

製品コード 9192

研究用

Takara

Fruit-mate™ for RNA Purification

説明書

v201907Da

Fruit-mate for RNA Purification (以下、Fruit-mate と記載) は、多糖類やポリフェノール類などを大量に含む植物試料(芋、果実、種子など)から RNAiso Plus または NucleoSpin RNA Plant を用いて total RNA を抽出する際に併用する RNA 抽出補助試薬です。Fruit-mate は非イオン性のポリマーを含み、多糖類やポリフェノール類などの物質と結合します。破碎した試料に本製品を加え遠心操作を行うだけで、Fruit-mate と結合した物質を簡単に取り除くことができ、RNA 抽出キットだけでは難しかった植物からの RNA 抽出に効果を発揮します。

RNAiso Plus と組み合わせて使用する場合は、破碎した試料に本製品を加えよく混和した後、遠心操作により不溶物を除きます。採取した上清に等量の RNAiso Plus 溶液を加え、さらにクロロホルムを添加してよく混和した後、遠心操作により 3 層に分離させます。RNA が含まれている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。これにより、約 1 時間で total RNA 抽出の全工程が完了します。

NucleoSpin RNA Plant と組み合わせて使用する場合は、破碎した試料に本製品を加えよく混和後、遠心操作により不溶物を除き採取した上清に RA1 (+DTT) または RAP (+DTT) を加えます。よく混合した後 NucleoSpin Filter にてさらに不純物を除去します。フロースルーに 70% エタノールを加えライセートを調製した後、核酸回収用のシリカメンブレンを装着したカートリッジを用い、微量遠心機を使用するプロトコルにより total RNA を回収します。これにより、約 30 分で純度の高い total RNA が抽出できます。これら分離された total RNA は、RT-PCR、ノーザンブロット分析、mRNA の単離などに用いることができます。

本製品で、total RNA の収率に効果を確認した植物(部位)は、以下の種類です。

《効果があつた植物(部位)》

ミニトマト(果実)、バナナ(果肉)、イチゴ(果肉)、トマト(種子)、米(種子)、ジャガイモ(根茎)、みかん(皮)、松(葉)、アロエ(葉)、マンゴー(果実)、シロイヌナズナ(種子)、菊(葉)、薔薇(葉)

[注意]

本製品は、特に多糖類やポリフェノール類の多い植物専用に設計されていますが、植物種(部位)によっては、改善の効果が見られない場合や、むしろ収率が落ちる場合がありますので、上記以外の植物(部位)をお試しになる場合はご注意ください。

I. 内容

Fruit-mate for RNA purification 100 ml

II. 保存 室温

- ※ 適切に保存した場合、未開封であれば 2 年間安定です。開封後はコンタミネーションに注意し、なるべく早めにご使用ください。
- ※ 本製品を、20℃以下で保存すると沈殿を生じることがあります。沈殿を生じた場合は 37℃で保温し、沈殿を溶解した後、ご使用ください。

III. 本製品以外に必要な試薬（主なもの）

RNAiso Plus と組み合わせる場合

- RNAiso Plus（製品コード 9108/9109）
- クロロホルム
- イソプロパノール
- 75% エタノール
- RNase-free water または TE

NucleoSpin RNA Plant と組み合わせる場合

- NucleoSpin RNA Plant（製品コード 740949.10/.50/.250）*
- 1 M あるいは 2 M DTT 溶液
- 70% エタノール
- 特級エタノール (>99%)
- (• RNase フリー 1.5 ml チューブ)

*： NucleoSpin RNA Plant を使用する際には、以下の試薬を調製してください。
(添加量はキットプロトコールに従ってください。)

- Lysis Buffer RA1 あるいは RAP に最終濃度 10 ~ 20 mM になるよう DTT を添加
- rDNase, RNase-free（凍結乾燥品）を溶解、希釈調製（用時調製）
- Wash Buffer RA3 に特級エタノール (>99%) 添加

IV. 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サ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ことが必要です。
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。

V. 操作方法

V-1. 試料について

Fruit-mate を使用することで効果の認められている植物組織は、多糖類やポリフェノール類を多く含む芋や果実由来の組織（果肉、果皮、種子）などです。実際に効果を確認した植物（部位）は、以下の種類です。下記以外では効果が見られない場合や、むしろ収率が落ちる場合があります。

