

製品コード 9112/9113

研究用

Takara

**RNAiso Blood
(Total RNA 抽出試薬)**

説明書

v202008Da

RNAiso Blood は、ヒト、動物由来の血液サンプルや植物由来の水分含量の多いサンプルから簡便かつ迅速に RNA を分離することができる total RNA 抽出試薬です。

RNAiso Blood 溶液中で細胞を破碎した後、破碎液（ホモジネート）にクロロホルムを添加してよく混和し、遠心することで、この混合液を 3 層に分離させます。上部の透明な水層には RNA が、半固体の中間層には DNA が、また、赤色を呈した下層の有機溶媒層にはタンパク質、多糖、脂肪酸、細胞残滓と少量の DNA が含まれています。

上部の水層を採取し、イソプロパノール沈殿により total RNA を回収します。

本製品を用いることで、約 1 時間で total RNA 抽出の全行程が完了します。分離された total RNA は DNA やタンパク質をほとんど含んでいないため、RT-PCR*、ノーザンブロット分析、mRNA の単離、および *in vitro* 翻訳反応などに用いることができます。

- *： RT-PCR に用いる場合には、微量なゲノム DNA の持ち込みでも結果に影響するため、使用前に Recombinant DNase I (RNase-free) (製品コード 2270A) 処理を行う、またはリアルタイム RT-PCR の場合は逆転写試薬として PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (製品コード RR047A) を利用してください。

<注意点>

RNAiso Blood は水分含量の多いサンプル（例：血液、植物破碎液）用の試薬です。高濃度変性剤を含有するため、固形サンプルに利用すると RNA の収量が減少します。固形サンプルからの RNA 抽出の場合は、RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) をご利用ください。

I. 内容

RNAiso Blood (製品コード 9112) *	100 ml
RNAiso Blood (製品コード 9113) *	200 ml

- *： タンパク質変性剤が含まれているので、皮膚や服などへの接触を避けてください。
万が一、目や皮膚についた場合は、直ちに多量の水で洗い流し、医師の診断を受けてください。

【本製品以外に必要な試薬】

- ・クロロホルム
- ・イソプロパノール
- ・75% エタノール [DEPC 水を用いて調製]
- ・RNase-free water

II. 保存

4℃
品質保持のため、遮光して保存してください。

III. RNA を取り扱う際の一般的注意事項

1. 市販の滅菌ディスポーザブルプラスチック器具類は通常 RNase フリーと考えてよく、そのまま実験に用いてもさしつかえありませんが、マイクロ遠心チューブやマイクロピペット用チップなどはオートクレーブ処理を行った後用いてください。ガラス器具、スパーテルなどを用いる場合には、160℃で少なくとも2時間以上乾熱滅菌を行ってください。乾熱滅菌できないものは、0.1% ジエチルピロカーボネート (DEPC) 溶液で37℃、12時間処理した後、オートクレーブ処理を行ってから (DEPC による RNA のカルボキシメチル化を防ぐ) 用いてください。RNA 実験用の器具類は他と明確に区別しておく必要があります。
2. 試薬類は可能な限り 0.1% DEPC 処理水で調製し、オートクレーブ処理を行ってから使用してください。オートクレーブ処理が不可能な試薬が含まれている場合には、あらかじめ滅菌操作を行った器具類、水などを用いて溶液を調製し、ろ過滅菌後に使用してください。
3. RNase が混入する最も大きな要因は、素手からの持ち込みです。RNA を用いた実験を行う際には必ず使い捨てのプラスチック手袋とマスクを着用してください。

IV. 実験例

1. RNAiso Blood の使用量の目安

サンプルの種類と量*1	RNAiso Blood 使用量 (ml)
0.01*2 ~ 0.25 ml の液体サンプル (血液、生体液、果実破碎液など)	液体サンプル容量の3倍量 (0.25 ml の生体液を使用した場合は、 0.75 ml の RNAiso Blood を使用する。)

* 1 : 多糖類を多く含む植物サンプルには Fruit-mate™ for RNA Purification (製品コード 9192) での前処理をお勧めします。

