

RNA抽出用試薬

ISOGEN
ISOGEN - LS

マニュアル

株式会社ニッポンジーン

目 次

1 . 原 理	1
2 . R N Aの単離	2
3 . D N Aの単離	10
4 . タンパク質の単離	13
5 . データ集	14
6 . 参考文献	17

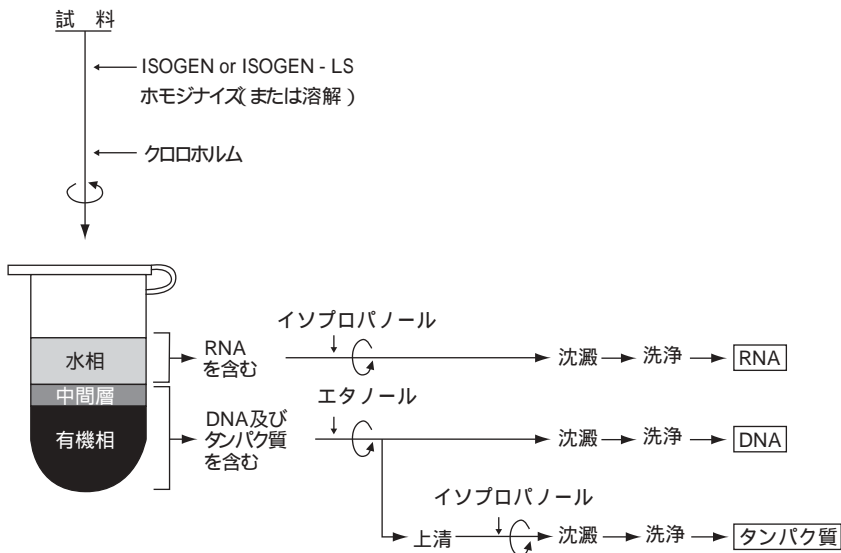
使用上の注意

- ・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。また、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ください。
- ・ISOGEN及びISOGEN - LSは医薬用外劇物（フェノール製剤）ですので、お取り扱いにはご注意ください。
- ・ご使用の際には適切な保護具（手袋、眼鏡等）を着用してください。
- ・もし目に入ったり皮膚に付着した場合は、大量の水で少なくとも15分間は洗い流し、医師の診察を受けてください。
- ・本品のお取扱いは、マニュアル記載内容通りに行なってください。
- ・マニュアル記載内容と異なったお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）につきましては弊社ホームページ（URL <http://www.nippongene.com/>）にてご覧いただけます。

1. 原理

ISOGEN及びISOGEN - LSは、ヒト、動物、植物及び細菌からのRNA抽出用試薬である。液相分離による方法を用いており、同一試料からDNA及びタンパク質も単離することが可能である。一連の操作でRNA、DNA、タンパク質を単離できるので、貴重な試料の分析に有効であり、また、操作が簡単なので、試料数が多い場合にも便利である。

ISOGEN及びISOGEN - LSは、フェノールとチオシアン酸グアニジンを含む均一な液体であり、ISOGEN - LSは ISOGEN よりもフェノール含量が多い。ISOGENは組織や培養細胞等の試料に、ISOGEN - LSは血液等、容量が大きく (>100 µl; 1.5ml プラスチックチューブで処理する場合) さらに濃縮が面倒な液体試料に有効である。試料に ISOGEN または ISOGEN - LS を加えて溶解またはホモジナイゼーションした後、クロロホルムを加えて遠心分離するとホモジネートは水相、有機相及び中間相の3相に分離する。水相には RNA のみが存在し、DNA とタンパク質は中間相以下に存在する。従って、まず、水相を採取してイソプロパノールを加えて RNA を沈殿させ、残った中間相と有機相にエタノールを加えて DNA を、さらに、イソプロパノールを加えてタンパク質を沈殿させることにより RNA、DNA 及びタンパク質を順次単離することができる。



保存 : 2 ~ 10

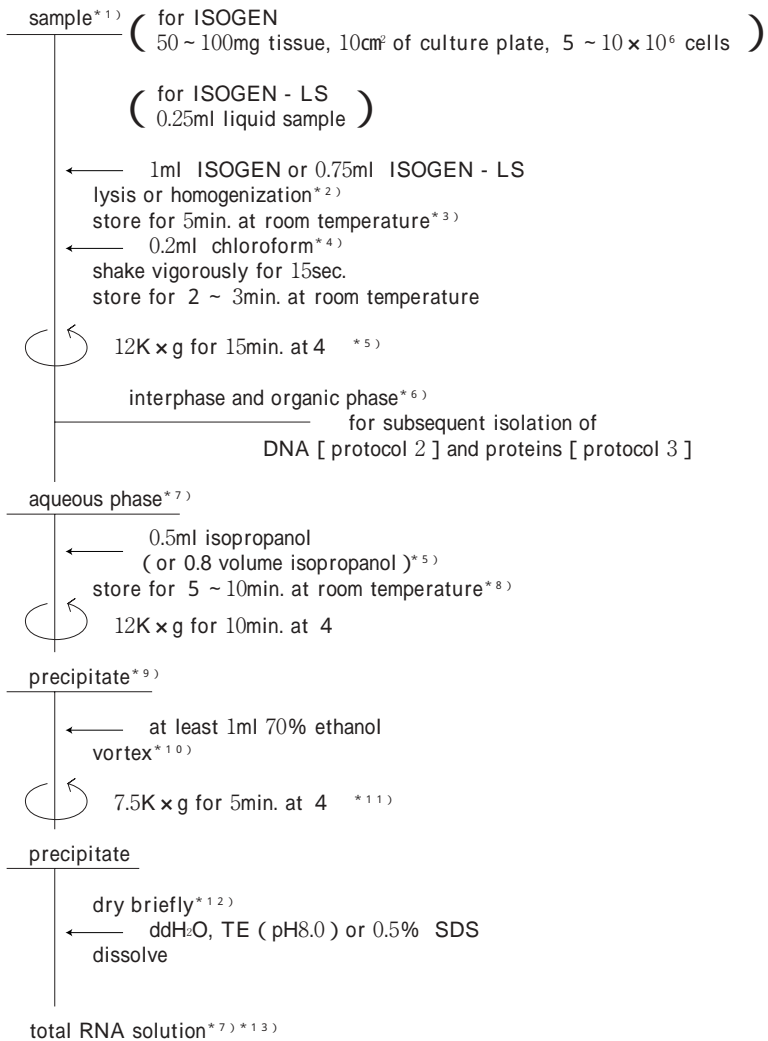
- ・本品は、開封後なるべく早く (お買い求めになった日から6か月以内) にご使用ください。
- ・本品に変色が認められた場合にはご使用にならないでください。
- ・弊社では本品を室温で送付しておりますが、製品到着後ただちに2 ~ 10で保存していただくことにより、問題なくご使用いただけます。

