

植物組織からの RNA 抽出キット

ISOSPIN Plant RNA

マニュアル（第 5 版）

Code No. 310-08171

NIPPON GENE CO., LTD.

I 製品説明

ISOSPIN Plant RNA (アイソスピン プラント アールエヌエー) は、植物組織から 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、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 (植物用)	30 ml × 1 本	
PT Binding Buffer (植物用)	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 (植物用)、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いしないで下さい。
- ・ 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。
- ・ 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://nippongene.com/siyaku/list.html>）にてご覧になれます。

V プロトコール

<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^{注)}
- ・ 1.5 ml マイクロチューブ^{注)}
- ・ 遠心分離機（4℃）

注) 効率よく組織を破碎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ください。

<必要に応じて別途用意するもの>

- ・ 液体窒素
- ・ Assist Buffer for ISOSPIN Plant RNA（Code No.315-08501）*オプションプロトコール用

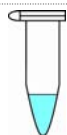
<標準プロトコール>

- ① 20 - 100 mg の新鮮な植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 (植物用) を入れておく。

↓



- ② 試料に 600 μ l の PT Extraction Buffer (植物用) を加え、直ちにペッスルですり潰す。試料が液中で浮遊する場合、スピンド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。
- ・ゲノムの断片化により DNA の混入リスクが高くなるためボルテックスは行わない。

- ③ 遠心 (13,000 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ C) し、上清を新しいマイクロチューブに回収する。

注)

- ・種子などの油分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採取しないようにする。
- ・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、4 $^{\circ}$ C) し、上清を回収する。

- ④ 上清に等量の PT Binding Buffer (植物用) 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、PT Binding Buffer (植物用) 550 μ l 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、4 $^{\circ}$ C) 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。

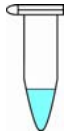
↓



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

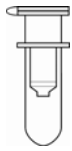
- ⑨ 遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C) する。

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

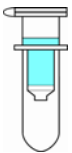


- ⑪ 1.5 ml マイクロチューブに以下の試薬を加えて、DNase I 溶液 100 μ l を調製する（用時調製）。

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



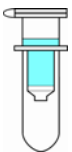
- ⑫ 100 μ l の DNase I 溶液を Spin Column に添加し、静置（15 分間、室温）する。



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

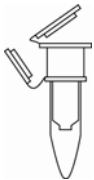
- ⑭ 遠心（13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C）する。

- 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、4 $^{\circ}$ C）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、4 $^{\circ}$ C）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。

<簡易・標準プロトコール>

植物試料 (20 - 100 mg)

← 600 μ l の PT Extraction Buffer (植物用) を添加
PT Extraction Buffer (植物用) 中でペッスルを用いて試料をよくすり潰す
遠心 (13,000 \times g, 10 分間, 4 $^{\circ}$ C)

上清を回収

← 上清と等量の PT Binding Buffer (植物用) 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, 4 $^{\circ}$ C)
ろ液を捨てる

← 残りの混合液を添加

遠心 (13,000 \times g, 1 分間, 4 $^{\circ}$ C)
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, 4 $^{\circ}$ C)
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 \times 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, 4 $^{\circ}$ C)
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, 4 $^{\circ}$ C)

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, 4 $^{\circ}$ C)

RNA 溶液

<オプションプロトコール>

標準プロトコールでは RNA 抽出が困難な植物試料の場合、別売りの「Assist Buffer for ISOSPIN Plant RNA」(Code No. 315-08501) を添加するオプションプロトコールをお試しください。

- ① 500 μ l の PT Extraction Buffer (植物用) に 60 μ l の Assist Buffer 1 と 40 μ l の Assist Buffer 2 を加えて混和し、600 μ l の抽出液を調製する。

注)

- ・「Assist Buffer for ISOSPIN Plant RNA」の Assist Buffer 1 と Assist Buffer 2 は、混合した状態で保存できません (再溶解が困難な析出物を生じる場合があります)。
- ・調製した抽出液を長期間放置せず、使用する直前に調製するようにしてください。

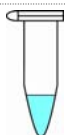
↓

- ② 5 - 100 mg の新鮮な植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)