《効果があった植物（部位）》

ミニトマト（果実）、バナナ（果肉）、イチゴ（果肉）、トマト（種子）、米（種子）、ジャガイモ（根茎）、みかん（皮）、松（葉）、アロエ（葉）、マンゴー（果実）、シロイヌナズナ（種子）、菊（葉）、薔薇（葉）

多糖類やポリフェノール類を少量しか含まない芽生えや若い葉などの組織の場合は、Fruit-mate を使用すると効率が落ちますので、RNAiso Plus または NucleoSpin RNA Plant 単独での使用を推奨します。

V-2. RNA 抽出試薬について

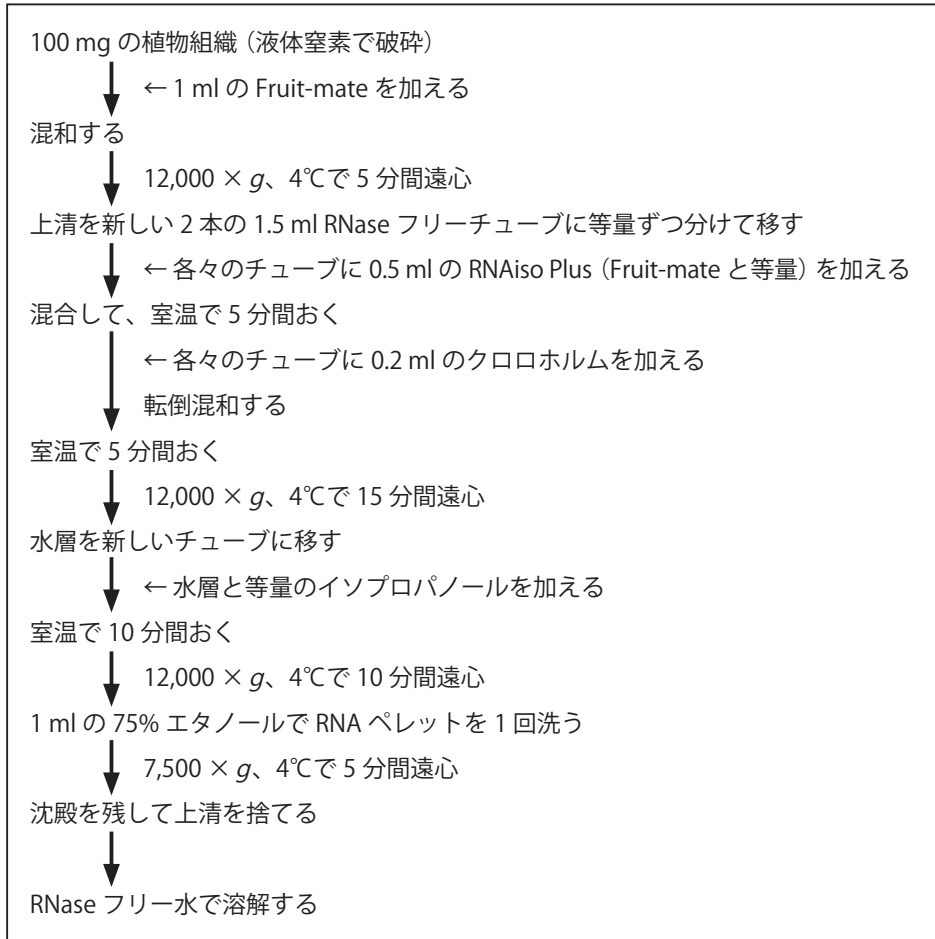
Fruit-mate は RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) または NucleoSpin RNA Plant (製品コード 740949.10/.50/.250) と組み合わせてご使用ください。他の RNA 抽出試薬との組み合わせについては、適合性を確認していません。

