑱ 遠心 (13,000  $\times$ g、2 分間、室温) する。
- ⑲ ろ液を廃棄する。ろ液がカラムに付かないよう注意する。

**Step 3. c) small RNA 溶出**

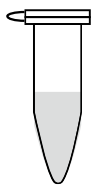
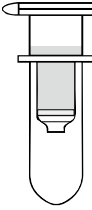


- ⑳ カラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す。
- ㉑ 50  $\mu$ l の ddWater をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置する。
- ㉒ 遠心 (13,000  $\times$ g、2 分間、室温) する。
- ㉓ small RNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブに回収される。

## ■ small RNA 精製プロトコール

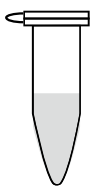
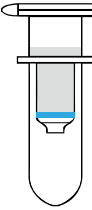
対象：血漿や血清など large RNA が含まれない液体試料

### Step 1. DNA の除去（カラムへ選択的に DNA を吸着）\*

	<p>① 1.5 ml チューブに 180 <math>\mu</math>l の液体試料、20 <math>\mu</math>l の Proteinase K、180 <math>\mu</math>l の LR Extraction Buffer を加えた後、15 秒間ボルテックスで撹拌する。</p> <p>② 37°C で 15 分間インキュベート（5 分間おきに計 3 回撹拌する）。</p> <p>③ 軽くスピンドウンしてチューブの壁面に付着している液体を落とす。</p>
	<p>④ Spin Column に③の混合液を全量（380 <math>\mu</math>l）添加する。</p> <p>⑤ 遠心（13,000 <math>\times</math> g、15 秒間、室温）する。</p> <p>* カラムに DNA と一部の large RNA が吸着する。ろ液には、small RNA と large RNA が含まれている。</p>

### Step 2. (スキップ)

### Step 3. a) small RNA 精製（カラム吸着）

	<p>⑥ ろ液を新しい 1.5 ml チューブに移す。</p> <p>⑦ 570 <math>\mu</math>l のエタノールを加えて 15 秒間ボルテックスした後、軽くスピンドウンする。</p>
	<p>⑧ Spin Column Blue に混合液を全量（950 <math>\mu</math>l）添加する。</p> <p>⑨ 遠心（13,000 <math>\times</math> g、15 秒間、室温）する。</p> <p>⑩ ろ液を廃棄し、カラムを Collection Tube に戻す。</p>



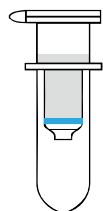
（次のページに続く）



(前のページからの続き)

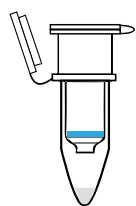


**Step 3. b) small RNA 精製 (カラム洗浄)**



- ⑪ Spin Column Blue に 500  $\mu$ l の LR Wash1 Buffer を添加する。
- ⑫ 遠心 (13,000  $\times$  g、15 秒間、室温) する。
- ⑬ ろ液を廃棄し、カラムを Collection Tube に戻す。
- ⑭ Spin Column Blue に 500  $\mu$ l の LR Wash2 Buffer を添加する。
- ⑮ 遠心 (13,000  $\times$  g、2 分間、室温) する。
- ⑯ ろ液を廃棄する。ろ液がカラムに付かないよう注意する。

**Step 3. c) small RNA 溶出**



- ⑰ カラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す。
- ⑱ 50  $\mu$ l の ddWater をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置する。
- ⑲ 遠心 (13,000  $\times$  g、2 分間、室温) する。
- ⑳ small RNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブに回収される。

## ■ スケールアップ small RNA 精製プロトコール (large RNA 除去あり)

対象 : large RNA と small RNA を含む液体試料 (350  $\mu$ l)

### 1.5 ml チューブ

- ← 350  $\mu$ l の液体試料を添加
  - ← 20  $\mu$ l の Proteinase K を添加
  - ← 350  $\mu$ l の LR Extraction Buffer を添加し、ボルテックスで 15 秒間攪拌
- 37°C で 30 分間インキュベートする間、10 分間おき計 3 回ボルテックスで攪拌  
軽くスピンドウン

