

ウイルス二本鎖 RNA 精製キット（植物・真菌用）

アイソヴァイラス

ISOVIRUS

マニュアル（第 3 版）

Code No. 310-08811

NIPPON GENE CO., LTD.

I 製品説明

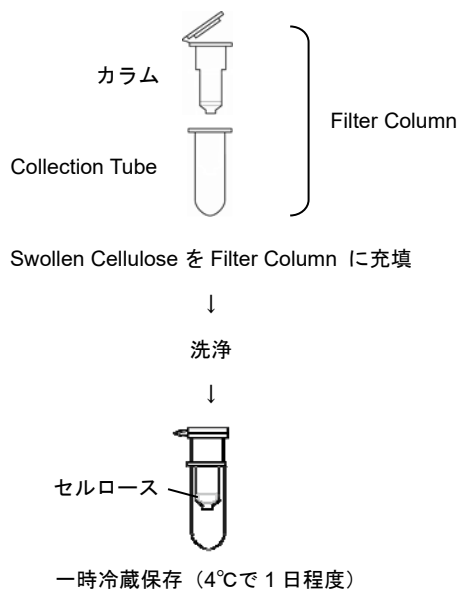
ISOVIRUS（アイソウイルス）は、植物や真菌試料から選択的にウイルス等に由来する長鎖の二本鎖 RNA（dsRNA）を抽出・精製するためのキットです。

本キットは、dsRNA がセルロース担体へ特異的に吸着する基本原理を利用しており、得られた dsRNA は、RNA シーケンス等のアプリケーションに使用可能です。

<実験の流れ>

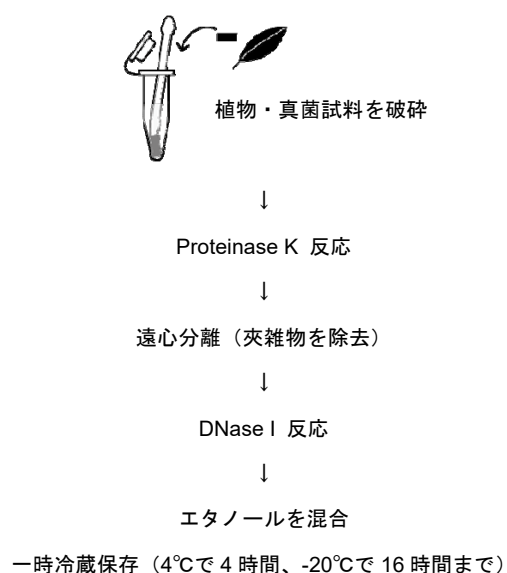
ステップ A：セルロース充填カラムの調製

（操作時間：約 20 分間）



ステップ B：植物・真菌試料からの総 RNA 抽出

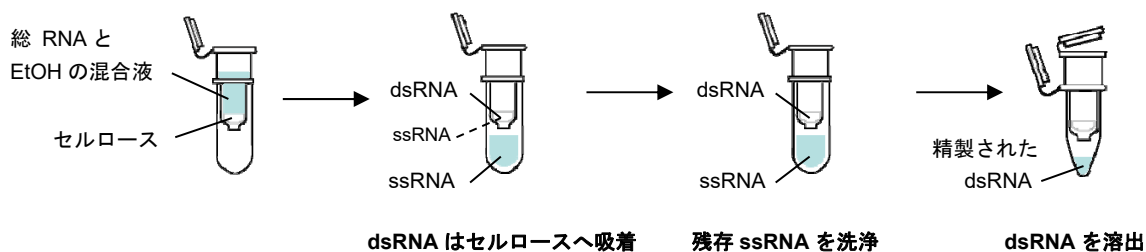
（操作時間：約 60 分間）



<----- オプション B-1：本キット以外の核酸抽出試薬を使用する場合

<----- オプション B-2：dsRNA 溶液を再精製する場合

ステップ C：dsRNA の単離・精製（操作時間：約 70 分間）



II キット内容

キット構成品	容量 (20 回用)	保存温度	備考
Proteinase K	500 μ l × 1 本	−20℃	
DNase I (RNase free)	1,000 units × 1 本	−20℃	
VR Extraction Buffer PF1	10 ml × 1 本	室温	※1
VR Extraction Buffer 2	2 ml × 1 本	室温	※1
2 × STE Buffer	7 ml × 1 本	室温	
Filter Column	20 本 × 1 袋	室温	※2
Swollen Cellulose	10 本 × 2 箱	室温	※3
VR Wash Buffer	40 ml × 2 本	室温	※4
VR Elution Buffer	4 ml × 1 本	室温	