- ・オプションプロトコールでは少量の植物試料から検討を始め、段階的に植物試料の量を増やしてお試しください。
- ・夾雑物が多い試料は洗浄等の前処理を行うと有効な場合がある。
前処理例：植物試料に 300 μ l の TE を加え、1 分以内に軽くペッスルですり潰し、遠心 (13,000 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ C) した後、上清を取り除く。
- ・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③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①の抽出液を入れておく。

↓



- ③ 試料に①の抽出液を 600 μ l 加え、直ちにペッスルですり潰す。試料が液中で浮遊する場合、スピンド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。
- ・ゲノムの断片化により DNA の混入リスクが高くなるためボルテックスは行わない。

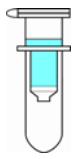
- ④ 遠心 (13,000 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ C) し、上清を新しいマイクロチューブに回収する。

- ⑤ 回収した上清を再度、遠心 (13,000 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ C) し、上清を新しいマイクロチューブに回収する。

- ⑥ 上清に等量の PT Binding Buffer (植物用) を加えて、均質になるまで数回転倒混和する。軽くスピンドウンする。

例) 上清 550 μ l の場合は、PT Binding Buffer (植物用) 550 μ l を添加する。

- ⑦ 混合溶液を遠心（13,000×g、30 秒間、4℃）し、上清を新しいマイクロチューブに回収する。



- ⑧ メンブレンに RNA を吸着させるため、600 μl の⑦の上清を Spin Column に添加し、遠心（13,000×g、1 分間、4℃）する。

注）遠心後、スピncラム上に溶液が残っている場合は、再度、遠心（13,000×g、1 分間、4℃）する（それでも溶液が残る場合は、抽出する植物試料の量を減らす）。

- ⑨ 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。

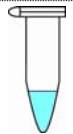
- ⑩ ⑦の残りの上清を Spin Column に添加し、⑧、⑨を繰り返す。



- ⑪ 500 μl の PT Wash1 Buffer を Spin Column に添加する。

- ⑫ 遠心（13,000×g、1 分間、4℃）する。

- ⑬ ろ液を捨てて、カラムを Collection Tube に再度戻す。



- ⑭ 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 μl を調製する（用時調製）。

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



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

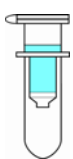
注）抽出する植物試料が多いとき、DNase I 溶液が浸透しない場合がある。その場合は、抽出する植物試料の量を減らす。



- ⑯ 300 μl の PT Wash1 Buffer を Spin Column に添加する。

- ⑰ 遠心（13,000×g、1 分間、4℃）する。

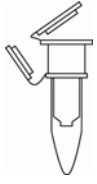
- ⑱ ろ液を捨てて、カラムを Collection Tube に再度戻す。



- ⑲ 洗浄のため 600 μl の PT Wash2 Buffer を Spin Column に添加する。

- ⑳ 遠心（13,000×g、2 分間、4℃）する。ろ液と Collection Tube を捨てる。

↓



- ⑳ Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に乗せる。
- ㉑ 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。
- ㉒ 遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C) する。
- ㉓ RNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される。

<簡易・オプションプロトコール>

別売りの **Assist Buffer for ISOSPIN Plant RNA** を用意する。

抽出液（用時調製）全量 600 μ l

- PT Extraction Buffer (植物用) 500 μ l
- **Assist Buffer 1** 60 μ l
- **Assist Buffer 2** 40 μ l

植物試料 (5 - 100 mg)

← 600 μ l の調製した抽出液を添加 ←-----
 抽出液中でペッスルを用いて試料をよくすり潰す
 遠心 (13,000 \times g, 10 分間, 4 $^{\circ}$ C)

上清を回収

遠心 (13,000 \times g, 10 分間, 4 $^{\circ}$ C)

上清を回収

← 上清と等量の PT Binding Buffer (植物用) を添加し、均質になるまで転倒混和
 遠心 (13,000 \times g, 30 秒間, 4 $^{\circ}$ C)

上清 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, 4 $^{\circ}$ C)
 ろ液を捨てる

← 残りの混合液を添加 ←-----
 遠心 (13,000 \times g, 1 分間, 4 $^{\circ}$ C)
 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, 4 $^{\circ}$ C)
 ろ液を捨てる

