

製品コード 9186

研究用

Takara

**Magnosphere™ UltraPure
mRNA Purification Kit**

説明書

v201706Da

Magnosphere UltraPure mRNA Purification Kit は、培養細胞や動物組織などの total RNA から ribosomal RNA (rRNA) 混入率が極めて低い高純度の polyA⁺ RNA を分離・精製するためのキットです。本キットに含まれる Magnosphere Oligo-dT Beads は、JSR ライフサイエンス株式会社により開発された磁性粒子で、高純度の核酸分離が可能です。均一な粒子径を持ち、超常磁性を有するため磁石による効率的な分離が可能で、残留磁化が無いため再分散性にも優れています。これにより、分離操作は磁石を用いて迅速・簡便に行うことができ、遠心操作は不要です。また、従来の磁性粒子と比べて粒子表面への夾雑物の非特異吸着が抑制され、標的物質である polyA⁺ RNA を特異的に効率よく回収できます。そのため、磁性粒子以外の担体を使用した polyA⁺ RNA 精製キットと比べて、より微量な total RNA からの精製に最適です。標準的な実験例の場合、一回の操作で 5 ~ 50 μ g の total RNA より rRNA 混入率が極めて低い高品質 polyA⁺ RNA が 0.5 ~ 2% の収量で回収できます。rRNA 含有率の少ない polyA⁺ RNA を必要とする各種アプリケーション (高速シーケンス、ランダムプライマーによる cDNA 合成など) 用のサンプル調製に非常に有効です。

I. 内容 (20 回用) *1

1. Magnosphere Oligo-dT Beads*2	400 μ l
2. 2 × Binding Buffer	7 ml
3. Wash Buffer	24 ml
4. RNase-free Water	1.4 ml

Magnosphere Oligo-dT Beads

Magnetic beads 1% (W/V) Suspension	
10 mg/ml	Oligo(dT) ₃₀ 固定化磁性粒子
25 mM	Tris-HCl
150 mM	NaCl
0.05%	Tween 20
0.09%	NaN ₃ *3

* 1 : total RNA 5 ~ 50 μ g の処理を 1 回分とします。

* 2 : Magnosphere Oligo-dT Beads は、JSR ライフサイエンス株式会社により製造されたものです。

* 3 : NaN₃ は金属と反応して、爆発性の高い金属アジドを生成することがありますので、廃棄の際は大量の水と共に洗い流してください。

II. キット以外に必要な試薬、器具

磁気スタンド

- Magnetic Stand (6 tubes) (製品コード 5328) など

サーマルサイクラー (65°C、熱変性用)

ヒートブロック (80°C、インキュベート用)

各種低吸着性チューブ

- 0.2 ml チューブ

- 1.5 ml チューブ

分光光度計

- 微量サンプルの濃度測定には、超微量分光光度計 NanoDrop シリーズの使用を推奨します。

Agilent 2100 Bioanalyzer、Agilent RNA 6000 Nano Assay および Agilent RNA 6000 Pico Assay 関連試薬

III. 保存 4°C (Magnosphere Oligo-dT Beads は凍結厳禁)

IV. total RNA サンプルの調製について

本製品は total RNA から polyA⁺ RNA を精製するキットです。高純度で全長を有する polyA⁺ RNA を回収するには、純度の高い total RNA サンプルを得ることが重要です。そのために、細胞に含まれる RNase の作用を抑えること、また使用する器具や溶液などの外部からの RNase の混入を避けることが大切です。RNA 調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は不必要に話をせず、清潔なディスポーザブルグローブを着用し、RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。

[器具]

実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用してください。一般のガラス器具は以下の処理を行ってから使用してください。

- 1) ガラス器具を 0.1% ジエチルピロカーボネート (DEPC) 溶液で、37℃、12 時間以上処理する。
- 2) 残存 DEPC を除去するために、オートクレーブ (120℃、30 分) する。

RNA 実験に用いる器具 (プラスチックおよびガラス) は、他の器具と区別して RNA 専用として用いることをお勧めします。

[溶液]