(注意)

- ※1 VR Extraction Buffer PF1、VR Extraction Buffer 2 は低温になると成分が析出する場合があります。析出物が生じた場合は、65℃程度に加熱し、振り混ぜて析出物を完全に溶解してからご使用下さい。
- ※2 Filter Column は、本キット専用カラムと Collection Tube からなります。
- ※3 Swollen Cellulose にはエタノールが含まれています。
- ※4 VR Wash 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。

III 使用上の注意

- ・ 本キットは、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。
- ・ 本キットの取扱いは、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）は、ニッポンジーン WEB サイト（www.nippongene.com）よりご覧になれます。

IV プロトコール

<Contents>

詳細プロトコール

ステップ A :	セルロース充填カラムの調製	p. 5
ステップ B :	植物・真菌試料からの総 RNA 抽出	p. 6
ステップ C :	dsRNA の精製	
	・ セルロースへの dsRNA 吸着	p. 7
	・ カラムの洗浄	p. 8
	・ dsRNA の溶出	p. 9
オプション		
B-1 :	本キット以外の核酸抽出試薬を使用する場合	p. 10
B-2 :	dsRNA 溶液を再精製する場合	p. 11

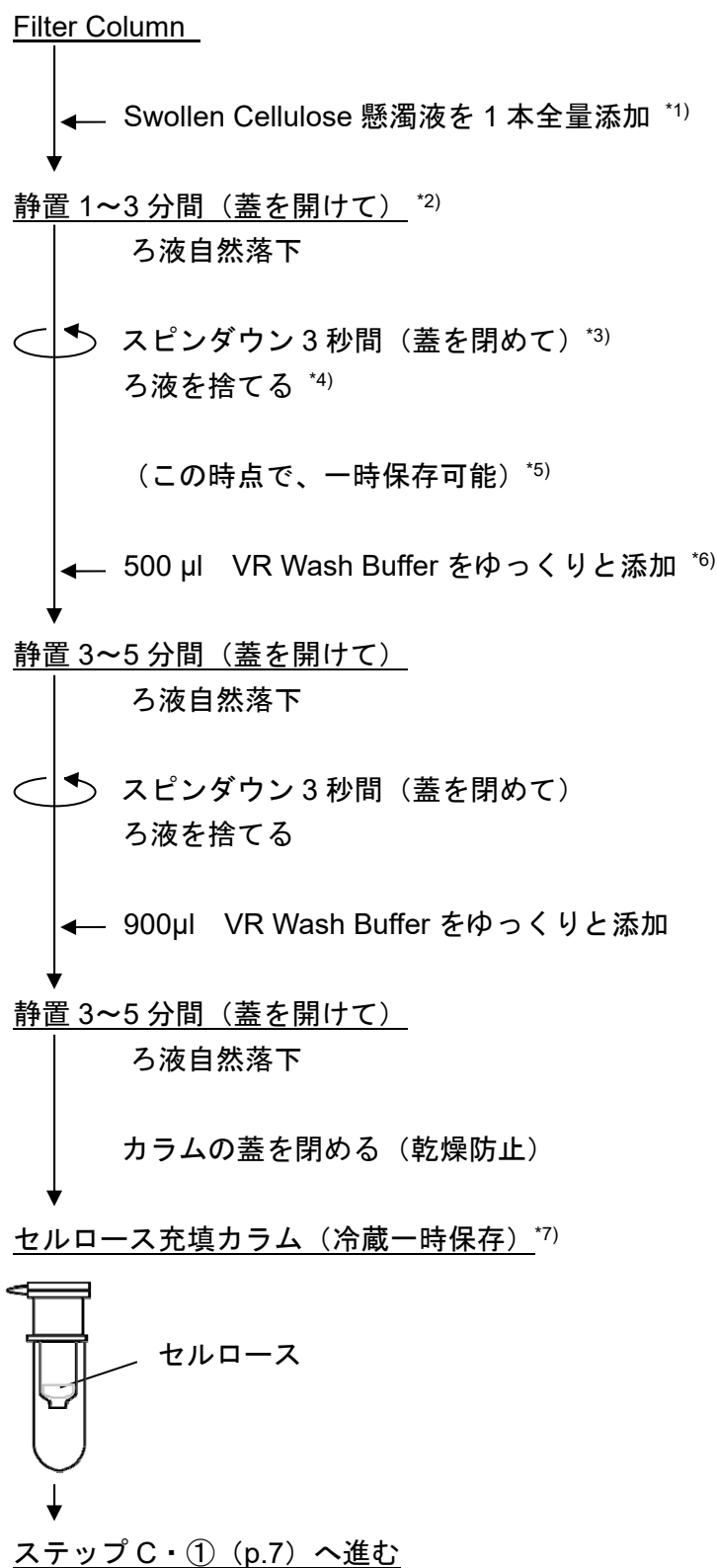
<キット以外に必要なもの>

- ・ 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
- ・ 卓上低速遠心機
- ・ 低温遠心分離機 (13,000 × g、4℃)
- ・ 恒温槽 (65℃)
- ・ 恒温槽 (37℃)
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 氷
- ・ エタノール (100~95% Ethanol)
- ・ RNase フリー水 (ニッポンジーン Code No. 316-90101, 等)

<必要に応じて用意するもの>

- ・ 液体窒素 (ステップ B で凍結粉碎試料を使用する場合)

ステップ A : セルロース充填カラムの調製



^{*1)}

Swollen Cellulose をボルテックスミキサー等でよく懸濁してからデカンテーション等で Filter Column に 1 本全量 (約 800 μ l) アプライする。液残りが気になる場合はハサミで先端を切ったチップを用いる。