* 2 : 微量サンプルからの抽出の場合は、イソプロパノール沈殿時に Gen とるくん™ エタ沈キャリア (製品コード 9094) を利用することをお勧めします。

2. 試料について

A. 血液サンプル

- 1) 生体から採取した血液を抗凝固剤と混合後、当日に RNA 抽出を行う場合は 4℃ 保存、後日抽出する場合は -80℃ で保存する。
- 2) 0.25 ml の液体血液サンプルもしくは凍結血液サンプルを遠心チューブに移し、0.75 ml の RNAiso Blood を加える。
- 3) 上下に十分なピペティングを行い、細胞を溶解する。(ボルテックスでの溶解はゲノム DNA の粘性があるため、お勧めできません。)

B. 血液以外の生体液サンプル

- 1) サンプルを採取後、当日に RNA 抽出を行う場合は 4℃ 保存、後日抽出する場合は -80℃ で保存する。
- 2) 0.25 ml の液体サンプルもしくは凍結サンプルを遠心チューブに移し、0.75 ml の RNAiso Blood を加える。
- 3) 上下に十分なピペティングを行い、細胞を溶解する。(ボルテックスでの溶解はゲノム DNA の粘性があるため、お勧めできません。)

C. 水分の多い植物の組織サンプル

- 1) 凍結組織は、速やかに乳鉢の中に移し、液体窒素を加えながら粉末状になるまで磨砕する(細かく磨砕しないと RNA の質や回収率に影響する恐れがある)。その後、サンプル量に応じて体積当たり 3 倍量の RNAiso Blood を加え、ホモジナイズする。新鮮組織サンプルの場合は、採取後速やかに体積当たり 3 倍量の RNAiso Blood を加えて完全にホモジナイズする。

(注 1) 水分の少ない組織サンプルを用いる場合は、サンプルを 0.25 ml 体積になるように RNA-free water で希釈してから、RNAiso Blood を加えて RNA 抽出してください。

(注 2) 多糖類を多く含むサンプルを Fruit-mate for RNA Purification で処理して用いる場合は、Fruit-mate の取扱説明書に基づき処理したサンプル液 0.5 ml に 0.5 ml の RNAiso Blood を添加する。

- 2) 磨砕 (ホモジナイズ) したサンプルを遠心チューブに移し、室温 (15 ~ 30°C) で 5 分置く。

3. total RNA の抽出

- 1) 前述の操作で得られた溶液に、クロロホルムを開始容量 (サンプルの液量 + RNAiso Blood の液量) の 0.2 倍量加え、遠心チューブのフタをして、乳白状になるまでよく振りまぜる。
- 2) 室温で 5 分間置く。
- 3) 12,000 × *g* で 15 分間、4°C にて遠心を行う。遠心分離により、水層の上層 (RNA を含む)、半固体の中間層 (大部分の DNA)、有機溶媒層の下層の三層に分かれる。
- 4) 中間層に触れないよう十分に注意して、上層の水層を新しい遠心チューブに移す。
- 5) 上層 (水層) の液量と等量のイソプロパノールを加えてよく混合し、室温で 10 分間静置する。
- 6) 12,000 × *g* で 10 分間、4°C にて遠心し RNA を沈殿させる。