実験に用いる試薬は、乾熱滅菌 (180℃、60 分) したガラス器具で調製し、あらかじめ 0.1% DEPC 処理を行いオートクレーブした滅菌精製水または超純水で溶解します。用いる溶液、滅菌精製水、超純水はすべて RNA 実験専用としてお使いください。

[total RNA サンプルの調製法]

AGPC 法 (酸性グアニジウム-フェノールクロロホルム法) 等で高純度に精製した total RNA を調製することができます。細胞、組織からの抽出には RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) や NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250) を用いると、短時間で高純度の total RNA を調製することができます。

V. Magnosphere Oligo-dT Beads 使用上の注意

1. 試薬溶液中に凝集を認める場合には、ピペティングによりよく分散させてからご使用ください。
2. 本品を強酸性条件下で使用することは避けてください。
3. 本品には防腐剤として 0.09% アジ化ナトリウムを添加しておりますが、開封後の雑菌汚染には十分注意してください。
4. 長時間冷蔵保存した場合、磁性粒子が沈降することがあります。使用前に 37℃ に保温してよく攪拌し、十分に懸濁してからご使用ください。懸濁はピペティングまたはタッピングによって行い、激しいボルテックスは避けてください。
5. 上清中の polyA⁺ RNA が少量の場合、溶存する試薬成分の影響により、正確な吸光度測定ができないことがあります。このような場合にはフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い溶存する試薬成分を除去してください。エタノール沈殿には Gen とるくん™ エタ沈キャリア (製品コード 9094) を用いると、短時間で高濃度の polyA⁺ RNA を回収することができます。

VI. 操作

作業前に予め下記試薬類を適切な温度に戻し、必要な温度の機器を準備してください。2 × Binding Buffer は、保存中に析出する場合があります。37℃で保温しつつ穏やかに混合し、完全に溶解してから使用してください。

- Magnosphere Oligo-dT Beads : 室温
- 2 × Binding Buffer : 37℃で保温
- Wash Buffer と RNase-free Water : 室温
- サーマルサイクラー : 65℃
- ヒートブロック : 80℃

※ 各工程では、必ず低吸着性チューブを使用してください。

※ 以下の操作 A) および B) は、5 ~ 50 μg の total RNA を処理する場合の操作手順です。50 μg を超える量の total RNA を一度に処理する場合は、使用する磁性粒子 (Magnosphere Oligo-dT Beads) の使用量を RNA の量にあわせてスケールアップしてください。

例えば、250 μg の total RNA を処理する場合は、磁性粒子を 5 倍使用してください。ステップ A)-6. で磁性粒子を再懸濁する 2 × Binding Buffer の量も total RNA 水溶液と等量になるよう増やしてください。

なお、この場合、他のステップに使用するバッファー (2 × Binding Buffer、Wash Buffer) や RNase-free Water の量は、下記プロトコールから増やす必要はありません。

A) 磁性粒子 (Magnosphere Oligo-dT Beads) の使用前準備

1. 予め室温に戻した磁性粒子 (Magnosphere Oligo-dT Beads) を十分懸濁し、均一にする。20 μl を 1.5 ml チューブに添加する。
2. 予め 37℃で保温した 2 × Binding Buffer を 100 μl 用いて磁性粒子を懸濁する。
注：必ず 2 × Binding Buffer を使用してください。
3. 磁気スタンドに 1 分以上静置する。
4. 磁性粒子を吸い込まないように注意しながら上清を除去する。
5. ステップ A)-2 ~ 4. の操作を繰り返す。
6. 磁気スタンドから取り外し、ステップ B)-1. で使用する total RNA 水溶液と等量 (50 ~ 100 μl) の 2 × Binding Buffer で磁性粒子を再懸濁する。

