

研究用

---

**Takara**

***Oligotex<sup>TM</sup>-dT30 <Super>***  
**mRNA Purification Kit**  
**(From total RNA)**

---

説明書

---

*Oligotex-dT30 <Super>* は、培養細胞や動植物組織などの total RNA から polyA<sup>+</sup> RNA を高純度に分離・精製するために、JSR ライフサイエンス社およびロシュ・ダイアグノスティクス株式会社が共同開発した mRNA 精製用試薬です。*Oligotex-dT30 <Super>* は Latex 粒子の表面に oligo(dT)<sub>30</sub> の 5' 末端領域を結合させたもので、熱・アルカリに安定です。また、Latex 粒子は表面積が大きく懸濁性が高いことから、固定化された oligo(dT)<sub>30</sub> と試薬中の mRNA は迅速かつ効率よく結合します。本製品は、*Oligotex-dT <Super>* にバッファー類とスピンカラムを組み合わせたキットです。Latex 粒子で polyA<sup>+</sup> RNA をトラップした後、スピンカラムで洗浄・溶出を行うので、手軽に mRNA 精製を行うことができます。本キットを用いると、RT-PCR はもちろん、DNA マイクロアレイ用のプローブ調製やノーザンハイブリダイゼーションにも使用可能な高純度の mRNA を短時間で回収することができます。1 回あたり最大 250 μg の total RNA が処理可能です。

## I. 内容 (20 回用)\*1

1. <i>Oligotex-dT30 &lt;Super&gt;</i> *2	300 μl
2. 2 × Binding Buffer	1.5 ml × 2
3. Wash Buffer	14 ml
4. RNase Free dH <sub>2</sub> O	10 ml
5. スピンカラムセット	20 sets
6. スピンカラム用遠心チューブ	40 個

### *Oligotex-dT30 <Super>*

Latex 10% (W/V) Suspension

30 mg / 300 μl	Oligo(dT) <sub>30</sub> 固定化ラテックス粒子
10 mM	Tris-HCl (pH7.5)
1 mM	EDTA
0.1%	SDS
0.1%	NaN <sub>3</sub> *3

\* 1 : total RNA ≤ 250 μg の処理を 1 回分とします。

\* 2 : *Oligotex-dT30 <Super>* は、JSR ライフサイエンス社により製造されたものです。

\* 3 : NaN<sub>3</sub> 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。

### キット以外に必要な機器 (主なもの)

- ・マイクロ遠心機
- ・遠心チューブ
- ・マイクロピペットおよびチップ

## II. 保存

4°C (*Oligotex-dT30 <Super>* は凍結厳禁)

※ 適切に保存し、受取り後 2 年を目途にご使用ください。

---

### III. total RNA サンプルの調製について

本製品は total RNA から mRNA を精製するキットです。高純度で全長を有する polyA<sup>+</sup> 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。

### IV. Oligotex-dT30 <Super> 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 0.1% 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、Latex 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、ボルテックスは避けてください。
5. 上清中の mRNA が少量の場合、溶存する試薬成分の影響により、正確な UV 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。