^{*2)}

Filter Column の蓋を閉めきると、ろ液が落下しない。空気が入るように開けておく。

^{*3)}

カラムの蓋を閉めてからスピンドウを行う。

^{*4)}

カラムを取り外し、Collection Tube の中に集まったろ液を捨てる。カラムを再度 Collection Tube に戻してから次の操作に進む。(以降の「ろ液を捨てる」でも同様に行う)

^{*5)}

少なくとも 1 週間は冷蔵で保存可能。(カラムの蓋は閉める)

^{*6)}

充填した Swollen Cellulose の表面を乱さないようにする。

^{*7)}

乾燥しすぎないようにカラムの蓋を閉めた状態で 1 日程度は冷蔵で一時保管可能。

ステップ B：植物・真菌試料からの総 RNA 抽出

植物・真菌試料（100 mg 以下）^{*8)}

← 500 μ l VR Extraction Buffer PF1
ペッスルを用いて試料をよくすり潰す^{*9)}

← 20 μ l Proteinase K
ボルテックスミキサーで混和

65°Cで 15 分間加温（5 分毎混和）^{*10)}

← 100 μ l VR Extraction Buffer 2
30 秒間以上ボルテックスミキサーで混和

氷上で 5 分間静置

遠心（13,000 $\times$ g, 10 分間, 4°C）

上清を回収（回収量を記録する）^{*11)}

← 30 units DNase I (RNase free)
ボルテックスミキサーで混和

37°Cで 15 分間加温（5 分毎混和）

← 1 $\times$ STE（水で 2 倍希釈した 2 $\times$ STE Buffer）
を添加して総液量を 700 μ l にする^{*12)}

← 133 μ l のエタノールを添加し終濃度 16%にする
ボルテックスミキサーで混和

氷上で 5 分間静置

遠心（13,000 $\times$ g, 1 分間, 4°C）

上清（16%EtOH 混合液）を回収
蓋を閉める（冷蔵一時保存）^{*13)}

ステップ C・①（p.7）へ進む

^{*8)}

植物または真菌試料を 1.5 ml マイクロチューブの中に採取する。新鮮試料または液体窒素中で凍結粉碎した試料を使用する。

^{*9)}

チューブの形状に応じたペッスルを使用する。不十分なホモジナイズは低収量につながる。

^{*10)}

インキュベートの間、5 分おきにボルテックスミキサーで混和する。

^{*11)}

沈殿物や液表面の析出物を取らないように、上清を新しいマイクロチューブに回収する。この時、回収した上清量を記録しておく（上清は、200~700 μ l 程度回収できる）。回収する液量が少ない場合は再度遠心する。