B) polyA⁺ RNA 精製

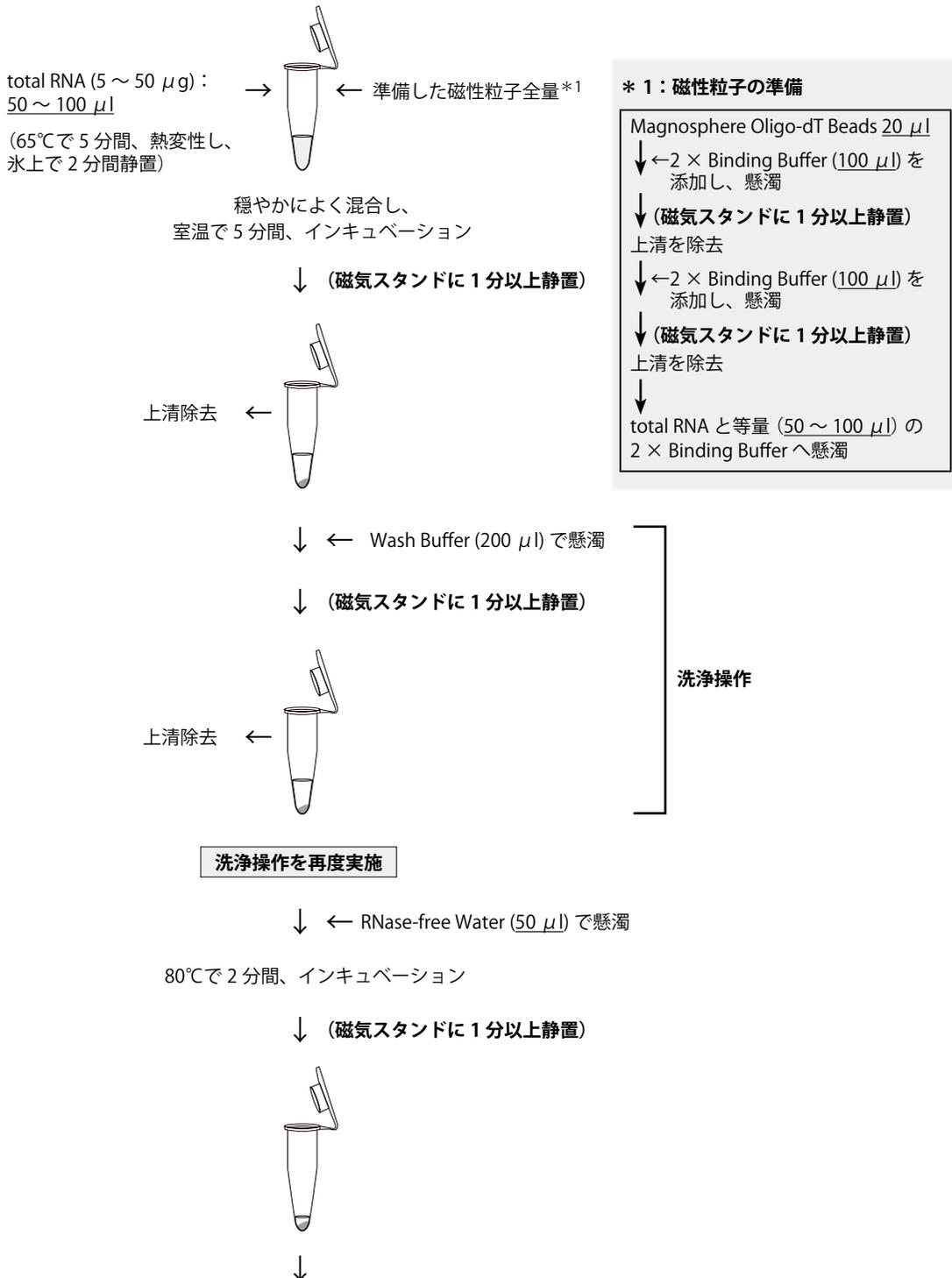
1. total RNA (5 ~ 50 μg) を含む水溶液 50 ~ 100 μl を 0.2 ml チューブに準備する。
2. サーマルサイクラーにて 65℃で 5 分間熱変性後、氷上に 2 分間静置する。
3. ステップ A) で準備した磁性粒子懸濁液にステップ B)-2. で熱変性した total RNA 水溶液全量を加え、穏やかによく混合する。
4. 室温で 5 分間静置する。
注：磁気スタンドには挿さないでください。
5. 磁気スタンドに 1 分以上静置する。
6. 磁性粒子を吸い込まないように注意しながら上清を除去する。
7. 磁気スタンドから取り外し、200 μl の Wash Buffer で磁性粒子を懸濁する。
8. 磁気スタンドに 1 分以上静置する。
9. 磁性粒子を吸い込まないように注意しながら上清を除去する。
10. ステップ B)-7 ~ 9. の操作を繰り返す。