2 . RNAの単離

ISOGEN または ISOGEN - LS を用いて RNA を単離すると、約 1 時間で無傷の RNA を高収率で単離することができる。得られた RNA は、DNA やタンパク質の混入がほとんどなく、DNase 等の処理をしなくてもそのままノーザン分析、ドットブロットハイブリダイゼーション等に用いることができる。

[プロトコール 1 - 1 RNA の単離]

以下の操作は、RNaseのコンタミを防ぐとともに安全のために手袋を着用し、清潔な環境で行う。なお、クロロホルム、イソプロパノール及びエタノールは別に準備しなければならない。また、チューブは透明なポリプロピレン製を用いるとよい。



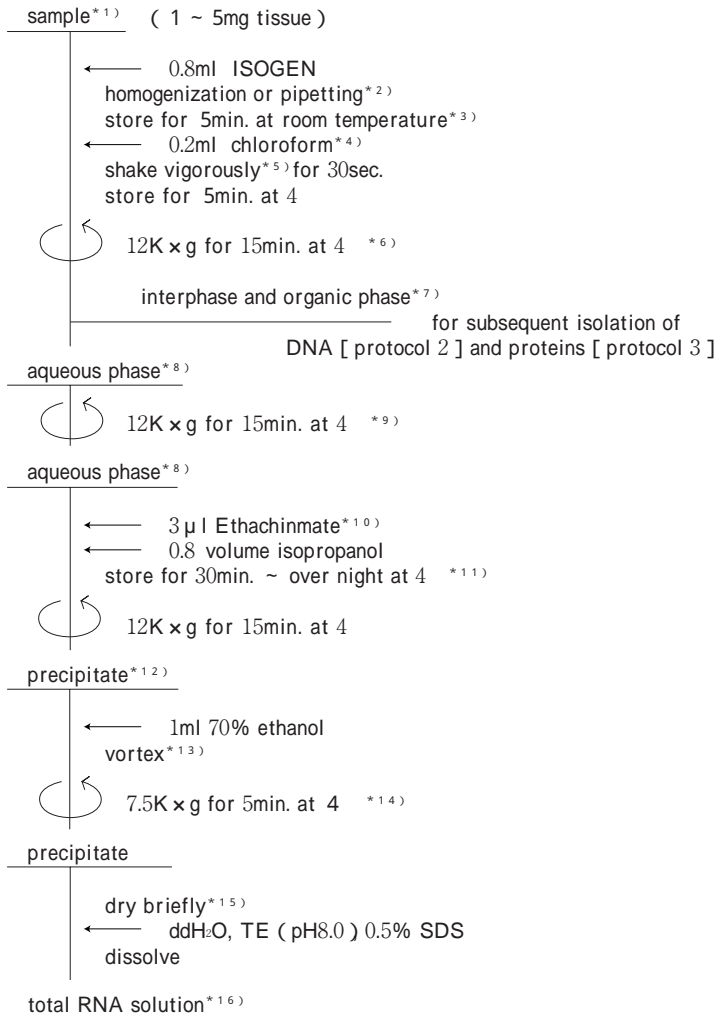
- *1) 1.5ml プラスチックチューブを用いて処理する場合、組織や培養細胞等、試料の体積が100 μ l 以下のものにはISOGEN、血液等、試料の体積が大きい(100 μ lを越える)ものには ISOGEN - LS が有効である。試料の体積が大きくても、濃縮により100 μ l 以下にできる場合には ISOGEN を使用することができる。培養細胞等の試料の場合、培地等の水分は可能な限り除去する。ISOGEN - LS を用いて液体試料を処理する場合、試料の容量が0.25ml以下の時には、水を加えて0.25mlにする。ISOGEN - LS と試料の容量比が常に 3 : 1 になるようにする。血液や血清のように多くの成分が含まれる液体試料は、水で2倍に希釈してから ISOGEN - LS を加える。ヘパリンが逆転写酵素活性を阻害するため、ヘパリン採血した試料より抽出した total RNA を、RT - PCR やPCR に用いるとうまくいかないことがある。EDTA は逆転写酵素活性を阻害しない。
- *2) 組織の場合は、ガラス・テフロンあるいはポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイゼーションする。また、培養皿に付着して増殖した細胞の場合には、10cm²当たり1ml の ISOGEN を直接加えてピペットで吸出して溶解する。細胞懸濁液の場合には遠心して沈殿させた後、5 ~ 10 \times 10⁶ cells 当たり1ml の ISOGEN を加えて同様にピペットで吸出して溶解する。筋、脂肪細胞、植物のようにタンパク質、脂質、糖等を多く含む試料の場合は、ホモジナイゼーション後に一度遠心(12K \times g, 10min., 4)して、上清を以下の操作に用いる。この時脂肪は最上層に位置することに注意する。
- *3) この状態で - 70 で少なくとも1か月は保存できる。
- *4) イソアミルアルコールの添加されたクロロホルムは使用できない。
- *5) ホモジネートは、遠心分離により下層の有機相、中間層及び上層の水相に分かれる。RNAは水相に含まれるが、この水相にはDNAやタンパク質はほとんど含まれない。この時の水相の体積は、加えたISOGENの体積の約60%である。もし60%より少ない場合には、この後の操作で添加する isopropanol量は分取した水相の体積に対して0.8倍容を添加する。30%以下の場合、組織量を減らすなどして、再度抽出し直すことを推奨する。
- *6) ここで得られた中間相と有機相はそれぞれDNA及びタンパク質を単離するため、4 にて保存する。ただし、中間相や有機相中に多量の不溶物(カス状、繊維状のもの等)がある場合、DNA及びタンパク質の単離には適さない。
- *7) DNA やタンパク質との夾雑を少なくすることによりRNAの回収率を上げるため、有機相や中間相ができるだけ混入しないように、水相を新しいチューブに移して以下の操作を行う。ゲノム DNA のコンタミが予想される場合には新しいチューブに移した水相に等量のクロロホルムを加え、再抽出を行う。ポリサッカライド、プロテオグリカン、グリコーゲン等の夾雑物が含まれることが予想される場合、あるいは最終的に得られた RNA に含まれていることが確認された場合には、high-salt precipitation solution(Code No.313-06341)とイソプロパノールをそれぞれ水相の1/2容量加えてイソプロパノール沈殿を行い、10K \times g, 15分遠心してRNAのみを沈殿させると効果的である。この後70%エタノールによる洗浄を行う。RNA量が10 μ g以下の場合には、ホモジナイゼーション後に3 μ lのEthachinmateを加えるが、水相にEthachinmateを加えることにより、RNAの収率を上げることができる。
- *8) この状態で、通常RNAの沈殿は見えない。
- *9) RNAの沈殿は、ゲル様のペレットとしてチューブの内壁と底に付着する。
- *10) この状態で4 で少なくとも1週間、- 20 であれば1年間は保存することができる。
- *11) もしRNAの沈殿がチューブの内壁から流れ出しそうな状態の場合は、エタノール洗浄後の遠心は12K \times gにて行う。
- *12) RNA の沈殿は、風乾または5 ~ 10分間真空乾燥する。真空遠心機を用いて乾燥してはいけない。沈殿を完全に乾燥してしまうと溶解性が著しく減少する。溶解性が減少した RNA のOD₂₆₀ / OD₂₈₀は、1.6以下なので目安となる。得られた RNA は、滅菌蒸留水、TE (pH8.0)または0.5%SDSにピペットチップで吸出して溶解し、55 ~ 60 にて10 ~ 15分間保温するとよい。溶解する蒸留水、0.5%SDSは、予めジエチルピロカーボネート(DEPC) 処理によってRNaseフリーにしておくが、RNaseフリーグレードの市販品を用いること。また、TE (pH8.0)を使用する場合は、RNaseフリーグレードの市販品を用いること(TEに含まれるTris-HClは、DEPC処理にて分解してしまう為)。