## V. 操作

反応液の調製（市販のチューブ）

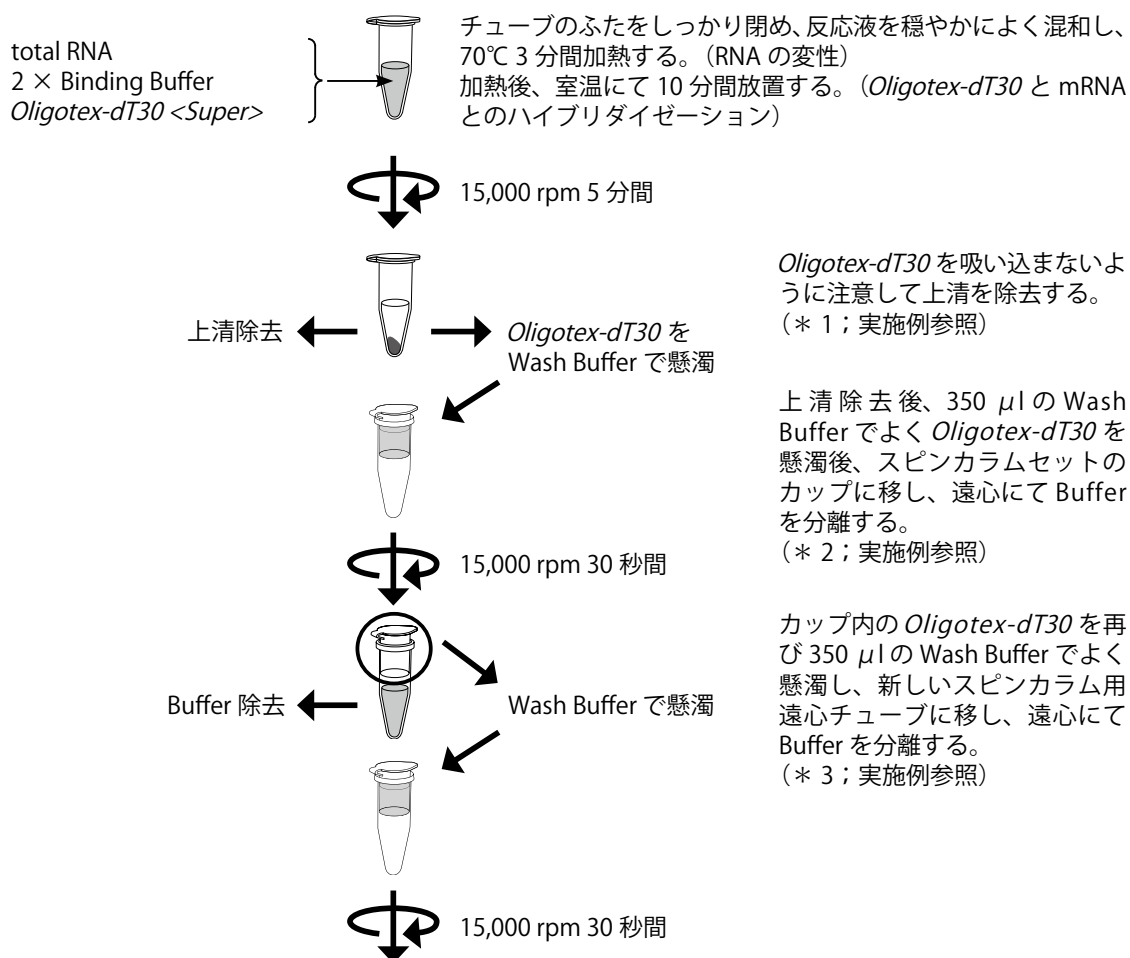
下記に示す反応液を滅菌チューブに調製する。

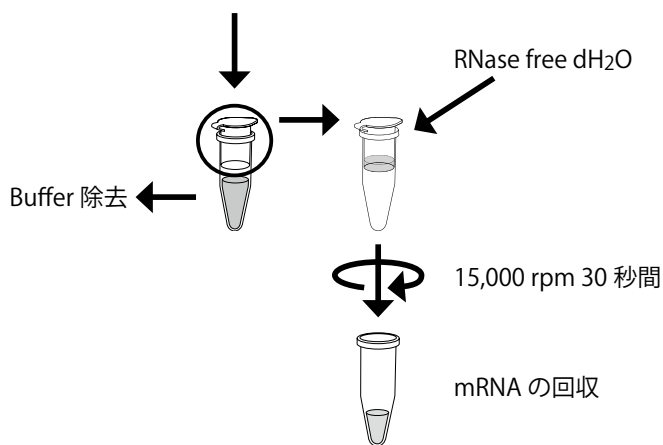
*Oligotex-dT30 <Super>* は 37°C で保温しておく。

2 × Binding Buffer が析出している場合、37°C で完全に溶かしてから使用する。

total RNA 水溶液*	2 × Binding Buffer	<i>Oligotex-dT30 &lt;Super&gt;</i>	最終反応液 Total 量
150 ~ 250 μg/150 μl の場合	150 μl	15 μl	315 μl
100 ~ 150 μg/100 μl の場合	100 μl	10 μl	210 μl
~ 100 μg/ 50 μl の場合	50 μl	10 μl	110 μl