### Spin Column に混合液を全量 (720 $\mu$ l) 添加する

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 15 秒間, 室温)

### ろ液を新しい 1.5 ml チューブに移す

- ← 360  $\mu$ l のエタノールを添加し、ボルテックスで 15 秒間攪拌

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 15 分間, 室温)

### 上清を新しい 2.0 ml チューブに移す

- ← 720  $\mu$ l のエタノールを添加し、ボルテックスで 15 秒間攪拌、軽くスピンドウン

### Spin Column Blue に混合液の半分量 (900 $\mu$ l) を添加する

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 15 秒間, 室温) し、ろ液を廃棄 (カラムは戻す)

- ← 混合液の残りを全量 (~900  $\mu$ l) 添加

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 15 秒間, 室温) し、ろ液を廃棄 (カラムは戻す)

- ← 500  $\mu$ l の LR Wash1 Buffer を添加

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 15 秒間, 室温) し、ろ液を廃棄 (カラムは戻す)

- ← 500  $\mu$ l の LR Wash2 Buffer を添加

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 2 分間, 室温) し、ろ液を廃棄

### カラムを新しい 1.5 ml チューブの上に移す

- ← 50  $\mu$ l の ddWater をメンブレン中央に滴下

室温で 3 分間静置

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 2 分間, 室温)

### small RNA 溶液

## ■ スケールアップ small RNA 精製プロトコール

対象：血漿や血清など large RNA が含まれない液体試料 (350  $\mu$ l)

### 1.5 ml チューブ

- ← 350  $\mu$ l の液体試料を添加
  - ← 20  $\mu$ l の Proteinase K を添加
  - ← 350  $\mu$ l の LR Extraction Buffer を添加し、ボルテックスで 15 秒間攪拌
- 37°C で 30 分間インキュベートする間、10 分間おき計 3 回ボルテックスで攪拌軽くスピンドウン

### Spin Column に混合液を全量 (720 $\mu$ l) 添加する

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 15 秒間, 室温)

### ろ液を新しい 2.0 ml チューブに移す

- ← 1,080  $\mu$ l のエタノールを添加し、ボルテックスで 15 秒間攪拌
- 軽くスピンドウン

### Spin Column Blue に混合液の半分量 (900 $\mu$ l) を添加する

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 15 秒間, 室温) し、ろ液を廃棄 (カラムは戻す)

- ← 混合液の残りを全量 (~900  $\mu$ l) 添加

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 15 秒間, 室温) し、ろ液を廃棄 (カラムは戻す)

- ← 500  $\mu$ l の LR Wash1 Buffer を添加

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 15 秒間, 室温) し、ろ液を廃棄 (カラムは戻す)