-
11. 50 μ l の RNase-free Water で磁性粒子をよく懸濁する。
 12. ヒートブロックにて 80°C で 2 分間インキュベートする。
 13. 磁気スタンドに 1 分以上静置する。
 14. 磁性粒子を吸い込まないように注意しながら上清を新しい 0.2 ml チューブに回収する。
注：この時、磁性粒子は捨てないでください。
 15. 回収した上清へ 2 × Binding Buffer を 50 μ l 添加し、混合する。ステップ B)-20. で使用するまで室温で保管する。
 16. ステップ B)-14. で残した磁性粒子を 200 μ l の Wash Buffer で懸濁する。
注：必ず Wash Buffer を使用してください。
 17. 磁気スタンドに 1 分以上静置する。
 18. 磁性粒子を吸い込まないように注意しながら上清を除去する。
 19. ステップ B)-16 ~ 18. の操作を繰り返す。
 20. ステップ B)-15. で調製した溶液 (100 μ l) をサーマルサイクラーにて 65°C で 5 分間熱変性後、氷上に 2 分間静置する。
 21. ステップ B)-19. で洗浄した磁性粒子に、ステップ B)-20. で熱変性した RNA 溶液 (100 μ l) を加え、懸濁する。
 22. 室温で 5 分間静置する。
注：磁気スタンドには挿さないでください。
 23. 磁気スタンドに 1 分以上静置する。
 24. 磁性粒子を吸い込まないように注意しながら上清を除去する。
 25. 磁気スタンドから取り外し、200 μ l の Wash Buffer で磁性粒子を懸濁する。
 26. 磁気スタンドに 1 分以上静置する。
 27. 磁性粒子を吸い込まないように注意しながら上清を除去する。
 28. ステップ B)-25 ~ 27. の操作を繰り返す。
 29. 磁気スタンドから取り外し、20 μ l の RNase-free Water で磁性粒子をよく懸濁する。
 30. ヒートブロックにて 80°C で 2 分間インキュベートする。
 31. 磁気スタンドに 1 分以上静置する。
 32. 磁性粒子を吸い込まないように注意しながら上清を新しいチューブに回収し、- 80°C にて保存する。

注：RT-PCR を行う場合など、微量な夾雑 DNA を完全に除去する必要がある場合は、回収した RNA 溶液を Recombinant DNase I (RNase-free) (製品コード 2270A/B) などさらに DNase I 処理することを推奨します。

【操作フロー】

- 各工程では、必ず各種低吸着性チューブを使用してください。
- 各試薬は、適切な温度 (VI. 操作 参照) に戻して使用してください。



上清 50 μ l を回収 (磁性粒子は捨てずに洗浄を実施*2)

↓ ← 2 × Binding Buffer (50 μ l)
を添加し、混合

65°Cで5分間、熱変性し、氷上で2分間静置

↓



熱変性した RNA 溶液 (100 μ l)
を洗浄した磁性粒子*2へ添加し、懸濁

*** 2 : 磁性粒子の洗浄**

残した磁性粒子

↓ ← Wash Buffer (200 μ l) で懸濁

↓ (磁気スタンドに1分以上静置)

上清を除去

↓

上記洗浄操作を再度実施

室温で5分間、インキュベーション

↓ (磁気スタンドに1分以上静置)



上清除去 ←

↓ ← Wash Buffer (200 μ l) で懸濁

↓ (磁気スタンドに1分以上静置)



上清除去 ←

洗浄操作

洗浄操作を再度実施

↓ ← RNase-free Water (20 μ l) で懸濁

80°Cで2分間、インキュベーション

↓ (磁気スタンドに1分以上静置)