DNase I 溶液（用時調製）全量 100 μ l

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

← 100 μ l の DNase I 溶液を添加 ←-----
 室温静置 15 分間

← 300 μ l の PT Wash1 Buffer を添加
 遠心 (13,000 \times g, 1 分間, 4 $^{\circ}$ C)
 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, 4 $^{\circ}$ C)

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, 4 $^{\circ}$ C)

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または溶解が不十分だと、PT Extraction Buffer (植物用) に触れていない細胞内部での 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 PT Extraction Buffer (植物用) 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 は必要ありません)。
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	PT Extraction Buffer (植物用) に対してサンプルが多すぎると溶液の粘性が増し夾雑物の沈殿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 PT Extraction Buffer (植物用) の量を 2 倍に増やす。
夾雑物の混入	上清を再度、遠心 ($13,000 \times g$ 、10 分間、 4°C) 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	別売りの「Assist Buffer for ISOSPIN Plant RNA」を用いたオプションプロトコールを試してみる。

VII データ

<製品性能>

RNA 吸着容量	100 μ g
カラム容量	900 μ l

<RNA の収量の目安> 標準プロトコール

試料	収量の目安
シロイヌナズナ(芽生え)	0.1 μ g RNA/mg tissue
イネ(芽生え)	0.2 μ g RNA/mg tissue
ホウレンソウ (葉)	0.5 μ g RNA/mg tissue
ブロッコリー (芽生え)	1.0 μ g RNA/mg tissue
キャベツ (種子)	1.3 μ g RNA/mg tissue
キャベツ (芽生え)	1.4 μ g RNA/mg tissue
キャベツ (葉)	0.1 μ g RNA/mg tissue
タケ (葉)	0.3 μ g RNA/mg tissue
チューリップ (球根)	0.2 μ g RNA/mg tissue
イチゴ(果実)	15 ng RNA/mg tissue
コショウラン(葉)	15 ng RNA/mg tissue
ミカン(砂じょう)	10 ng RNA/mg tissue
キウイ(果実)	50 ng RNA/mg tissue
キウイ(種子)	80 ng RNA/mg tissue
ジャガイモ(根茎)	0.1 μ g RNA/mg tissue
ネギ(葉)	0.1 μ g RNA/mg tissue
トマト(果肉)	10 ng RNA/mg tissue
トマト(種子)	40 ng RNA/mg tissue
チャ(葉)	0.4 μ g RNA/mg tissue
キク(葉)	0.2 μ g RNA/mg tissue