*13) 得られたRNAをアガロースゲル電気泳動すると、主に約2kbと5kbのリボソームRNAのバンドの他に0.1~0.3kbの低分子RNAと、7~15kbの高分子RNAを観察することができる。得られたRNAの OD_{260} / OD_{280} は、1.6~1.8である。
 OD_{260} / OD_{280} を測定する際は、 $pH > 7.5$ の水もしくはbufferに溶解して測定する⁷⁾。

[プロトコール 1 - 2 微量試料からのRNAの単離]

バイオプシー等で得られた微量な試料の場合には、[プロトコール 1 - 1] を若干変えたほうがうまくいく場合がある。

以下は、微量試料(ラット下垂体またはヒト肝針生検材料)を用いた場合の例である。RNaseのコンタミを防ぐとともに安全のために手袋を着用し、清潔な環境で操作を行う。なお、クロロホルム、イソプロパノール及びエタノールは別に準備しなければならない。また、チューブは透明なポリプロピレン製を用いるとよい。



弊社では、ラット下垂体またはヒト肝針生検材料 1 ~ 5mg を用いた場合の RNA の収量は、4 ~ 8 μg / 1 ~ 5mg wet weight という結果が得られた。

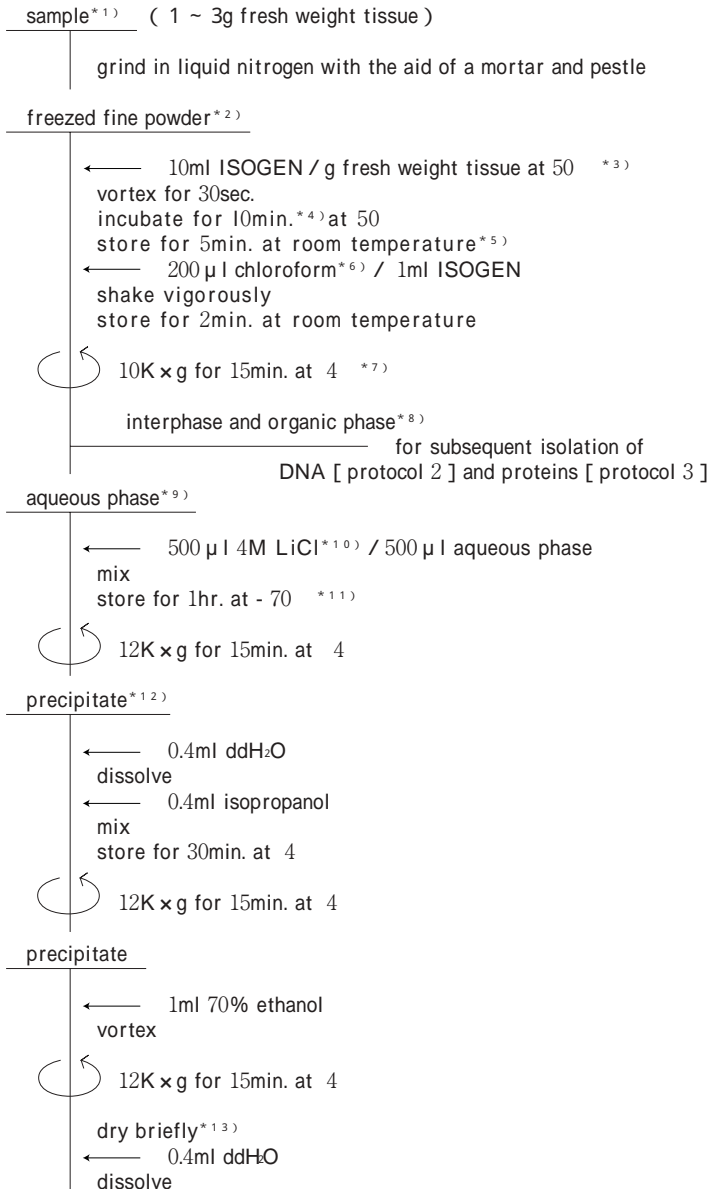
- *1) やわらかい組織（肝等）は微量の組織からでも RNA をとることができる。
- *2) 1ml のガラス・テフロンホモジナイザーを用いるか、あるいは ISOGEN を含んだピペットチップ（1ml）で組織を吸引・噴出し、粉碎する。
- *3) この状態で -70 で少なくとも 1 か月は保存できる。
- *4) イソアミルアルコールの添加されたクロロホルムは使用できない。
- *5) 手で激しく振る。
- *6) ホモジネートは、遠心分離により下層の有機相、中間層及び上層の水相に分かれる。RNA は水相に含まれるが、この水相には DNA やタンパク質はほとんど含まれない。この時の水相の体積は、加えた ISOGEN の体積の約 60% である。また、この後の操作で添加する isopropanol 量は分取した水相の体積に対して 0.8 倍容を添加する。水相の体積が 30% 以下の場合、組織量を減らすなどして、再度抽出し直すことを推奨する。
- *7) ここで得られた中間相と有機相は、それぞれ DNA 及びタンパク質を単離するため、4 にて保存する。
- *8) DNA やタンパク質との夾雑を少なくすることにより RNA の回収率を上げるため、有機相や中間相をできるだけ混入しないように、水相を新しいチューブに移して以下の操作を行う。
- *9) 上清回収の際、混入してくる有機相を分離するため再遠心することにより、水相部の回収率を上げることができる。
- *10) 水相に Ethachinmate を加えることにより RNA の収率を上げ、さらに RNA の沈殿を目で確認することができる。
- *11) -20 以下では夾雑物が多くなるので 4 が望ましい。この状態で、通常 RNA の沈殿は見えない。
- *12) RNA の沈殿は、ゲル様のペレットとしてチューブの内壁と底に付着する。
- *13) この状態で 4 で少なくとも 1 週間、-20 であれば 1 年間は保存することができる。
- *14) もし RNA の沈殿がチューブの内壁から流れ出しそうな状態の場合は、エタノール洗浄後の遠心は 12K \times g にて行なう。
- *15) RNA の沈殿は、風乾または 5 ~ 10 分間真空乾燥する。真空遠心機を用いて乾燥してはいけない。沈殿を完全に乾燥してしまうと溶解性が著しく減少する。溶解性が減少した RNA の $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ は、1.6 以下なので目安となる。得られた RNA は、滅菌蒸留水、TE (pH8.0) または 0.5% SDS にピペットチップで吸出して溶解し、55 ~ 60 にて 10 ~ 15 分間保温するとよい。溶解する蒸留水、0.5% SDS は、予めジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理によって RNase フリーにしておくか、RNase フリーグレードの市販品を用いること。また、TE (pH8.0) を使用する場合は、RNase フリーグレードの市販品を用いること (TE に含まれる Tris-HCl は、DEPC 処理にて分解してしまう為)。
- *16) 得られた RNA をアガロースゲル電気泳動すると、主に約 2kb と 5kb のリボソーム RNA のバンドの他に 0.1 ~ 0.3kb の低分子 RNA と、7 ~ 15kb の高分子 RNA を観察することができる。得られた RNA の $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ は、1.6 ~ 1.8 である。 $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ を測定する際は、 $\text{pH} > 7.5$ の水もしくは buffer に溶解して測定する*7)。