- ← 500  $\mu$ l の LR Wash2 Buffer を添加

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 2 分間, 室温) し、ろ液を廃棄

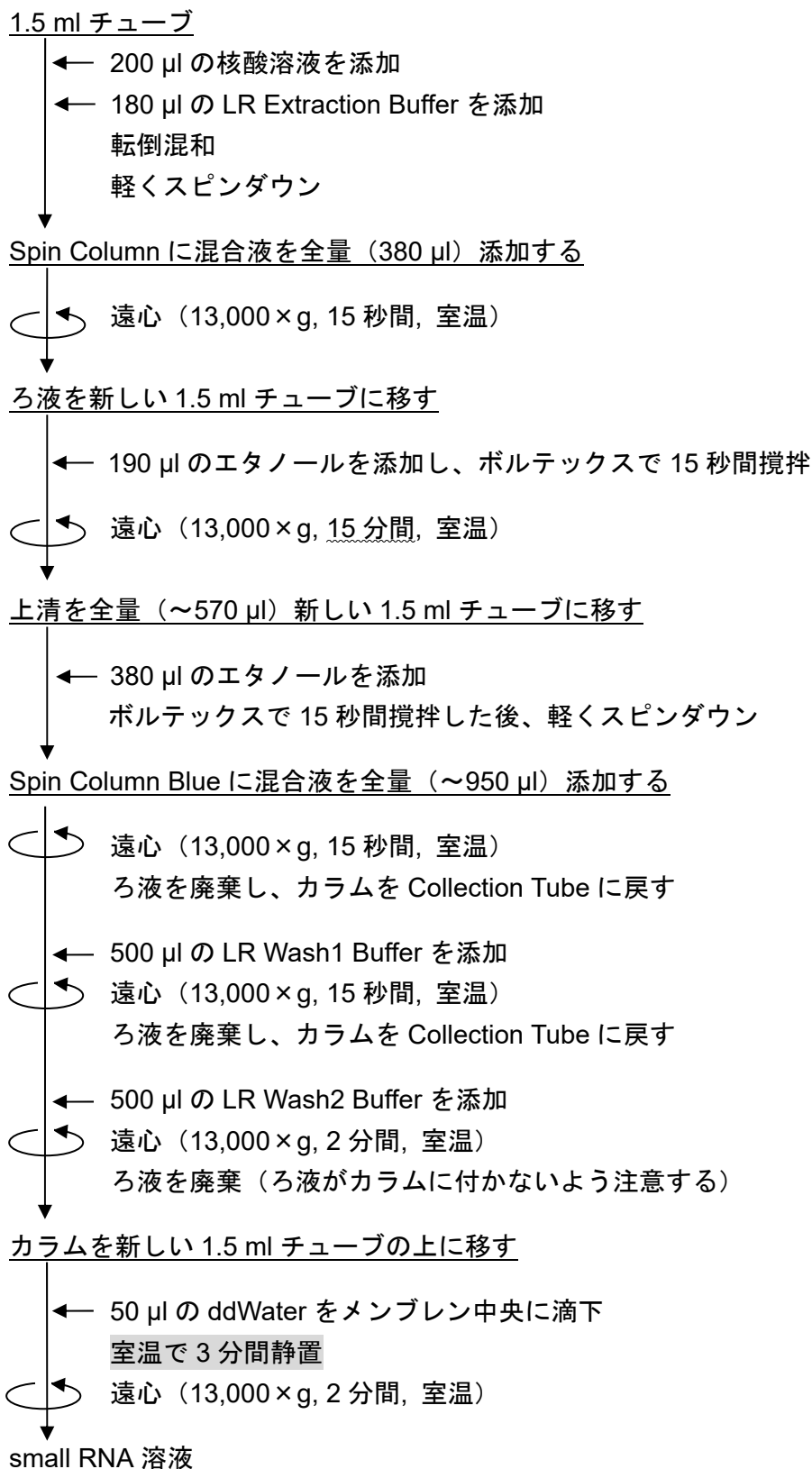
### カラムを新しい 1.5 ml チューブの上に移す

- ← 50  $\mu$ l の ddWater をメンブレン中央に滴下
- 室温で 3 分間静置

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 2 分間, 室温)

### small RNA 溶液

## ■ 200 $\mu$ l 核酸溶液からの small RNA 濃縮プロトコール



## ■ 370 $\mu$ l 核酸溶液からの small RNA 濃縮プロトコール (スケールアップ)

### 1.5 ml チューブ

- ← 370  $\mu$ l の核酸溶液を添加
- ← 350  $\mu$ l の LR Extraction Buffer を添加し、転倒混和  
軽くスピンドウン

### Spin Column に混合液を全量 (720 $\mu$ l) 添加する

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 15 秒間, 室温)

### ろ液を新しい 1.5 ml チューブに移す

- ← 360  $\mu$ l のエタノールを添加し、ボルテックスで 15 秒間攪拌

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 15 分間, 室温)

### 上清を全量 (~1,080 $\mu$ l) 新しい 2.0 ml チューブに移す

- ← 720  $\mu$ l のエタノールを添加し、ボルテックスで 15 秒間攪拌、軽くスピンドウン

### Spin Column Blue に混合液の半分量 (900 $\mu$ l) を添加する

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 15 秒間, 室温) し、ろ液を廃棄 (カラムは戻す)

- ← 混合液の残りを全量 (~900  $\mu$ l) 添加

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 15 秒間, 室温) し、ろ液を廃棄 (カラムは戻す)