^{*12)}

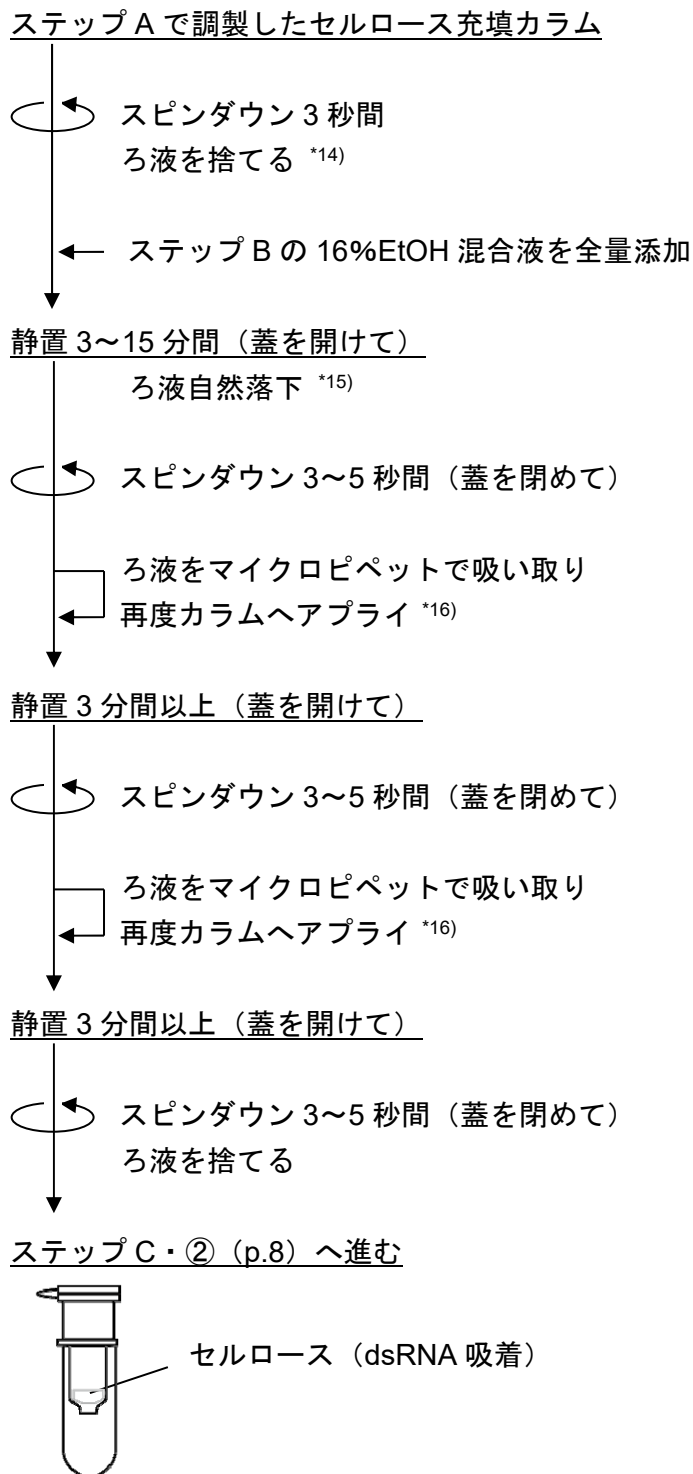
例：回収液量が 300 μ l の場合、200 μ l の水と 200 μ l の 2 $\times$ STE Buffer を加えて総液量を 700 μ l にする。

^{*13)}

新しいマイクロチューブに回収した上清は、4°Cで 4 時間、もしくは -20°Cで 16 時間の一時保管可能。（エタノールの蒸発を防ぐため、蓋をよく閉めておく）

ステップ C : dsRNA の精製 (①セルロースへの dsRNA 吸着)

ステップ B で回収した上清（またはオプション B で調製した溶液）には、dsRNA と残存一本鎖 RNA と残存 DNA が含まれている。このステップで、dsRNA はセルロース担体へ特異的に吸着する。



^{*14)}

カラムを取り外し、Collection Tube の中に集まったろ液を捨てる。カラムを再度 Collection Tube に戻してから次の操作に進む。（以降の「ろ液を捨てる」でも同様に行う）

^{*15)}

試料に含まれる RNA や夾雑物の濃度に依存して自然落下にかかる時間は異なる（目安：3~15 分間）。15 分以上かかる場合はスピンドウンに進む。

気泡の発生などによりセルロースが浮いてくる場合は、カラムの蓋を 2~3 回開け閉めするか、指ではじく、または机の上にチューブを軽く打ち付けてカラムの中のセルロースを沈降させる。