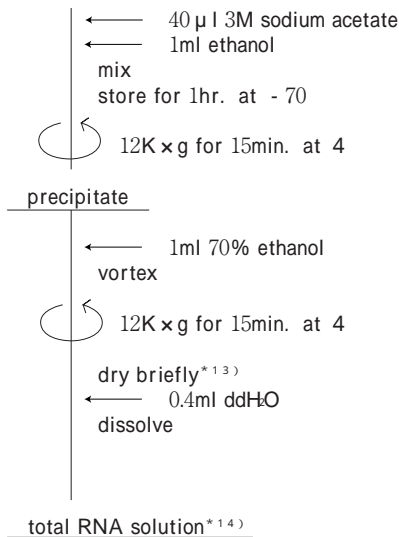
(宮崎大学医学部 内科学講座 (第三内科) 片上秀喜先生 よりご指導いただきました。)

[プロトコール 1 - 3 植物試料からのRNA単離]

試料が植物の場合には [プロトコール 1 - 1] を若干変えることにより、total RNA を得ることができる。

以下は植物試料 (*Arabidopsis* または *Tobacco*) を用いた場合の例である。RNase のコンタミを防ぐとともに安全のために手袋を着用し、清潔な環境で操作を行う。なお、クロロホルム、イソプロパノール及びエタノールは別に準備しなければならない。また、チューブは透明なポリプロピレン製を用いるとよい。





弊社では、植物試料を用いた場合のRNAの収量は、*Arabidopsis*または*Tobacco* 0.5 ~ 1g fresh weightより150 ~ 200 μ g (OD₂₆₀ / OD₂₈₀ 1.8) という結果が得られた。

- *1) できるだけ新鮮な試料を用いる。
- *2) 液体窒素にて凍結し粉碎した後、凍らせたままにしておく。
- *3) 予め遠心管にISOGEN (10 ~ 20ml / g fresh weight tissue) を入れて50 °Cに保温しておき、その中に*2)の試料を入れる。
- *4) インキュベート時間は10分間または試料が完全に溶けるまでとする。インキュベート時間が長すぎるとポリサッカライドのコンタミが多くなるので注意する。
- *5) この状態で -70 °C で少なくとも1 か月は保存できる。
*3) で使用した遠心管が高回転 (12K \times g) で遠心できないものである場合には、この時点で、試料を加えてインキュベートしたISOGEN混合液をマイクロチューブに1mlずつ分注してからクロロホルム処理をすると、以後の処理がしやすい。
- *6) イソアミルアルコールの添加されたクロロホルムは使用できない。クロロホルムの量はISOGENの1 / 5容量とする。
- *7) ホモジネートは、遠心分離により下層の有機相、中間相及び上層の水相に分かれる。RNAは水相に含まれるが、この水相にはDNAやタンパク質はほとんど含まれない。この時の水相の体積は、加えたISOGENの体積の約60%である。
- *8) ここで得られた中間相と有機相は、それぞれDNA及びタンパク質を単離するため、一晚であれば4 °C、数か月であれば -70 °C にて保存する。ただし、中間相や有機相中に多量の不溶物 (カス状、繊維状のもの等) がある場合、DNA及びタンパク質の単離には適さない。