V-3. RNAiso Plus と組み合わせて用いる場合

プロトコール 1

- 100 mg 以上の植物組織を乳鉢にいて、液体窒素中で乳棒を用いて破碎する。
- 破碎した植物組織 100 mg を液体窒素で凍らせた 1.5 ml RNase フリーチューブに入れ、Fruit-mate を 1 ml 添加し、破碎物と Fruit-mate をよく混和する。ただちに、12,000 × g で 5 分間、4℃にて遠心する。上清を新しい 2 本の 1.5 ml RNase フリーチューブに等量ずつ分けて移す。
- 各チューブに 0.5 ml の RNAiso Plus (Fruit-mate と等量) を加える。混和して室温で 5 分おく。
- 各チューブに 0.2 ml のクロロホルムを加えて激しく転倒混和し、室温で 5 分おく。12,000 × g で 15 分間、4℃にて遠心する。遠心後、赤い下層の有機溶媒層、中間層、色のない上層の水層に分かれる。RNA は水層に残る。
- 中間層に触れないように十分に注意して、水層を新しいチューブに移す。
- 水層と等量のイソプロパノールを加え、室温で 10 分おく。12,000 × g で 10 分間、4℃にて遠心する。RNA はゲル状にチューブのサイドから底に沈殿する。
- 上清を除き、RNA ペレットを少なくとも 1 ml の 75% エタノールで 1 回洗う。7,500 × g で 5 分間、4℃にて遠心する。
- 沈殿を残して上清を取り除く。
- 得られた沈殿を室温で乾燥させた後、適量の RNase-free water で溶解する。
[注意] 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。

フローチャート 1 (プロトコール 1: RNAiso Plus との組み合わせ)



実験結果例 1 (RNAiso Plus との組み合わせ)

