

製品コード 9108/9109

研究用

Takara

RNAiso Plus
(Total RNA 抽出試薬)

説明書

v201904Da

RNAiso Plus は、動植物の組織や培養細胞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 Plus 溶液中で組織や細胞を破碎（ホモジナイズ）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、遠心により 3 層に分離します。

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 はインタクトな状態であり、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) 処理を行ってください。

I. 内容

RNAiso Plus (製品コード 9108) *	100 ml
RNAiso Plus (製品コード 9109) *	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 Plus の使用量の目安

サンプルの種類と量	RNAiso Plus 使用量 (ml)
10 cm ² シャーレの接着細胞	1 ~ 2
5 × 10 ⁶ ~ 1 × 10 ⁷ 個の浮遊細胞	1
100 μl の白血球細胞	2
50 ~ 100 mg の組織サンプル	
・ 比較的 RNA 抽出が容易な組織	1
・ 高純度の RNA 抽出が難しい組織 (肝臓、脾臓、骨および軟骨* ¹ など)	2
15 ~ 30 mg の植物材料* ² (少量の多糖類とフェノールを含む)	1
2 ~ 5 × 10 ⁷ 個の酵母菌体* ³	1

- * 1 : 骨および軟骨組織からの RNA の抽出には RNAiso Plus と High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (製品コード 9193) を組み合わせた抽出方法をお勧めします。
- * 2 : 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。
- * 3 : 酵母からの RNA 抽出には前処理試薬として Yeast Processing Reagent (for total RNA preparation) (製品コード 9089) をご使用ください。

2. 各試料への RNAiso Plus の添加と抽出操作

A. 接着細胞

- 1) 培地を捨て、 $1 \times$ PBS で洗浄する。
- 2) 10 cm^2 シャーレの接着細胞に対し $1 \sim 2 \text{ ml}$ の割合で RNAiso Plus を加え、細胞表面全体に均等に広がるように試薬をなじませ、細胞を剥離させる。
注) 細胞が剥がれにくい場合には、セルスクレーパーを使用してください。
- 3) 細胞をピペッターで回収して遠心チューブに移し、沈殿がなくなるまで数回ピペッティングする。
- 4) 室温 ($15 \sim 30^\circ\text{C}$) で 5 分間静置し、核酸から核タンパク質を遊離させる。

B. 浮遊細胞

- 1) 浮遊細胞を培地ごと遠心チューブに採取し、 $8,000 \times g$ 、 4°C で 2 分間遠心後、上清を捨てる。
- 2) 5×10^6 細胞あたり 1 ml の RNAiso Plus を添加する。
- 3) 沈殿がなくなるまで数回ピペッティングする。
- 4) 室温 ($15 \sim 30^\circ\text{C}$) で 5 分間静置し、核酸から核タンパク質を遊離させる。

C. 動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、組織の量に応じて RNAiso Plus 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 RNAiso Plus を加えて完全にホモジナイズする。
- 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 ($15 \sim 30^\circ\text{C}$) で 5 分間置く。
- 3) $12,000 \times g$ で 5 分間、 4°C にて遠心を行う。
- 4) 上清を採取し、新しい遠心チューブに移す (沈殿を採取しないよう十分注意すること)。

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 (ホモジナイズに用いた RNAiso Plus の液量) の 0.2 倍量加え、遠心チューブのフタして、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) $12,000 \times g$ 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) 開始容量の 0.5 倍量～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) $12,000 \times g$ 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

