

動物細胞や組織からの RNA 抽出キット (DNase I なし)

ISOSPIN Cell & Tissue RNA (w/o DNase I)

Code No. 318-09571

操作マニュアル Ver.1-2408

ISOSPIN Cell & Tissue RNA (w/o DNase I) 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、別売りの DNase I との組み合わせで、約 1 時間で高純度の RNA を抽出・精製できます。

キット内容

保存：室温保存

キット内容品	容量 (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)
ddWater (RNase free)	1 ml × 8 本	溶出用、DNase I 溶液調製用
Spin Column	50 本 × 1 袋	上部パーツ：カラム 下部パーツ：Collection Tube

※エタノール含有の PT Binding Buffer (組織・細胞用)、PT Wash1 Buffer、PT Wash2 Buffer をご使用後は、蒸発を防ぐため速やかに蓋を閉め、保管して下さい。

「ISOSPIN Cell & Tissue RNA (w/o DNase I)」 (Code No. 318-09571) について

本キットに DNase I は添付されていません。
本紙 P3 の精製プロトコール⑧で調製する DNase I 溶液には、DNase I (RNase free) と、10×DNase I Buffer が必要となります。

別売りの「DNase I (RNase free)」 (Code No. 314-08071) をご用意下さい。

プロトコール

操作の流れ

P2 <動物培養細胞用抽出プロトコール> → P3 <精製プロトコール>

P4 <動物組織用抽出プロトコール> → P3 <精製プロトコール>

<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

注) 培養液などは可能な限り除去し、必要に応じて PBS 等で軽く洗浄する。

注) 1×10^4 個など少ない細胞数から抽出する場合は、精製プロトコール①で添加する溶出液の量を減らして RNA の濃度を調整する。

② ← 600 μ l の C Extraction Buffer (細胞用) を加え、ピペティングで細胞溶解

注) 細胞全体に直接 C Extraction Buffer (細胞用) をマイクロピペットでふりかけ、細胞が溶けて粘性の高い液体状になるまでピペティングする。

注) はがれにくい接着細胞の場合は、C Extraction Buffer (細胞用) を加えた後、溶解しやすくなるようセルスクレーパーで細胞をはがし集める。

注) 遠心で回収した細胞がペレット状になっている場合は、タッピング等でペレットをほぐしてから C Extraction Buffer (細胞用) を加える。

③ 溶解した細胞を含む溶液を全量 1.5 ml マイクロチューブへ移し替える

注) はじめから 1.5 ml マイクロチューブを使用していた場合は、移し替えは省略してそのまま進める。

30 秒間以上ボルテックス

注) ボルテックス不足は Spin Column の目詰まりにつながるので確実にを行う。

④ ← 遠心 ($13,000 \times g$ 、10 分間、 4°C)

注) 細胞数や細胞の種類によっては沈殿が見えない場合がある。

注) 沈殿が見えない場合は、上清を全量回収する。

④ 上清を新しいマイクロチューブに回収

← 上清と等量の PT Binding Buffer (組織・細胞用) を加えて、数回転倒混和

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。

混合液を軽くスピンドウン

(次のページ、精製プロトコールの⑤に続く)

<精製プロトコール>

(動物培養細胞用抽出プロトコール④、動物組織用抽出プロトコール④からの続き)

⑤ Spin Column に④の混合液を 600 μ l 添加 (残りは⑥で全量添加)

遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C)
ろ液を捨てる

注) 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。(以降、「ろ液を捨てる」は同様)

⑥ ← 残りの④の混合液を Spin Column に全量添加

遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C)
ろ液を捨てる

⑦ ← 500 μ l の PT Wash1 Buffer を Spin Column に添加

遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C)
ろ液を捨てる

注) ⑦のろ液を捨てる操作は省略することができる。

⑧ ← 用事調製した 100 μ l の DNase I 溶液を Spin Column に添加

用事調製

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

* DNase I (10 \times DNase I Buffer 付属) は別売

静置 (15 分間、室温)

⑨ ← 300 μ l の PT Wash1 Buffer を Spin Column に添加

遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C)
ろ液を捨てる

⑩ ← 600 μ l の PT Wash2 Buffer を Spin Column に添加

遠心 (13,000 \times g、2 分間、4 $^{\circ}$ C) し、ろ液と Collection Tube を捨てる

⑪ 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

注) 溶出液量を減らしてもよいが、20 μ l より減らさない。

静置 (3 分間、室温)

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

RNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される

<動物組織用抽出プロトコール>

① 最大 20 mg までの動物組織を 1.5 ml マイクロチューブに採取

注) 新鮮な動物組織または凍結組織を使用する。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。

注) 試料量が少ない場合は、精製プロトコール⑪で添加する溶出液の量を減らして RNA の濃度を調整する。

注) 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 ← 600 μ l の PT Extraction Buffer (組織用) を加え、ペッスルですり潰す

注) 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なので直ちに念入りにすり潰す。

③ 30 秒間以上ボルテックス

注) ボルテックス不足は Spin Column の目詰まりにつながるので確実にを行う。

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

注) 遠心後に上清を回収する際、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。

注) 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 上清を新しいマイクロチューブに回収

← 上清と等量の PT Binding Buffer (組織・細胞用) を加えて、数回転倒混和

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。

混合液を軽くスピンドウン

(前のページ、精製プロトコールの⑤に続く)

【補足】 改変プロトコールについて

心臓、骨格筋組織、軟骨などは硬く繊維等も多いため、通常プロトコールでは RNA 抽出が困難です。Proteinase K を用いる改変プロトコールをお試し下さい (ニッポンジーンホームページ参照)。

※トラブルシューティングは、ISOSPIN Cell & Tissue RNA (314-08211) の詳細マニュアル [WEB 版] 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 学術営業課 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/>