下記の植物組織から、プロトコール 1 に従って total RNA 抽出を行い、Fruit-mate による処理を行わなかった場合と抽出効果を比較した。

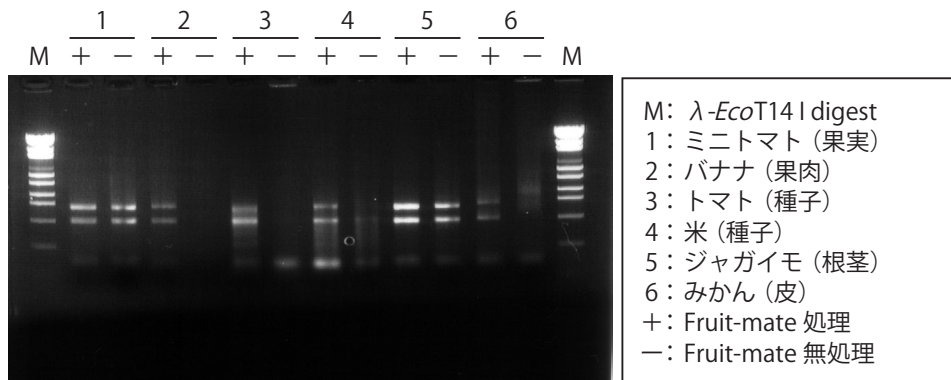


図 1. Fruit-mate 処理 (+) / 無処理 (-) 後に RNAiso Plus で抽出した total RNA の電気泳動結果

V-4. NucleoSpin RNA Plant と組み合わせて用いる場合

プロトコール2

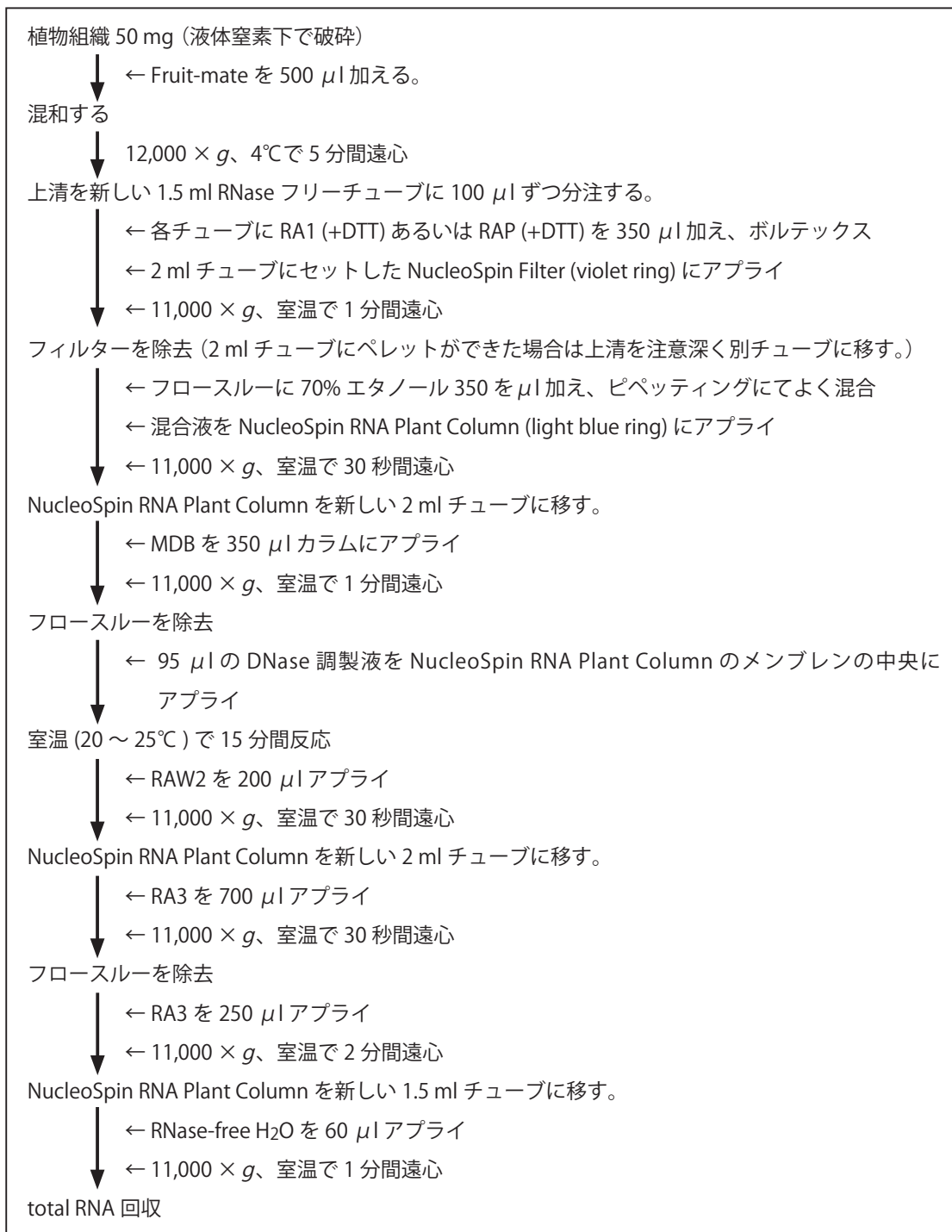
1. 100 mg 以上の植物組織を乳鉢に入れて、液体窒素中で乳棒を用いて破碎する。
2. 破碎した植物組織 50 mg を液体窒素で凍らせた 1.5 ml RNase フリーチューブに入れ、Fruit-mate を 500 μ l 添加し、破碎物とよく混合する。
3. ただちに 12,000 $\times g$ で 5 分間、4℃にて遠心する。上清を注意深く新しい 1.5 ml RNase フリーチューブに 100 μ l ずつ分けて移す。
4. 上清 100 μ l に対し、RA1 (+DTT) あるいは RAP (+DTT) を 350 μ l 加え、ボルテックスにてよく混合する。
5. 2 ml チューブにセットした NucleoSpin Filter (violet ring) にアプライし、11,000 $\times g$ で 1 分間、室温にて遠心する。
6. NucleoSpin Filter を除去する。(2 ml チューブにペレットができた場合は上清を注意深く別チューブに移す。)

フロースルーに 70% エタノールを 350 μ l 加え、ピペettingにてよく混合する。混合液を NucleoSpin RNA Plant Column (light blue ring) にアプライする。11,000 $\times g$ で 30 秒間、室温にて遠心する。
7. NucleoSpin RNA Plant Column を新しい 2 ml チューブに移す。350 μ l の MDB をカラムにアプライし、11,000 $\times g$ で 1 分間、室温にて遠心する。フロースルーを除去する。
8. 95 μ l の DNase 調製液を NucleoSpin RNA Plant Column のメンブレンの中央にアプライする。室温 (20 ~ 25℃) で 15 分間反応させる。
9. RAW2 を 200 μ l アプライし、11,000 $\times g$ で 30 秒間、室温にて遠心する。
10. NucleoSpin RNA Plant Column を新しい 2 ml チューブに移す。RA3 を 700 μ l* アプライし、11,000 $\times g$ で 30 秒間、室温にて遠心する。