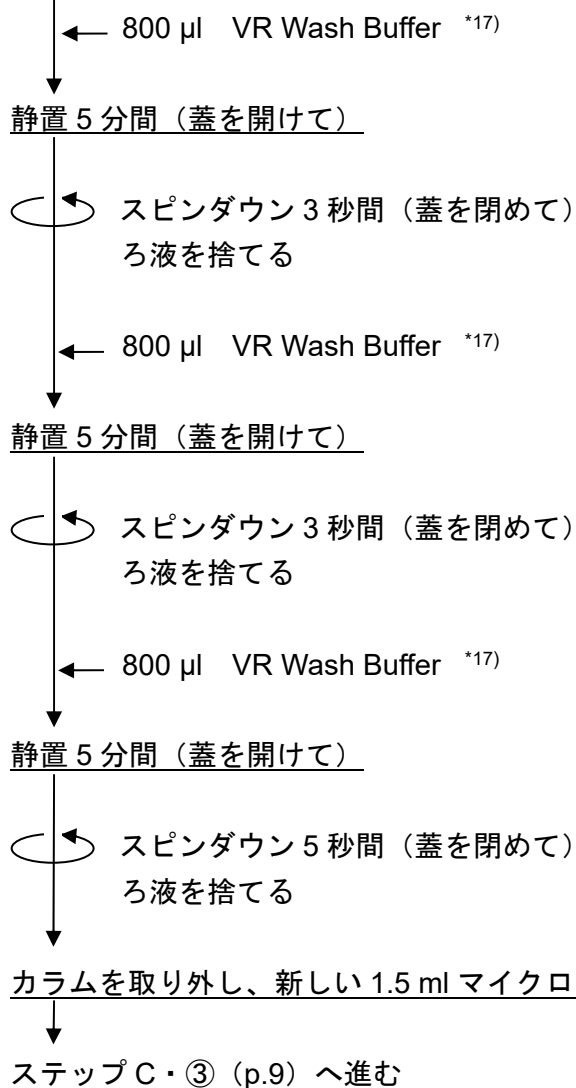
^{*16)}

カラムを取り外し、Collection Tube の中に集まったろ液をマイクロピペットで吸取って回収する。Collection Tube の上にカラムを再度戻してから回収したろ液をアプライする。

ステップ C : dsRNA の精製 (②カラムの洗浄)

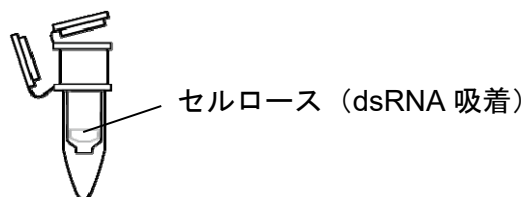
VR Wash Buffer による 3 回の洗浄で、セルロース充填カラムに残存している一本鎖 RNA や残存 DNA を洗い流す。

ステップ C・① (p.7) からの続き



^{*17)}

VR Wash Buffer をアプライした時、気泡の発生などによりセルロースが浮いてくる場合は、カラムの蓋を 2~3 回開け閉めするか、指ではじく、または机の上にチューブを軽く打ち付けてカラムの中のセルロースを沈降させる。