- *9) DNAやタンパク質との夾雑を少なくすることによりRNAの回収率を上げるため、有機相や中間相ができるだけ混入しないように、水相を新しいチューブに移して、以下の操作を行なう。チューブには1本当たり水相500 μ lを入れる。
- *10) 水相に塩化リチウムを加えると白濁がおこる。
- *11) 液体窒素を使用する場合には15分間静置する。
- *12) 沈殿は無色透明でゼリー状の柔らかい沈殿と白色の沈殿にわかれる。この時にゼリー状の沈殿をできるだけ除去する。
- *13) RNAの沈殿は風乾または5～10分間真空乾燥する。真空遠心機を用いて乾燥してはいけない。沈殿を完全に乾燥してしまうと溶解性が著しく減少する。溶解性が減少したRNAのOD₂₆₀ / OD₂₈₀は1.6以下なので目安となる。
- *14) 得られたtotal RNA solutionをすぐに使用しない場合、1/10容量の3M 酢酸ナトリウム、2.5倍量のエタノールを加えて-80℃保存する。
使用時には10K \times gで15分間遠心し、得られた沈殿を70%エタノールで洗浄後乾燥し、滅菌蒸留水に溶かす。
OD₂₆₀ / OD₂₈₀を測定する際は、pH > 7.5の水もしくはbufferに溶解して測定する⁷⁾。

(金沢大学 遺伝子実験施設 よりご指導いただきました。)

収量の目安は次の通りである。

sample		yield
tissue	liver	6 ~ 10 μ g RNA / mg tissue
	spleen	6 ~ 10
	kidney	3 ~ 4
	skeletal muscles	1 ~ 1.5
	brain	1 ~ 1.5
	placenta	1 ~ 4
	ラット下垂体またはヒト肝針生検材料 (微量試料)	4 ~ 8 μ g RNA / 1 ~ 5mg tissue
plant tissue	<i>Arabidopsis</i> または <i>Tobacco</i> 150 ~ 200 μ g / 0.5 ~ 1g fresh weight tissue	
culture cells	epithelial	8 ~ 15 μ g RNA / 10 ⁶ cells
	fibroblasts	5 ~ 7
blood	(ヒトまたは動物)	7 ~ 15 μ g RNA / ml blood

【トラブルシューティング】

トラブル	対策
低収量	<ul style="list-style-type: none">・ ISOGENまたはISOGEN - LS添加後の溶解（またはホモジナイゼーション）を十分に行う。・ 得られたRNA沈殿を十分溶解する。
$OD_{260} / OD_{280} < 1.65$	<ul style="list-style-type: none">・ 試料に加えるISOGENまたはISOGEN - LS量を増やす。この場合、後の操作は加えたISOGENまたはISOGEN - LS量に比例して増やす。・ ISOGENまたはISOGEN - LSによる溶解（またはホモジナイゼーション）後、室温で5分置かず、直ちにクロロホルムを加える。・ 水相を採取する際、フェノール相を絶対に混入させない。・ 得られたRNA沈殿を十分溶解する。・ 試料にクロロホルムを加える前に12K × gで5分間遠心し、沈殿物を除去した後にクロロホルムを加える。・ pH > 7.5の水もしくはbufferに溶解して測定することにより、再現性のある値が得られる⁷⁾。
RNAの分解	<ul style="list-style-type: none">・ 新鮮な試料を用いる。・ 細胞の場合、トリプシン消化により十分分散する。・ 用いる溶液や容器は、加熱処理を十分行う。・ アガロースゲル電気泳動の際、用いるホルムアルデヒドのpHが、中性であることを確認する（pH 3.5以下だと分解が起こる）。
DNAのコンタミ	<ul style="list-style-type: none">・ 試料に加えるISOGENまたはISOGEN - LS量を増やす。この場合、後の操作は加えたISOGENまたはISOGEN - LS量に比例して増やす。・ 得られたRNA溶液にDNAのコンタミが認められる場合には、この溶液（～100 μl）にISOGEN 1mlまたはISOGEN - LS 0.75mlを加え、再度処理を行う。・ エタノールやDMSO等の有機溶媒、強緩衝液、アルカリ性溶液を含む試料を用いない。

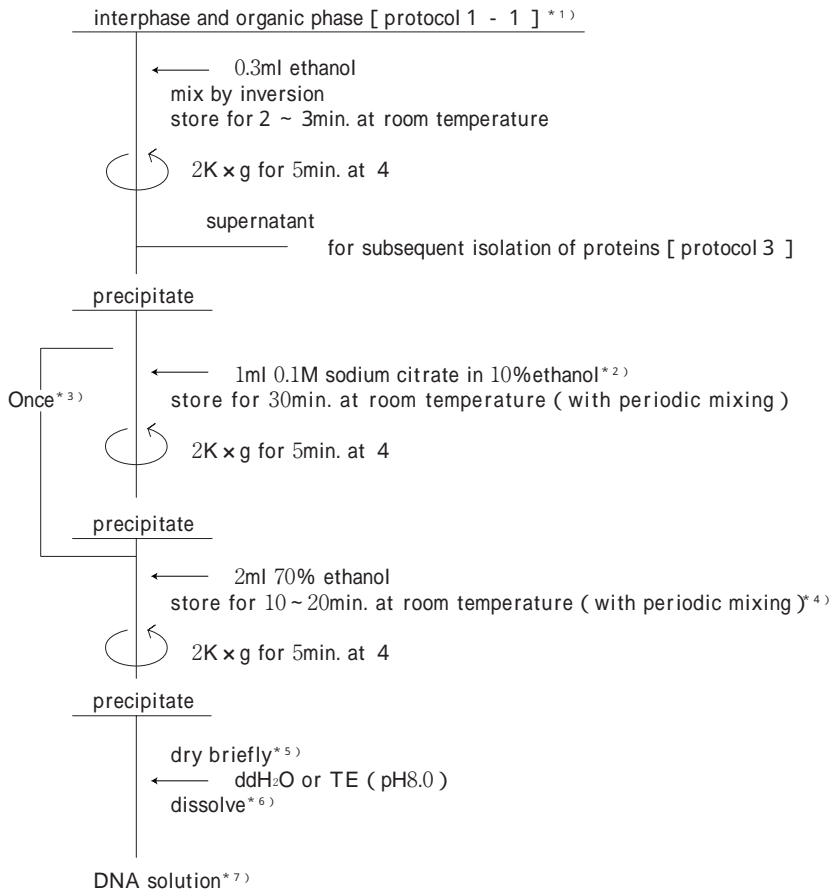
3 . DNAの単離

DNAは[プロトコール1 - 1、1 - 2、1 - 3]のホモジナイゼーション後の遠心分離で得られる中間相と有機相より回収する。単離されたDNAは、PCRや制限酵素の基質として用いることができる。