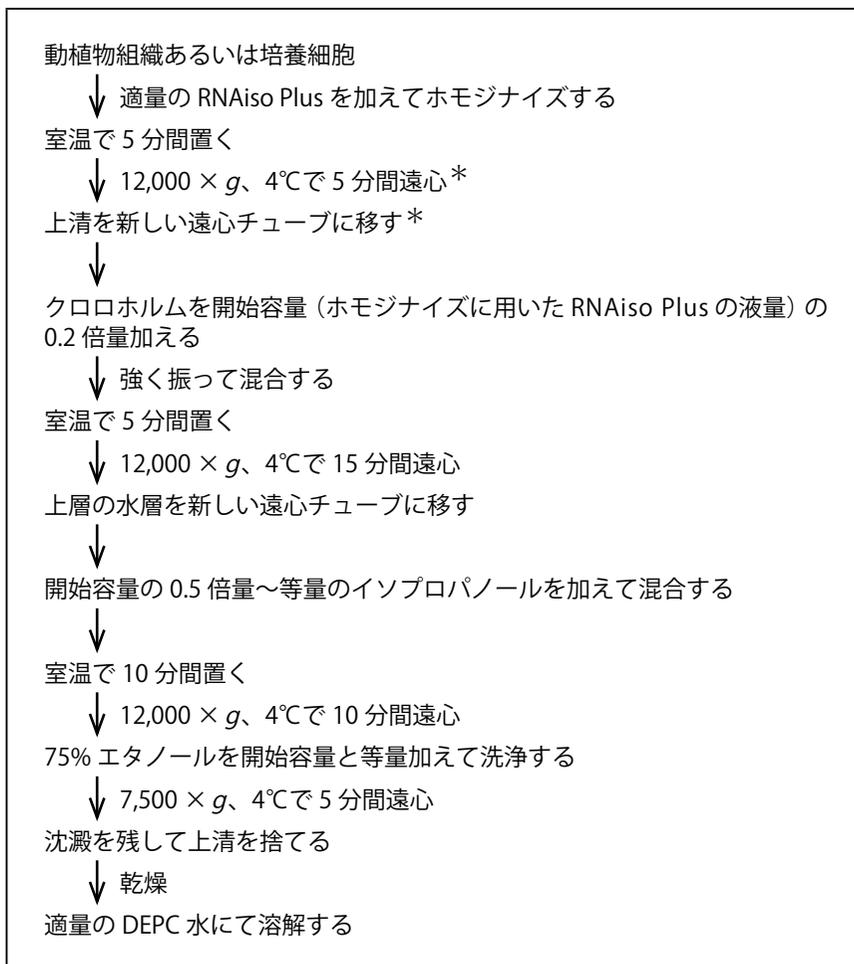
上清を捨て、開始容量と等量の 75% 冷エタノールを加える。ボルテックスで攪拌して沈殿物を洗浄する。 $7,500 \times g$ で 5 分間、 4°C で遠心し、上清を捨てる。

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ことがありますので、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



*：組織サンプルの場合に必要です。

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、1～2 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 ribosomal 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、ribosomal RNA のバンドが拡散している場合は、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 バイオアナライザおよび RNA6000 Lab Chip キットを用いるとより正確に行えます。

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 Plus を用いて 1g の組織あるいは 1 × 10⁷ 個の細胞より抽出できる RNA 量の目安を示します。

組織材料	サンプル量	total RNA 抽出量
マウス肝臓	1 g	約 4,000 ～ 5,000 μg
マウス腎臓	1 g	約 3,000 μg
マウス骨格筋	1 g	約 1,500 μg
マウス脳	1 g	約 1,500 μg
HL-60 培養細胞	1 × 10 ⁷ 個	約 100 μg
タバコ葉	1 g	約 1,000 μg
白血球細胞	1 × 10 ⁷ 個	約 20 ～ 40 μg
(全血*	1 ml	15 ～ 20 μg)
コイ骨格筋	1 g	約 50 μg

*：全血 100 μl に対し、1 ml の RNAiso Plus を使用した。

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。

1. RNAiso Plus を加えた後の試料のホモジナイズが不十分だった。
2. 3層に分離した後の、水層の回収が不十分だった。
3. RNA 沈殿の溶解が不完全だった。
4. イソプロパノール沈殿や洗浄工程で、RNase が混入した。

-
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。
 - 組織をホモジナイズする際に RNAiso Plus の量が少なくと、タンパク質変性が不十分となる恐れがあります。この場合は、再度、RNA 溶液をホモジナイズし、タンパク質を取り除きます。
 - ホモジネートを室温で 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 (次を参照)。
 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°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。
 4. 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。
 - RNase を大量に含む組織サンプルに対して、RNAiso Plus の添加量が足りなかった可能性があります。
 5. 抽出した RNA に DNA が混入している
 - 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、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
 - 通常、植物や動物の筋肉組織には大量の多糖が含まれています。抽出した RNA から多糖を取り除くのは困難ですので、このような組織から RNA を抽出する場合、あらかじめ RNAiso Plus の使用量を増やすことをお勧めします。
 - 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) 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 C J Jr. 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.

IX. 関連製品

High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (製品コード 9193)
Fruit-mate™ for RNA Purification (製品コード 9192)
Yeast Processing Reagent (for total RNA preparation) (製品コード 9089)
Recombinant DNase I (RNase-free) (製品コード 2270A)
RNAiso Blood (製品コード 9112/9113)

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。
- ・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