上清 (polyA⁺ RNA) を回収

VII. polyA⁺ RNA の収量と純度の確認

・吸光度測定による収量、純度確認

吸光度を測定して、精製した polyA⁺ RNA の収量および純度を確認します。吸光度測定に使用できる polyA⁺ RNA 量が微量の場合は、超微量分光光度計 NanoDrop シリーズの使用を推奨します。NanoDrop シリーズの操作手順に関しては、機器付属の取扱説明書に従って行ってください。polyA⁺ RNA 溶液の濃度が NanoDrop シリーズの検出限界を下回ると予想される場合は、Agilent 2100 Bioanalyzer を利用するか、共沈剤として Gen とるくんエタ沈キャリア（製品コード 9094）を使用してエタノール沈殿による濃縮操作を行ってください。

・Agilent 2100 Bioanalyzer による収量、純度確認

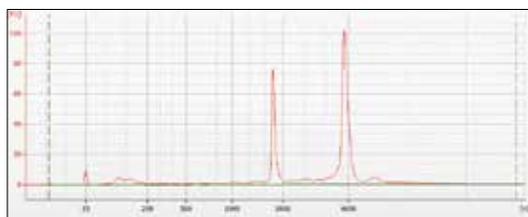
アジレント 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies 社) および RNA 6000 Lab Chip キットを用いて、精製した polyA⁺ RNA の収量および純度を確認します。高純度の polyA⁺ RNA では ribosomal RNA 混入率が極めて低い泳動パターンが確認できます (VIII. 実験例 参照)。分子量の極端に小さい泳動パターンがみられる場合は、RNA が分解している可能性があります。また、分子量の大きいなだらかな波形がある場合や泳動パターンが乱れる場合は、ゲノム DNA 混入の可能性が考えられますので必要に応じて DNase I 処理を行ってください。

VIII. 実験例

1. ヒト細胞株 HeLa S3 由来 total RNA 10 μ g、50 μ g からの polyA⁺ RNA 精製

[方法] ヒト細胞株 HeLa S3 由来 total RNA 10 μ g、50 μ g を含む水溶液 100 μ l よりプロトコルに従い polyA⁺ RNA を精製した。得られた polyA⁺ RNA 溶液を必要に応じて希釈し、Agilent 2100 バイオアナライザによる解析を行った。

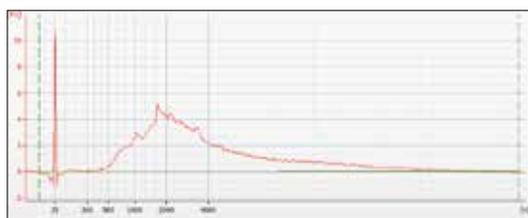
[結果] rRNA の混入率が極めて低い高純度の polyA⁺ RNA が、それぞれ 0.2 μ g、0.7 μ g 調製できました (NanoDrop で測定)。



RNA concentration : 137.6 ng/ μ l
RIN * : 10.0

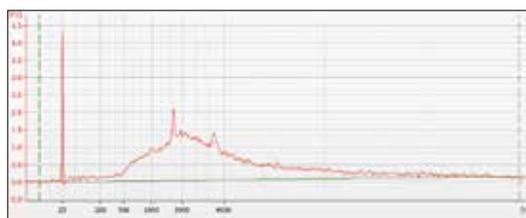
* : Agilent 2100 バイオアナライザによる RNA の品質評価の指標となる数値です。RNA の分解度が 10 段階に分類され、数値が大きいほど高品質となります。

[total RNA]



[total RNA 10 μ g から精製した polyA⁺ RNA]

RNA concentration : 821.5 pg/ μ l
rRNA contamination : 0.7%



[total RNA 50 μ g から精製した polyA⁺ RNA]

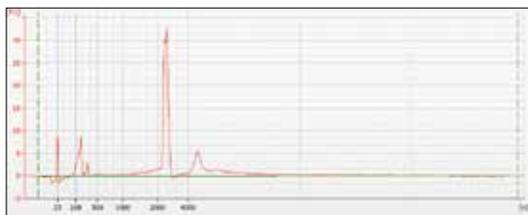
RNA concentration : 77.5 ng/ μ l
rRNA contamination : 1.2%