ただし、[プロトコール1 - 1、1 - 2、1 - 3]で得られた中間相や有機相中に多量の不溶物(カス状、繊維状のもの等)がある場合、得られるDNAの収量が少ない、あるいは純度が低いことがあるのでDNAの単離には適さない。

[プロトコール2 DNAの単離]

以下の操作は、安全のために手袋を着用して行う。なお、エタノール及びくえん酸ナトリウムは別に準備しなければならない。[プロトコール2]は、前述の[プロトコール1 - 1]でISOGEN 1mlまたはISOGEN - LS 0.75ml用いた場合に対応する。



- *1) 純度の高い DNA を得るには、残存する水相を注意深く完全に除去しなければならない。中間相と有機相は 4 で一晩保存してもよい。
- *2) 0.1Mくえん酸ナトリウムinエタノール調製方法
1Mくえん酸ナトリウム10ml及びエタノール10mlに100mlになるように滅菌蒸留水を加え、混合する。
 (1Mくえん酸ナトリウム調製方法
くえん酸三ナトリウム二水和物29.4gを蒸留水にて溶解し、100mlにメスアップし、オートクレーブで121 , 20分滅菌する。)
- *3) 洗浄の時間を短縮してはいけない。DNA 量が 200 µg 以上のときや、DNA 以外の成分が非常に多いときは、さらに洗浄を行う。
- *4) この状態で 4 で数か月保存することができる。
- *5) 5 ~ 10分間真空乾燥させる。完全に乾燥させるとDNAの溶解が著しく困難になる。
- *6) ピベットにて穏やかに吸出して溶解する。この段階で、特に組織よりDNAを単離した場合に、さらに不溶性のゲル様の物質が含まれていることがある。その時は、遠心分離 (12K × g, 10min.) により除去する。不溶性物質をさらに溶解したい場合には最終濃度 8mM NaOHを加えることにより、効果が得られることがある。また、この状態で 4 で一晩保存することができるが、長期間保存するときはTE (pH8.0) で溶解した場合はそのまま、滅菌蒸留水で溶解した場合はTris-HCl (pH8.0) を最終濃度10mM、EDTAを最終濃度 1mMになるように加える。NaOHで溶解した場合はHEPESで下記の表を参考にしてpHを 7 ~ 8 に調製し、EDTAを最終濃度 1mMになるように加える。
- *7) この時に不溶沈殿物が認められる。さらに純度を高めたい場合にはフェノール/クロロホルム処理してもよい。ただし、この場合には収量が下がることもある。
[プロトコール2] に従ってDNAを単離すると、細胞の場合は60 ~ 100kbのDNAが約70%、~20kbの DNA が約30%、培養細胞の場合は 60 ~ 100kb の DNA が約80%、~20kbのDNAが約20%得られる。しかし、DNAの平均長は、ホモジナイゼーション中のせん断力の強さに依存するので、大きなDNA断片を得たいときにはポリトロンホモジナイザーのような強力なものを避ける。得られたDNA溶液は、水で希釈して OD₂₆₀ を測定して収量を計算する。1OD₂₆₀ = 50µg dsDNA / ml である。収量の目安は、10⁶個のヒト、ラット、マウス細胞でそれぞれ7.1 µg、6.5 µg、5.8 µgである。得られるDNAは、RNA及びタンパク質をほとんど含まず、OD₂₆₀ / OD₂₈₀ は1.7以上である。PCRや制限酵素の基質として用いる場合、滅菌蒸留水またはTE (pH8.0) で溶解した時にはそのまま使用できるが、終濃度 8mM NaOHで溶解した時は予めpHをHEPES添加または透析による調整が必要である。HEPESによる調整は下記の表を参考にするるとよい。この方法で得たDNAは、1 µg 当たり 3 ~ 5units の制限酵素により、3 ~ 24時間でその 80 ~ 90%を切断することができる。
OD₂₆₀ / OD₂₈₀ を測定する際は、pH > 7.5の水もしくはbufferに溶解して測定する⁷⁾。

final pH	required HEPES concentration(M)	required HEPES volume (µl / ml 8mM NaOH)
8.4	0.1	86
8.2	0.1	93
8.0	0.1	101
7.8	0.1	117
7.5	0.1	159
7.2	1	23
7.0	1	32

収量の目安は次の通りである。

sample		yield
tissue	liver	3 ~ 4 $\mu\text{g DNA / mg tissue}$
	kidney	3 ~ 4
	skeletal muscles	2 ~ 3
	brain	2 ~ 3
	placenta	2 ~ 3
culture cells	(human, rat, mouse)	5 ~ 7 $\mu\text{g DNA / } 10^6 \text{ cells}$