4. RNA 沈殿の洗浄

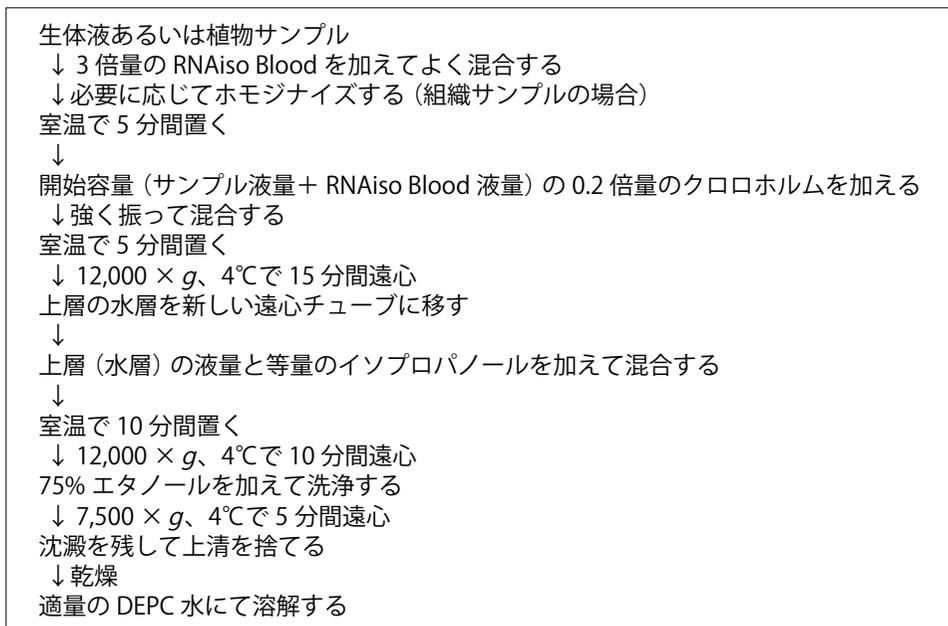
上清を捨て、等量の 75% 冷エタノールを加える。ボルテックスで攪拌して沈殿物を洗浄する。7,500 × *g* で 5 分間、4°C で遠心し、上清を捨てる。

5. RNA の溶解

室温で数分間乾燥させた後、適量の RNase-free water で溶解する。

注) RNA が溶解しにくくなる場合がありますので、遠心乾燥や加熱乾燥をしないでください。

V. RNA 抽出のフローチャート



VI. RNA の純度検定

アガロースゲル電気泳動による検定

1% アガロースゲルを用いて、0.2 ~ 1 μg の熱変性を行った total RNA を電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色を行います。分解の起こっていない total RNA では 2 本のリボソーム RNA (真核細胞：28S と 18S、原核細胞：23S と 16S) のはっきりとしたバンドがおおよそ 2 : 1 の割合で見られますが、リボソーム RNA のバンドが薄く、スミアなパターンが見られる場合は、RNA が分解している可能性があります。また、28S または 23S のバンドよりも分子量の大きいバンドがある場合は、ゲノム DNA の混入が考えられますので DNase I による処理を行ってください。

この検定はアジレント 2100 バイオアナライザを用いるとより正確に行えます。

RNA の純度検定の詳細は、下記ウェブページ掲載の「Agilent Array 発現解析 サンプル準備の手引き」に詳しく説明していますので、ご参照ください。

受託サービス > 遺伝子工学研究支援 | 遺伝子発現解析受託 (トランスクリプトーム解析) > Agilent Array 発現解析 > 受入サンプル

https://catalog.takara-bio.co.jp/jutaku/basic_info.php?catcd=B1000482&subcatcd=B1000485&unitid=U100005968

吸光度による検定

TE Buffer を希釈液として用いて吸光度を測定し、OD₂₆₀/OD₂₈₀ の比率を求めます。OD₂₆₀/OD₂₈₀ の比率が 1.7 ~ 2.1 の範囲に入るのが望ましい状態です。

(参考)

RNA 濃度の計算方法：RNA 濃度 (μg/μl) = (OD₂₆₀ - OD₃₂₀) × 希釈倍率 × 0.04

VII. トラブルシューティング

1. 収量が少ない

回収可能な RNA 量は、用いた試料によって異なります。下記の表に、RNAiso Blood を用いて 0.25 ml の液体サンプルあるいは 50 mg の水分を多く含む植物より抽出できる RNA 量の目安を示します。

サンプル	サンプル量	total RNA 抽出量
ヒト全血	0.25 ml	1 ~ 10 μ g
マウス全血	0.25 ml	1 ~ 10 μ g
ウシ全血	0.25 ml	1 ~ 10 μ g
コイ全血	0.25 ml	10 ~ 100 μ g
ハウレンソウ葉	50 mg	30 ~ 60 μ g
トマト果実	50 mg	1 ~ 10 μ g
オレンジ果実	50 mg	1 ~ 10 μ g