* : NucleoSpin RNA Plant のプロトコールでは、600 μ l であるが、700 μ l で洗浄することを推奨します。
11. フロースルーを除去する。RA3 を 250 μ l アプライし、11,000 $\times g$ で 2 分間、室温にて遠心する。
12. NucleoSpin RNA Plant Column を新しい 1.5 ml チューブに移す。RNase-free H₂O を 60 μ l アプライし、11,000 $\times g$ で 1 分間、室温にて遠心する。
13. total RNA 回収完了。

すぐに使用しない場合は - 20℃または - 80℃に保管する。

フローチャート 2 (プロトコール 2 : NucleoSpin RNA Plant との組合せ)



実験結果例 2 (NucleoSpin RNA Plant との組み合わせ)

下記の植物組織から、プロトコール 2 に従って RA1 を用いて total RNA 抽出を行い、Fruit-mate による処理を行わなかった場合と抽出効果を比較した。total RNA は、各植物組織でスタート時の量が等量になるように調整してアプライした。

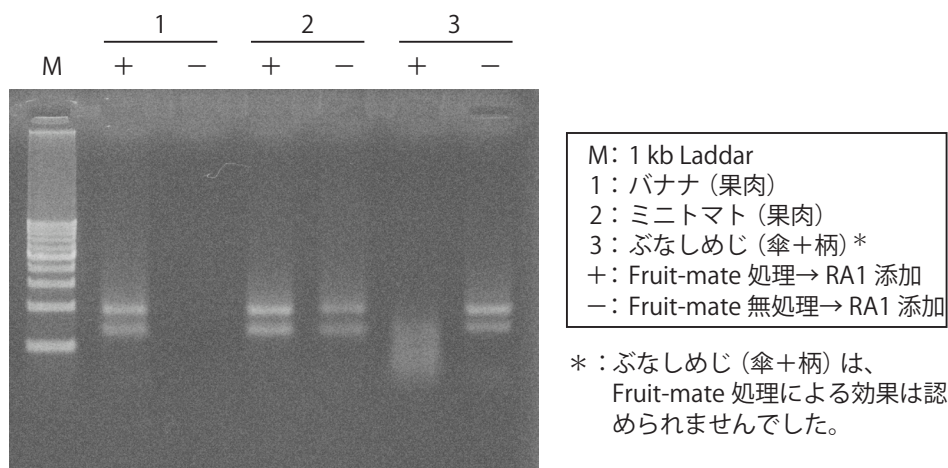


図 2. Fruit-mate 処理 (+) / 無処理 (-) 後に NucleoSpin RNA Plant で抽出した total RNA の電気泳動結果

実験結果例 3 (NucleoSpin RNA Plant との組み合わせ)

下記の植物組織から、プロトコール 2 に従って RA1 あるいは RAP を用いて total RNA 抽出を行い、Fruit-mate による処理を行わなかった場合と抽出効果を比較した。total RNA は、各植物組織でスタート時の量が等量になるように調整してアプライした。