【トラブルシューティング】

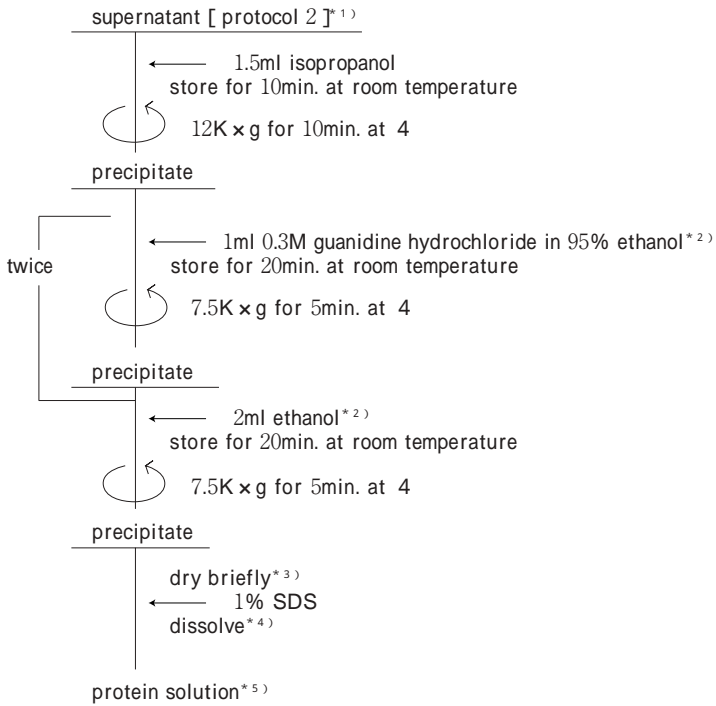
トラブル	対策
低収量	<ul style="list-style-type: none"> ・ ISOGENまたはISOGEN - LS添加後の溶解（またはホモジナイゼーション）を十分に行う。 ・ 得られたDNA沈殿を十分溶解する。 ・ 得られたDNA溶液に不溶沈殿物が認められる場合は、不溶沈殿物をピペットの先等でくずし、55℃にて20分保温した後遠心し、得られた上清を使用する。
$OD_{260} / OD_{280} < 1.70$	<ul style="list-style-type: none"> ・ 0.1Mくえん酸ナトリウムin 10%エタノールによるDNA洗浄をもう一度行い、完全にフェノールを除去する。または、DNAをピペットでよくほぐした溶液を遠心し、上清をクロロホルム処理することもできるが、この場合には回収率が下がることがある。 ・ pH > 7.5の水もしくはbufferに溶解して測定することにより、再現性のある値が得られる⁷⁾。
DNAの分解	<ul style="list-style-type: none"> ・ 新鮮な試料を用いる。 ・ 試料をポリトロン等の高スピードホモジナイザーを用いてホモジナイゼーションすることは避ける。
RNAのコンタミ	<ul style="list-style-type: none"> ・ RNA単離の際の水相を完全に除去する。 ・ 0.1Mくえん酸ナトリウムin 10%エタノールによるDNA洗浄を十分行う。
不溶沈殿物が出る	<ul style="list-style-type: none"> ・ 抽出したDNAを滅菌蒸留水またはTE (pH8.0) で懸濁した際に不溶沈殿物が認められるが、この場合には遠心して上清を用いる。上清から得られるDNAの収量が少ない場合には終濃度 8mM 水酸化ナトリウムを加えてもよい。水酸化ナトリウムを加えて懸濁することにより、不溶沈殿物が溶けやすくなることある。さらに純度を高めたいときには、フェノール/クロロホルム処理を行なう。ただし、この場合には収量が下がることがある。

4 . タンパク質の単離

タンパク質は、[プロトコール2] のエタノール沈殿の遠心分離で得られる上清の有機相より回収する。単離されたタンパク質は、そのままウエスタンブロッティングに用いることができる。

[プロトコール3]

以下の操作は、安全のために手袋を着用して行う。なお、塩酸グアニジン、SDS、エタノール及びイソプロパノールは別に準備しなければならない。[プロトコール3] は、[プロトコール1 - 1] でISOGEN 1mlまたはISOGEN - LS 0.75ml用いた場合に対応する。



*1) プロトコールに従えば上清の量は約0.8mlである。0.1% SDSにて4 で透析すると、収量が上がることもある。

*2) この状態で4 で少なくとも1か月あるいは、-20 で少なくとも1年間保存できる。

*3) 5 ~ 10分間、真空乾燥させる。

*4) タンパク質の効果的な回収の為に以下の3通りの方法がある。

- ・ペレットをピペッティングにより1% SDSに溶解し、50 で保温する。ペレットには溶解しないものも含まれているので遠心分離(10K x g, 10min., at 4)により除去する。
- ・ペレットを10M urea / 50mM DTTに針でくずして溶解する(urea / DTT溶液は新鮮なものを用いる)。室温で1時間放置し、3分間煮沸する。氷冷し、sonicateする。溶解しない場合は、溶解するまで煮沸とsonicateをさらに2回行う⁸⁾
- ・*1) のフェノール/エタノールの上清を0.1% SDSにて4 で透析する。

*5) 不溶物は遠心分離(10K x g, 10min., at 4)により除去する。得られたタンパク質はそのままウエスタンブロッティングに使用できる。また、-20 で保存できる。

【トラブルシューティング】

トラブル	対策
低収量	<ul style="list-style-type: none"> ・ ISOGENまたはISOGEN - LS添加後の溶解（またはホモジナイゼーション）を十分に行う。 ・ 得られたタンパク質沈殿を十分溶解する。
タンパク質の分解	<ul style="list-style-type: none"> ・ 新鮮な試料を用いる。
PAGEでのバンドディフォーメーション	<ul style="list-style-type: none"> ・ タンパク質沈殿の洗浄を十分に行う。

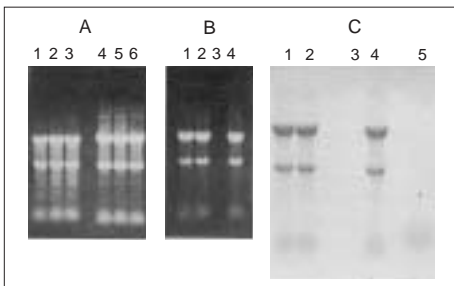
5 . データ集

ISOGEN使用例
 ISOGEN法とチオシアン酸グアニジン - 塩化セシウム (GT - CsCl) 超遠心法の比較²⁾

	ISOGEN法		GT - CsCl超遠心法	
	総RNA ^a	-actin mRNA ^b	総RNA ^a	-actin mRNA ^b
ヒト乳房上皮細胞	7.0 ± 0.4	4.1 ± 0.3	5.6 ± 0.6	3.1 ± 0.2
ラ ッ ト 乳 房	4.7 ± 0.2	6.7 ± 0.6	3.4 ± 0.4	5.0 ± 0.4
マ ウ ス 肝	7.4 ± 0.4	5.7 ± 0.3	4.8 ± 0.4	3.9 ± 0.4

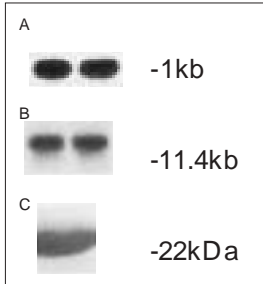
- a . µg / mg組織あるいは10⁶細胞
 b . -actin cDNAを用いたNorthern分析におけるデンシトメーター単位 / mg組織
 あるいは10⁶細胞