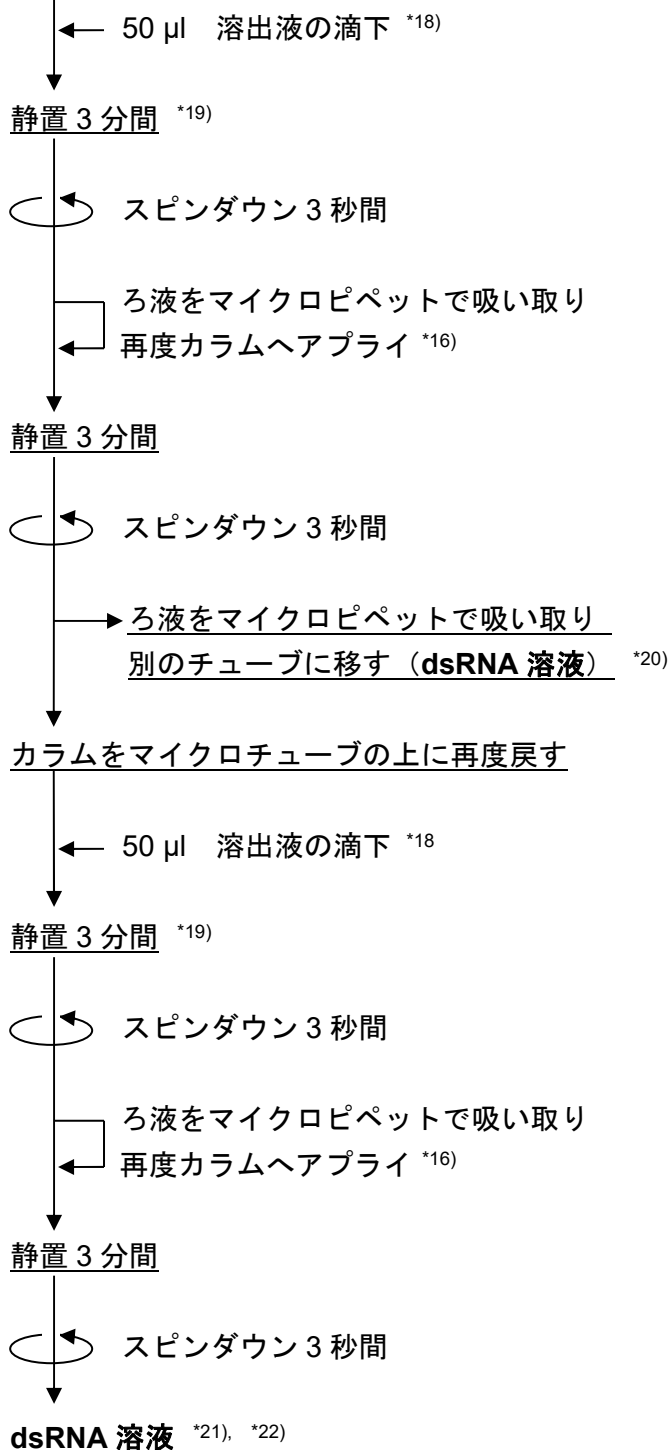


ステップ C : dsRNA の精製 (③ dsRNA の溶出)

セルロース担体に吸着している dsRNA を溶出する。

溶出液として、RNase フリー水 (ニッポンジーン Code No. 316-90101、等) か、VR Elution Buffer (1 mM EDTA を含む弱アルカリ性溶液) が使用できる。

ステップ C・② (p.8) からの続き



*18)

溶出液をセルロース全体に行きわたるように滴下する。

高濃度の dsRNA 溶液を得たい場合、溶出液の滴下量を 25 µl まで減らせる。

*19)

静置中、蓋は開いていても、閉まっていなくても、どちらでも構わない。

*20)

精製された dsRNA 溶液がマイクロチューブの中にろ液として回収される。-20℃で保管可能。

*21)

二回目の溶出操作で得られた dsRNA 溶液は、上記 *20) の dsRNA 溶液より核酸濃度は比較的薄くなる。得られた二つのろ液を混ぜて総量 100 µl の精製 dsRNA 溶液にする (あるいは、別々に保存してもよい)。

*22)

VR Elution Buffer で溶出した dsRNA 溶液の脱塩・バッファー交換は、ISOSPIN PCR Product (Code No. 315-08001) を用いた精製で可能。

オプション B-1：本キット以外の核酸抽出試薬を使用する場合

本キット以外の核酸抽出試薬*を用いて植物や真菌試料から抽出した総 RNA 溶液あるいは総核酸溶液から、dsRNA を精製できます。

* ISOGEN (Code No. 311-02501)、ISOSPIN Plant RNA (Code No. 310-08171) 等

総核酸溶液 (350 µl 以下)

- ← 総量 350 µl になるよう水で希釈
- ← 350 µl の 2×STE Buffer を加え、総量 700 µl にする

↓
65°C で 15 分間加温 (5 分毎ボルテックスミキサーで混和)

↓
氷上で 3 分間静置

ボルテックスミキサーで混和

- ← 133 µl のエタノールを添加し、終濃度 16% にする
- ボルテックスミキサーで混和

↓
16%EtOH 混合液

蓋を閉める (4°C で 4 時間、もしくは -20°C で 16 時間の一時保管可能)

↓
ステップ C・① (p.7) へ進む (以降の操作は同じ)