\* : total RNA の量により上記のような容量になるように RNase free dH<sub>2</sub>O で調製





カップ内 *Oligotex-dT30* をあらかじめ 70°C で加熱しておいた 20 ~ 50  $\mu$ l (適量) の RNase free dH<sub>2</sub>O でよく懸濁し、新しいスピンカラム用遠心チューブを用いて mRNA を溶出する。  
 (\* 4; 実施例参照)

★ この操作を 2 ~ 3 回繰り返す。  
 (毎回新しく、あらかじめ 70°C で加熱しておいた RNase free dH<sub>2</sub>O を加えてください。)

**全工程 30 分未満**

## VI. 実施例

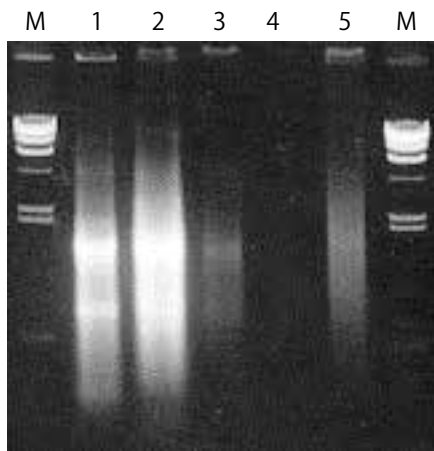
*Oligotex-dT30* <Super> mRNA Purification Kit を用いた HeLa 細胞由来 total RNA からの mRNA 精製

### 【方法】

HeLa 細胞由来の total RNA 150  $\mu$ g/150  $\mu$ l に、150  $\mu$ l の 2 × Binding Buffer と 15  $\mu$ l の *Oligotex-dT30* <Super> を添加して反応液を調製し、V. 操作に従って精製操作を行った。

### 【結果】

4.5  $\mu$ g の mRNA を回収することができた。また、rRNA は 2 回の洗浄により充分のぞかれていることが確認できた。



レーン 1: HeLa 細胞由来 Total RNA 1  $\mu$ g  
 レーン 2: binding 後の除去した上清 (V. 操作の \* 1 に相当)  
 レーン 3: 1 回洗浄後の液 (V. 操作の \* 2 に相当)  
 レーン 4: 2 回洗浄後の液 (V. 操作の \* 3 に相当)  
 レーン 5: 溶出された mRNA (V. 操作の \* 4 に相当)  
 レーン M:  $\lambda$ -*Hind* III digest

## VII. 参考文献

- 1) 栗林恵子、日方幹雄、平岡修、宮本力、古市泰宏 オリゴ (dT) ラテックスによる Poly (A)<sup>+</sup> mRNA の精製 生化学 **60**: 967, 1988.
- 2) Kuribayashi, K., Hikata, M., Hiraoka, O., Miyamoto, C., and Furuichi, Y.  
A rapid and efficient purification of poly (A)<sup>+</sup> -mRNA by oligo (dT)-Latex.  
*Nucleic Acids Reserch., Symposium series.* **19**: 61-64, 1988.
- 3) 栗林恵子、古市泰宏 新しい遺伝子工学試薬オリゴテックス dT30 バイオサイエンス  
とインダストリー **47**:(5), 557-558, 1989.
- 4) 垣塚彰 Oligo (dT)-Latex 粒子を用いたポリ (A) RNA の精製方法実験医学  
**17**:(7), 2065-2068, 1989.

## VIII. 関連製品

*Oligotex*<sup>™</sup>-dT30 <Super> (製品コード W9021A、W9021B)  
RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)  
NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250)  
PrimeScript<sup>™</sup> Double Strand cDNA Synthesis Kit (製品コード 6111A)  
cDNA Library Construction Kit (製品コード 6136)  
RNase-OFF<sup>™</sup> (RNase コンタミネーション除去溶液) (製品コード 9037)

## 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。
- ・PrimeScript、RNase-OFF はタカラバイオ株式会社の、*Oligotex* 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**