ISOGEN 法で単離した総 RNA の電気泳動²⁾



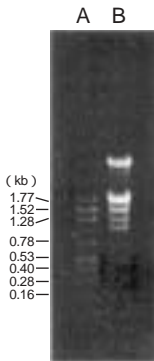
- A : lane 1~3 ラット胸線RNA (3 µg / lane)
 4~6 ヒト乳房上皮細胞RNA (5 µg / lane)
 ホルムアルデヒド-(1%)アガロースゲル電気泳動
 臭化エチジウム染色
- B : lane 1 ラット乳房RNA (3 µg / lane)
 2 " "
 3 " RNase処理 (5 µg/ml, 30min., 37)
 4 " DNase処理 (50units, 30min., 37)
 ホルムアルデヒド-(1%)アガロースゲル電気泳動
 臭化エチジウム染色
- C : lane 1 ラット乳房RNA (3 µg / lane)
 2 " "
 3 " RNase処理 (5 µg/ml, 30min., 37)
 4 " DNase処理 (50units, 30min., 37)
 5 BPB
 ホルムアルデヒド-(1%)アガロースゲル電気
 泳動後ナイロンメンブレンにプロットング
 メチレンブルー染色

ISOGEN法で単離したRNA、DNA及びタンパク質の
Northern、Southern及びWesternプロットティング



- A : 成長ホルモン (GH) cDNAを用いて、総 RNA (5 μ g / lane) 中の GH mRNA (1 kb) を Northern 分析した。
 B : GH cDNAを用いて、 *EcoR* I で消化した 総 DNA (5 μ g / lane) 中の GH 遺伝子断片 (11.4kb) を Southern 分析した。
 C : 抗 GH 抗体を用いて、 総タンパク質 (50 μ g / lane) 中の GH (22kDa) を Western 分析した。

ISOGEN法で *Tobacco* から抽出した RNA

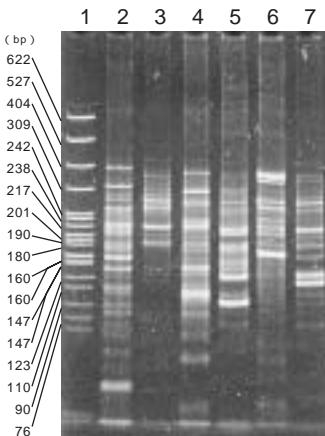


[プロトコール 1 - 3] (p. 6) により抽出した後、熱処理 (65 $^{\circ}$ C , 15min.) を行った。

- A : RNA ladder
 B : *Tobacco*

(提供 : 金沢大学 遺伝子実験施設)

ISOGEN法で抽出した総RNAを用いたmRNAフィンガープリンティング



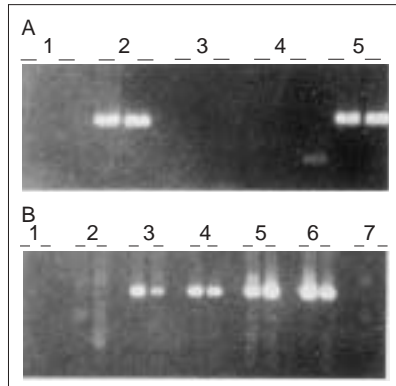
弊社製品 『 mRNA Fingerprinting Kit Version 1.0SG 』 (Code No. 316 - 03151) により得られた mRNA フィンガープリント像。

Sample : マウス肝総 RNA
 $3'$ Anchor Primer : GT15C
 Arbitrary Primer : Set A (AP-A)

- lane 1 Marker10 (pBR322 DNA / *Msp* digest)
 lane 2 AP-A- 2
 lane 3 AP-A- 9
 lane 4 AP-A-12
 lane 5 AP-A-15
 lane 6 AP-A-19
 lane 7 AP-A-21

PCR産物1/10容量を電気泳動
 12%未変性ポリアクリルアミドゲル
 Tris-Glycine Buffer
 30mA 2hr.
 SYBR[®] Green 染色

ISOGEN - LS使用例
ISOGEN法で単離したhepatitis C viral (HCV) RNAを用いたRT - PCR³⁾



A : ヒト血清から単離された HCV RNA を用いてnested PCRにより得られたHCV に特異的なPCR産物。

臭化エチジウムにより染色されたゲル上に 256bp の HCV に特異的な PCR 産物が認められる。

各レーン 左側 ヒト血清0.15mlから抽出されたRNA
右側 ヒト血清0.3mlから抽出されたRNA

- lane 1 RNAなし
- 2 PCR産物 (GR93-74)
- 3 HCVネガティブコントロール
- 4 PCR産物 (GR93-72)
- 5 HCVポジティブコントロール

B : ヒト血清及び肝臓から単離された HCV RNA を用いて RT-PCR により得られたHCVに特異的なPCR産物。

臭化エチジウムにより染色されたゲル上に 272bp の HCV に特異的な PCR 産物が認められる。

- lane 1 RNAなし
- 2 HCVネガティブコントロール (ヒト血清)
- 3 HCVポジティブコントロール (ヒト血清)
- 4 PCR産物 (GR93-84) (ヒト血清)
- 5 PCR産物 (GR93-82) (ヒト肝臓バイオプシー)
- 6 PCR産物 (GR93-76) (ヒト血清)
- 7 HCVネガティブコントロール (ヒト血清)

6 . 参考文献

- 1) Chomczynski, P. and Sacchi, N., *Anal. Biochem.*, 162, 156-159 (1987)
- 2) Chomczynski, P., *BioTechniques*, 15, 532-535 (1993)
- 3) Chomczynski, P., Bowser-Finn, R. and Sabatini, M. L., *THE JOURNAL OF NIH RESEARCH*, 6, 83 (1994)
- 4) Chomczynski, P. and Mackey, K., *BioTechniques*, 19, 942-945 (1995)
- 5) Mackey, K. and Chomczynski, P., *THE JOURNAL OF NIH RESEARCH*, 8, 72 (1996)
- 6) Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K., *Molecular Biology*, vol.2, A.1.5, (1990)
- 7) Wilfinger, W., Mackey, K. and Chomczynski, P., *BioTechniques*, 22, 474-481 (1997)
- 8) Varela, L. and Margot, Ip., *Endocrinology*, 137 (11) 4915-4924 (1996)

株式会社ニッポンジーン
学術営業グループ

〒930-0834 富山県富山市問屋町1-8-7
TEL (076) 451 - 6548
FAX (076) 451 - 6547
E-mail info@nippongene.com
URL <http://www.nippongene.com/>
NPG A060704MF