図 1. ヒト細胞由来 total RNA からの polyA⁺ RNA 精製結果 (Agilent 2100 バイオアナライザ解析)

2. 昆虫細胞株 Sf9 由来 total RNA 10 μg からの polyA⁺ RNA 精製

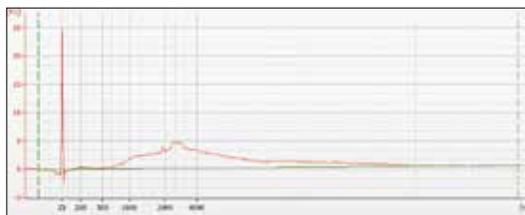
[方法] 昆虫細胞株 Sf9 由来 total RNA 10 μg を含む水溶液 100 μl よりプロトコールに従い polyA⁺ RNA を精製した。得られた polyA⁺ RNA 溶液を必要に応じて希釈し、Agilent 2100 バイオアナライザによる解析を行った。

[結果] rRNA の混入率が極めて低い高純度の polyA⁺ RNA が 0.3 μg 調製できました (NanoDrop で測定)。



[total RNA]

RNA concentration : 1.0 ng/ μl



[polyA⁺ RNA]

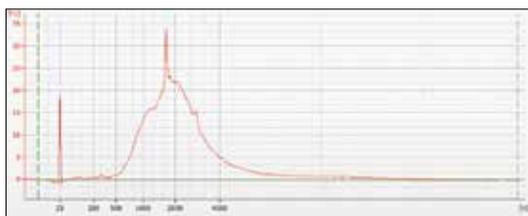
RNA concentration : 1.0 ng/ μl
rRNA contamination : 0.4%

図 2. 昆虫細胞由来 total RNA からの polyA⁺ RNA 精製結果 (Agilent 2100 バイオアナライザ解析)

3. タバコ細胞株 BY-2 由来 total RNA 10 μg および酵母 AH109 株由来 total RNA 10 μg からの polyA⁺ RNA 精製

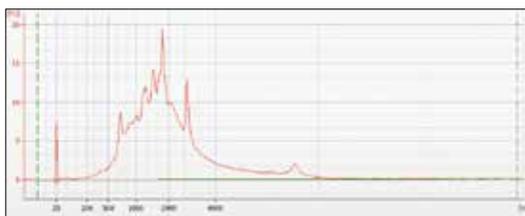
[方法] タバコ細胞株 BY-2 由来 total RNA 10 μg および酵母 AH109 株由来 total RNA 10 μg を含む水溶液 50 μl よりプロトコールに従い polyA⁺ RNA を精製した。得られた polyA⁺ RNA 溶液を必要に応じて希釈し、Agilent 2100 バイオアナライザによる解析を行った。

[結果] rRNA の混入率が極めて低い高純度の polyA⁺ RNA が、それぞれ 100 ng、90 ng 調製できました (NanoDrop で測定)。



[タバコ細胞株 BY-2 由来 polyA⁺ RNA]

RNA concentration : 3.1 ng/ μl
rRNA contamination : 3.2%



[酵母 AH109 株由来 polyA⁺ RNA]

RNA concentration : 3.5 ng/ μl
rRNA contamination : 6.4%

図 3. タバコ細胞および酵母由来 total RNA からの polyA⁺ RNA 精製結果 (Agilent 2100 バイオアナライザ解析)