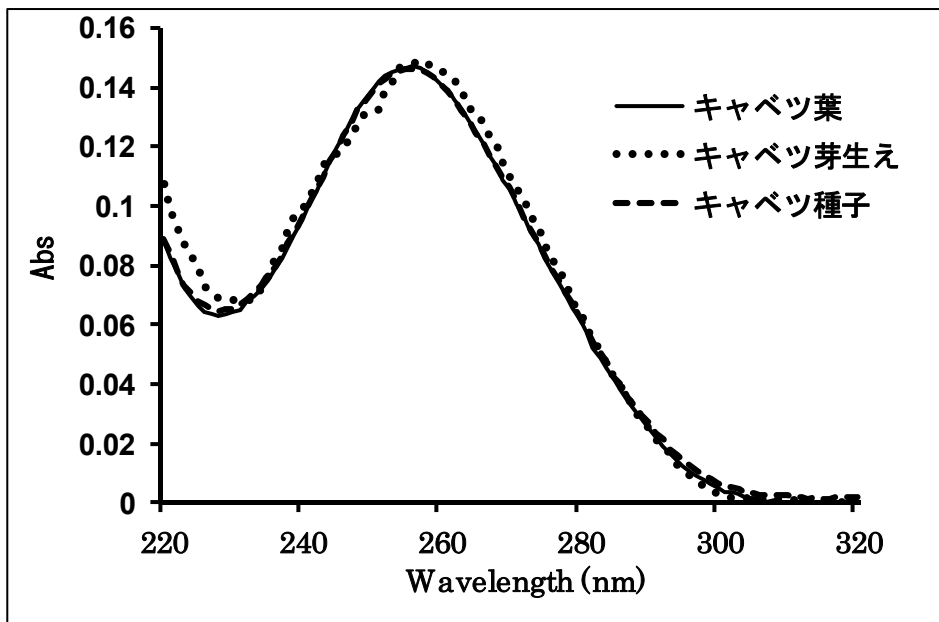
<RNAの収量の目安> オプションプロトコール

試料	収量の目安
マツ(葉) ^{††}	0.1 µg RNA/mg tissue
バラ(葉) ^{††}	50 ng RNA/mg tissue
バラ(花弁) ^{††}	80 ng RNA/mg tissue
ツバキ(葉) ^{††}	70 ng RNA/mg tissue
ミカン(外皮) ^{††}	80 ng RNA/mg tissue
カキ(果肉) ^{††}	30 ng RNA/mg tissue
ブドウ(果肉) ^{††}	10 ng RNA/mg tissue
ブドウ(外皮) ^{††}	50 ng RNA/mg tissue
バナナ(果肉) ^{††}	15 ng RNA/mg tissue
コショウラン(葉) ^{††}	20 ng RNA/mg tissue
シクラメン(葉) ^{††}	0.1 µg RNA/mg tissue
イチゴ(葉) ^{††}	0.1 µg RNA/mg tissue
ジャガイモ(根茎)	0.1 µg RNA/mg tissue
ネギ(葉)	0.1 µg RNA/mg tissue
トマト(果肉)	25 ng RNA/mg tissue
トマト(種子)	60 ng RNA/mg tissue
チャ(葉)	0.6 µg RNA/mg tissue

^{††} : 標準プロトコールでは抽出が極めて困難な植物試料

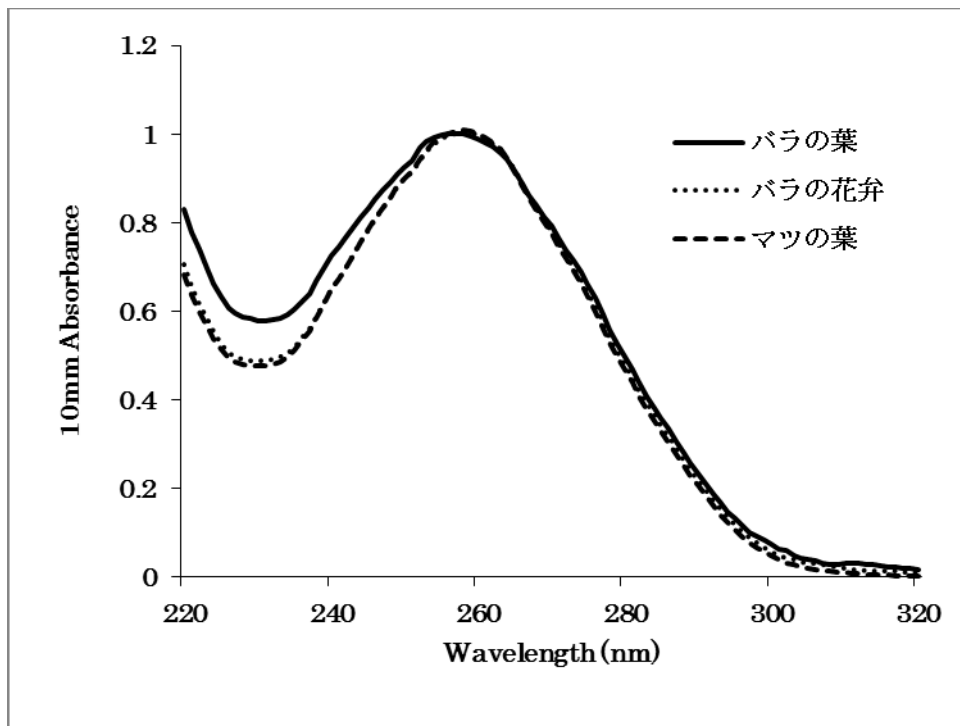
<RNAの吸光スペクトル> 標準プロトコール

各試料から抽出した RNA 溶液を濃度 6 ng/μl になるように調整して DU 800 Spectrophotometer で測定した。



<RNAの吸光スペクトル> オプションプロトコール

各試料から抽出した RNA 溶液を濃度 40 ng/μl になるように調整して NanoDrop2000 で測定した。



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
315-08501	Assist Buffer for ISOSPIN Plant RNA	50 回用

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。