予想された収量よりも著しく収量が少なかった場合、下記の原因が考えられます。

- RNAiso Blood を加えた後の試料のホモジナイズが不十分であった。
- 3 層に分離した後の、水層の回収が不十分だった。
- RNA 沈殿の溶解が不十分だった。
- イソプロパノール沈殿や洗浄工程で、RNase が混入した。
- イソプロパノール沈殿や洗浄工程で、RNA 沈殿物を流出した。
 - イソプロパノール沈殿時に Gen とるくんエタ沈キャリア (製品コード 9094) を利用することをお勧めします。
- 水分の少ない組織サンプルに対して、希釈なしに RNAiso Blood を用いて抽出した。
 - 水分の少ない組織サンプルを用いる場合は、サンプルを 0.25 ml 体積になるように RNA-free water で希釈してから、RNAiso Blood を加えて RNA 抽出してください。

2. OD₂₆₀/OD₂₈₀ の値が低い (< 1.65)

- RNA は TE Buffer で希釈後、吸光度の測定を行ってください。イオン強度や pH 値が低い場合、OD₂₈₀ 値が上昇することがあります。
- RNAiso Blood 添加後 (ホモジネート後) 室温で 5 分間静置する工程は、核酸から核タンパク質を解離させるために重要です。
- 上清を採取する際、チップの先が中間層に触れないよう注意してください。
- 抽出した RNA を十分に溶解してください (3. 参照)。

3. 抽出した RNA が溶解しない

- 75% エタノールによる洗浄後、乾燥させすぎると溶解が困難になります。加熱乾燥したり、乾燥時間が長過ぎたりしないよう注意してください。
- 60℃で 5 分間加熱した後、氷上に数時間おくことで溶解する場合があります。

4. 抽出した RNA が分解している

- RNA 抽出に使用するサンプルは、採取直後の新鮮なもの、あるいは液体窒素で瞬間凍結後、- 80℃保存したものを使用してください。
- RNA 抽出に使用したサンプルや器具に RNase が混入していた可能性があります。

5. 抽出した RNA に DNA が混入している
 - ・ 使用したサンプル中に大量な有機溶剤（エタノール、イソプロパノールなど）、高濃度のバッファー、アルカリ性の溶剤が含まれていた可能性があります。
 - ・ 抽出した RNA に DNA が含まれている場合は、Recombinant DNase I (RNase-free) (製品コード 2270A) で処理することを推奨します。

6. 抽出した RNA の中に多糖が含まれている

多糖類を多く含む植物サンプルの場合は、Fruit-mate for RNA Purification (製品コード 9192) を用いた前処理をお勧めします。また、High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (製品コード 9193) を、イソプロパノール沈殿処理時に添加すると、多糖類の除去に効果があります。

VIII. 参考文献

- 1) J Chirgwin, *et. al.* "Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease". *Biochemistry*. (1979) **18** (24): 5294-5299.
- 2) D. Wallace. "Large-and Small-Scale Phenol Extractions". *Methods in Enzymology*. (1987) **152**: 33-41.
- 3) Coombs L M, Pigott D, Proctor A, Eydmann M, Denner J, and Knowles M A. "Simultaneous Isolation of DNA, RNA, and Antigenic Protein Exhibiting Kinase Activity from Small Tumor Samples Using Guanidine Isothiocyanate". *Anal Biochem*. (1990) **188**: 338-343.
- 4) Nicolaides N C & Stoeckert Jr C J. "A Simple, Efficient Method for the Separate Isolation of RNA and DNA from the Same Cells". *Biotechniques*. (1990) **8**: 154-156.
- 5) J R Feramisco, *et. al.* *Molecular Cloning*. : 194-195. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- 6) Raha S, Merante F, Proteau G , and Reed J K. "Simultaneous Isolation of Total Cellular RNA and DNA from Tissue Culture Cells Using Phenol and Lithium Chloride". *Gene Anal Techn*. (1990) **7**: 173-177.

IX. 関連製品

RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)
Gen とるくん™ エタ沈キャリア (製品コード 9094)
Fruit-mate™ for RNA Purification (製品コード 9192)
High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (製品コード 9193)
Recombinant DNase I (RNase-free) (製品コード 2270A/B)
PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (製品コード RR047A/B)

X. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Gen とるくん、Fruit-mate、PrimeScript はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995
ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社