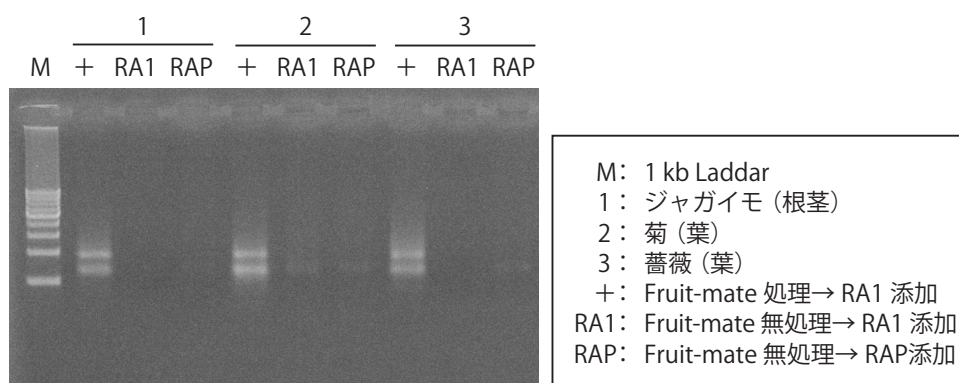


図 3. Fruit-mate 処理 (+) / 無処理後に RA1 あるいは RAP を用いて抽出した total RNA の電気泳動結果

VI. トラブルシューティング

1. 収量が少ない：

- 試料のホモジナイズが不十分であった。
試料が細かい粉末状になるまで十分に破碎してください。
- 組織の RNA 量が少ない。
いくつかの植物組織では RNA 含量が少ないことがわかっています。例えば根の組織では、植物の他の組織の平均的な RNA 含量よりも少ないと報告されています。一般的には、成熟した葉では若い葉よりも RNA 含量が少なくなります。多糖類とポリフェノール類が多いと考えられるいくつかの植物組織の収量の例を下表に示します。

組織材料	サンプル量	抽出量 (RNAiso Plus)	抽出量 (NucleoSpin RNA Plant)
ミニトマト果実	50 mg	約 10 ~ 15 μ g	約 3 ~ 4 μ g
バナナ果肉	50 mg	約 10 ~ 15 μ g	約 3 ~ 4 μ g
トマト種子	50 mg	約 10 ~ 20 μ g	—
米 (イネ種子)	50 mg	約 5 ~ 10 μ g	—
ジャガイモ	50 mg	約 5 ~ 10 μ g	約 10 ~ 15 μ g
みかん皮	50 mg	約 5 μ g	—
菊	50 mg	—	約 50 μ g
薔薇	50 mg	—	約 50 μ g

— : not tested

- 試料に含まれる多糖類やポリフェノール類が少量である。
Fruit-mate は植物組織、特に多糖類やポリフェノール類の多い組織専用設計されています。効果があつた植物 (部位) については、VI. 操作方法、[VI-1. 試料について](#)をご参照ください。
RNAiso Plus のみ、あるいは NucleoSpin RNA Plant のみを使用して RNA が効率よく抽出できる一般的な組織に Fruit-mate を使用すると、収量が落ちる場合があります。
- その他
RNAiso Plus および NucleoSpin RNA Plant の取扱説明書のトラブルシューティングもご参考ください。

2. OD₂₆₀/OD₂₈₀ の値が低い：

- RNA 濃度は、TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH8、1 mM EDTA) によって希釈後、吸光度の測定を行ってください。イオン強度や pH が低い場合、OD₂₈₀ 値が上昇することがあります。
- 組織サンプルに対して Fruit-mate 量および RNAiso Plus あるいは Lysis Buffer の量が少ないと、タンパク質変性が不十分となる恐れがあります。
- 抽出した RNA を十分に溶解してください (RNAiso Plus の場合)。
 - 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°C 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。
- RNAiso Plus および NucleoSpin RNA Plant の取扱説明書のトラブルシューティングもご参考ください。

-
3. 抽出した RNA が分解している：
- RNA 抽出に使用する組織は、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°C 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。
 - RNAiso Plus および NucleoSpin RNA Plant の取扱説明書のトラブルシューティングもご参考ください。
4. 抽出した RNA に DNA が混入している：
- RNAiso Plus の場合、RNAiso Plus の使用量が少なかった可能性があります。推奨量を添加してください。
 - 使用した組織サンプル中に大量の有機溶剤（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/B) で処理することを推奨します。
 - RNAiso Plus および NucleoSpin RNA Plant の取扱説明書のトラブルシューティングもご参考ください。

VII. 参考文献

- 1) Chirgwin J, *et al.* "Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease". *Biochemistry*. (1979) **18** (24): 5294-5299.
- 2) Wallace D. "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 and 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) Feramisco J R, *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.

VIII. 関連製品

RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)
NucleoSpin RNA Plant (製品コード 740949.10/.50/.250)
Recombinant DNase I (RNase-free) (製品コード 2270A/B)

IX. 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。
- Fruit-mate 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 <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社