オプション B-2 : dsRNA 溶液を再精製する場合

ステップ C で精製した dsRNA 溶液が低純度の場合、再精製することができます。

dsRNA 溶液 (350 μ l 以下)

- ← 総量 350 μ l になるよう水で希釈
- ← 350 μ l の 2 $\times$ STE Buffer を加え、総量 700 μ l にする
- ← 133 μ l のエタノールを添加し、終濃度 16%にする
ボルテックスミキサーで混和

↓
16%EtOH 混合液

蓋を閉める (4°Cで 4 時間、もしくは - 20°Cで 16 時間の一時保管可能)

↓
ステップ C・① (p.7) へ進む

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	試料の粉碎が不十分	VR Extraction Buffer PF1 中での試料のホモジナイゼーションまたは溶解を十分に行う。
	試料量が多すぎる	試料量を半分に減らす。
	エタノールの添加量が不足している	エタノールを加える前の上清の量を正確に測定し、終濃度 16%になるようエタノールを添加する。
	RNase フリー水が中性でない (pH 値が 5.0 以下)	- 溶出効率は pH 値に依存する。溶出に RNase フリー水を使用する場合には pH が中性であることを確認する。 - VR Elution Buffer で溶出する。
低純度	試料量が多すぎて抽出溶液の粘性が増し、遠心分離による夾雑物の除去が不十分	試料量を半分に減らす。
	夾雑物の混入	エタノールを添加する前の上清を再度、遠心 (13,000 x g、10 分間、4℃) して、できるだけ油分や不溶物を除去する。
自然落下しない	粘性が高い、夾雑物が多い	- 試料量を半分に減らす等、上記の対策を行う。 - 回収した上清が少ない場合、*12)を参照して 1×STE で希釈する。 - ステップ C の*15)を参照する。
一本鎖 RNA の混入	高次構造をとりやすい一本鎖 RNA を多く含む試料である	アプライ前に 16%EtOH 混合液を 65℃ 15 分間で熱変性する (エタノール濃度が変わらないよう注意する)。
	由来生物や組織により一本鎖 RNA が混入しやすい	オプション B-2 を参照して dsRNA の精製を再度行う。
	上記、またはその他	精製 dsRNA 溶液に対して、一本鎖 RNA 特異的分解酵素処理を行い、「ISOSPIN PCR Product」で精製する。
DNA の混入	DNA 量が多い試料を使用した	精製 dsRNA 溶液に対して、DNase 処理を行い、「ISOSPIN PCR Product」で精製する。

VI 参考文献

Urayama S, Doi N, Kondo F, Chiba Y, Takaki Y, Hirai M, Minegishi Y, Hagiwara D, Nunoura T. (2020)

Diverged and active partitiviruses in lichen.

Front. Microbiol. **11**: 561344

Ryo Okada, Eri Kiyota, Hiromitsu Moriyama, Toshiyuki Fukuhara, Tomohide Natsuaki (2015)

A simple and rapid method to purify viral dsRNA from plant and fungal tissue.

J Gen Plant Pathol **81**: 103-107

Ioannis E. Tzanetakis, Robert R. Martin (2008)

A new method for extraction of double-stranded RNA from plants.

J Virol Methods **149**: 167-170

Morris, T.J., Dodds, J.A. (1979)

Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue.

Phytopathology **69**: 854-858.

Richard M. Franklin (1966)

Purification and properties of the replicative intermediate of the RNA bacteriophage R17.

Proc Natl Acad Sci U S A. **55**: 1504-1511.

Syun-ichi Urayama, Yoshihiro Takaki, Shinro Nishi, Yukari Yoshida-Takashima, Shigeru Deguchi, Ken Takai, Takuro Nunoura (2018)

Unveiling the RNA virosphere associated with marine microorganisms.

Mol Ecol Resour **18**: 1444-1455

VII 関連製品

Code No.	製品名	包装単位
316-90101	Distilled Water, Deionized, Sterile	100 ml
318-90105	Distilled Water, Deionized, Sterile	500 ml
317-09661	DNase I (RNase free)	2,000 units
315-08001	ISOSPIN PCR Product	100 回用
312-09091	ISOVIRUS II (動物試料用)	20 回用

VIII 備考

本製品は、国立研究開発法人 海洋研究開発機構（布浦拓郎博士・平井美穂氏・浦山俊一博士（現・筑波大学））及び新学術領域研究“ネオウイルス学”の研究成果をもとに開発されました。

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/>