- ← 500  $\mu$ l の LR Wash1 Buffer を添加

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 15 秒間, 室温) し、ろ液を廃棄 (カラムは戻す)

- ← 500  $\mu$ l の LR Wash2 Buffer を添加

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 2 分間, 室温) し、ろ液を廃棄

### カラムを新しい 1.5 ml チューブの上に移す

- ← 50  $\mu$ l の ddWater をメンブレン中央に滴下

室温で 3 分間静置

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 2 分間, 室温)

### small RNA 溶液

## ■ オプションプロトコール (DNA 回収)

180  $\mu$ l (または 350  $\mu$ l) 液体試料からの DNA 回収

### 1.5 ml チューブ

- ← 180  $\mu$ l (または 350  $\mu$ l) の液体試料を添加
  - ← 20  $\mu$ l の Proteinase K を添加
  - ← 180  $\mu$ l (または 350  $\mu$ l) の LR Extraction Buffer を添加
- ボルテックスで 15 秒間攪拌  
37°C で 15 分間 (または 30 分間) インキュベートする間、  
5 分間 (または 10 分間) おきに計 3 回ボルテックス  
軽くスピンドウン

### Spin Column に混合液を全量 (380 $\mu$ l、または 720 $\mu$ l) 添加する

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 15 秒間, 室温)

ろ液 (small RNA が含まれている) から small RNA を精製する場合、ろ液を別のチューブに移して、small RNA 精製プロトコール⑥へ進む。

カラム (DNA が吸着している) を Collection Tube に戻す

- ← 500  $\mu$ l の LR Wash1 Buffer を添加

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 15 秒間, 室温)
- ろ液を廃棄し、カラムを Collection Tube に戻す

- ← 500  $\mu$ l の LR Wash2 Buffer を添加

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 2 分間, 室温)
- ろ液を廃棄 (ろ液がカラムに付かないよう注意する)

### カラムを新しい 1.5 ml チューブの上に移す

- ← 50  $\mu$ l の ddWater をメンブレン中央に滴下
- 室温で 3 分間静置

- ← 遠心 (13,000  $\times$  g, 2 分間, 室温)

DNA 溶液

## V トラブルシューティング

トラブル	予想される原因	対 策
低収量	抽出前に、試料中の RNA が分解している。	<ul style="list-style-type: none"> <li>新鮮な試料を用いる。</li> <li>試料採取後、すぐに RNA を抽出するか、速やかに凍結させる。</li> <li>凍結・融解を繰り返した試料は RNA 抽出に使用しない。</li> </ul>
	RNase がコンタミしている。	<ul style="list-style-type: none"> <li>RNase フリーのチューブを使用する。</li> <li>RNase フリーの試薬を使用する。</li> <li>フィルター付きピペットチップを使用する。</li> </ul>
	試料の溶解が不十分である。	<ul style="list-style-type: none"> <li>各プロトコールの Step 1.①で、試料と Proteinase K と LR Extraction Buffer を確実に混和させる。</li> </ul>
	RNA がチューブに吸着している。	<ul style="list-style-type: none"> <li>核酸低吸着チューブを使用する。</li> </ul>
	試料中の RNA 量が少ない。	<ul style="list-style-type: none"> <li>濃縮プロトコールを試す。</li> </ul>
DNA の混入	試料中の DNA 量が多い。	<ul style="list-style-type: none"> <li>精製して得られた RNA 溶液の DNase 処理を行う。</li> <li>濃縮プロトコールを試す。</li> </ul>
	DNA と RNA が複合体を形成している。	<ul style="list-style-type: none"> <li>プロトコールの Step 1. ②の 37°C15 分間のインキュベートの後で、80°Cで 5 分間、氷冷 5 分間の反応を追加する。</li> </ul>

### 【関連製品】

- ・ Distilled Water, Deionized, Sterile (ニッポンジーン Code No. 316-90101, 318-90105)
- ・ DNase I (RNase free) (ニッポンジーン Code No. 314-08071)
- ・ RNase Inhibitor (ニッポンジーン Code No. 315-08121)
- ・ Collection Tube (ニッポンジーン Code No. 319-08141, 315-08143)

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 <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。