注: 生物種によっては rRNA contamination (%) を正確に算出できない場合があります。

IX. トラブルシューティング

1. polyA⁺ RNA の収量が少ない。
 - 5 ~ 50 μ g より著しく少ない、もしくは多い total RNA 量を使用した場合、収量が低下する場合があります。
→ 指定範囲 (5 ~ 50 μ g) 内の total RNA 量を使用してください。
 - 5 ~ 50 μ g の total RNA 量を使用したにも関わらず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。
 - 1) 磁性粒子に total RNA を加えた際の混合が不十分だった。
→ プロトコルに従い十分混合してください。
 - 2) ハイブリおよび洗浄時など、上清を除去する際に磁性粒子を吸い込んだ。
→ 磁性粒子を吸い込まないように十分注意してください。
 - 3) 磁気スタンドに挿している時間が短い。
→ プロトコルに従い適切な時間、磁気スタンドに置いてください。
 - 4) 操作中に RNase が混入した。
→ RNA サンプルおよび使用する試薬・器具類の取り扱いには十分注意してください。
 - 5) 出発材料となる total RNA が分解していた。
→ 新鮮な組織や細胞から新たに total RNA を抽出してください。その際、polyA⁺ RNA 精製を行う前に total RNA に分解が無いことを確認してください。
 - 6) 出発材料となる total RNA に不純物が混入していた。
→ total RNA を再精製し不純物を除くか、NucleoSpin RNA や RNAiso Plus などの RNA 精製キットにより、新たに高純度 total RNA の再調製を行ってください。
 - 7) 溶出に使用する RNase-free Water への懸濁と加熱が不十分であった。
→ プロトコルに従って懸濁し、適切な温度に加熱してください。
 - 8) polyA⁺ RNA 含有率の低い細胞や組織などからの total RNA を使用した。
→ polyA⁺ RNA の収量は細胞や組織の種類、発生段階などで変動します。必要に応じて予め標的とする細胞や組織からの polyA⁺ RNA 予備精製を行い、収量を確認してください。
 - 9) polyA⁺ RNA 精製が難しい生物種由来の total RNA を使用した。
→ 生物種によっては polyA⁺ RNA の精製が難しい場合があります。必要に応じて予め標的とする生物種由来の total RNA から polyA⁺ RNA 精製を試してください。
2. polyA⁺ RNA の純度が悪い。rRNA の混入が多くみられる。
 - 指定範囲外の total RNA 量を使用した場合、得られる polyA⁺ RNA の純度が低下する場合があります。
→ 指定範囲 (5 ~ 50 μ g) 内の total RNA 量を使用してください。
 - 使用した total RNA に不純物が多く含まれていると polyA⁺ RNA の精製に影響する場合があります。
→ polyA⁺ RNA 精製に使用する total RNA は高純度のものを準備してください。
 - 生物種により rRNA の除去が難しい場合があります。
→ 必要に応じて予め標的とする生物種由来の total RNA から polyA⁺ RNA 精製を試してください。

-
3. 精製した polyA⁺ RNA が分解されている。
- ・ 操作中に RNase が混入した。
→ RNA サンプルおよび使用する試薬・器具類の取り扱いには十分注意してください。
 - ・ 出発材料となる total RNA が分解していた。
→ 新鮮な組織や細胞から新たに total RNA を抽出してください。その際、polyA⁺ RNA 精製を行う前に total RNA に分解が無いことを確認してください。
 - ・ polyA⁺ RNA 精製に使用した器具類に RNase が混入していた。
→ RNase-OFF™ (製品コード 9037) などの RNase 除去剤を用いて、器具類や作業場所の RNase の除去を行ってください。

X. 関連製品

Magnetic Stand (6 tubes) (製品コード 5328)
NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250)
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)
Recombinant DNase I (RNase-free) (製品コード 2270A/B)
RNase-OFF™ (RNase コンタミネーション除去溶液) (製品コード 9037)
Yeast Processing Reagent (for total RNA preparation) (製品コード 9089)
Oligotex-dT30<Super> mRNA Purification Kit (From Total RNA) (製品コード 9086)
PrimeScript™ Double Strand cDNA Synthesis Kit (製品コード 6111A)
cDNA Library Construction Kit (製品コード 6136)
In-Fusion® SMARTer® Directional cDNA Library Construction Kit (製品コード 634933)

XI. 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。
- ・ In-Fusion、SMARTer は Takara Bio USA, Inc. の登録商標です。Gen とるくん、RNase-OFF、PrimeScript は タカラバイオ株式会社の、Magnosphere は JSR 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 <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社