



RNA すいすい-R

RS-0003N

～RNA 簡易抽出バッファー～

粘性物質の多い植物組織向け

取扱説明書

Ver. 1.0

RIZO Inc.

目次

| | ページ |
|--------------------|-----|
| 本製品の特長 | 3 |
| 内容物 | 3 |
| 保存条件 | 3 |
| 使用上の注意 | 3 |
| その他必要な機器・試薬 | 4 |
| 実験を始める前の準備 | 5 |
| 試料からの RNA 抽出プロトコール | 6-8 |
| トラブルシューティング | 9 |
| 本製品を用いた抽出例 | 10 |
| お問い合わせ先 | 裏表紙 |

本製品の特長

本製品「RNA すいすい-R」は、粘性物質が多い植物組織からの RNA 抽出工程に最適なバッファーです。

抽出した RNA には DNA も含まれていますので、リアルタイム PCR 解析、ノーザンブロット解析等の実験目的に合わせて、「DNase I 処理」や「リチウム沈殿処理」を行い、残存 DNA の除去を行ってください*。

なお、本製品には、RNA 抽出に必要な「酸性フェノール」を簡単に調製できる試薬「酸性フェノールすいすい」を添付しております。より効果的な RNA 抽出にお役立てください。

*本製品には「DNase I」および「塩化リチウム」は含まれておりません。

内容物

1. RNA すいすい-R 90 ml (約 150 回分)
液色：薄橙色
2. RNA 沈殿補助溶液 (50 ml) *
3. 酸性フェノールすいすい 40 ml (酸性フェノール約 80 ml 分)
液色：赤紫色

***ご使用になる前に 50 ml の 2-プロパノール (イソプロパノール) を加えて下さい。**

保存条件

製品到着後は暗所で冷蔵保存 (4℃) して下さい。

使用期限は開封後 6 ヶ月です。

使用上の注意

本試薬は研究目的以外にご使用にならないでください。また、RNA 操作及び試薬に関する基本的知識のある方以外は取り扱わないでください。

*記載内容や製品仕様、および価格に関しては予告なしに変更する場合がございます。

その他必要な試薬・機器

試薬

結晶フェノール*
クロロホルム
イソプロパノール
エタノール
70% エタノール**
2-メルカプトエタノール
滅菌蒸留水（DEPC 処理が望ましい）

* 「酸性フェノール」作成用です（「酸性フェノール」はお手持ちの水飽和フェノールで代用可能ですが、添付の「酸性フェノールすいすい」を用いて調製されることをお勧めします）。

** エタノール（分子生物学用）：滅菌蒸留水を 7：3 の容積比で混合したものをご利用ください。

機器

冷却微量高速遠心機

その他

1.5 ml チューブ
マイクロピペット
ピペットチップ
乳鉢・乳棒、マイクロチューブ用ホモジナイザーペッスルなどの
破碎器具

実験を始める前の準備

酸性フェノールの調製（手袋を着用して行ってください）

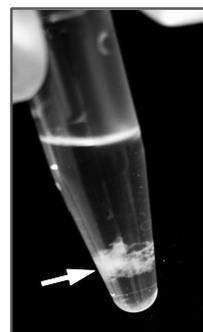
1. 「酸性フェノールすいすい」を、清潔なビーカーなどに移し（捨てないでください）、ボトルを空にします。
2. 空にしたボトルに結晶フェノールを8分目ほど入れ、65°Cの湯浴で融解します（約 60 ml 程度の液体フェノールが得られます）。
3. 1. で移した「酸性フェノールすいすい」を2. のボトルに戻し、しっかり蓋をしめてシェイクします。
4. そのまま二層に分離するまで放置します。下層（赤紫色の層）が酸性フェノールになります（約 80 ml 程度の酸性フェノールが得られます）。
5. 調製後は 4°C で保存してください。

RNA 沈殿補助溶液の調製

RNA 沈殿補助溶液（50 ml 入）に 50 ml の 2-プロパノール（イソプロパノール）を加え、よく混合して下さい。以下の抽出プロトコールにはこの調製済みの RNA 沈殿補助溶液を使用します。

分析試料からのRNA抽出プロトコール

1. 「RNA すいすい-R」を600 μ lと2-メルカプトエタノール24 μ lを1.5 mlチューブに入れ、氷上に準備しておきます。
2. 分析試料（10～50 mg 程度^{注①}）を液体窒素中で破碎し^{注②}、1. のチューブに入れ、すみやかに本品となじませます。
3. ボルテックス、マイクロチューブ用ペッスル等でさらに破碎・混合します。
4. 氷上で5分間静置します。
5. 酸性フェノール500 μ l、クロロホルム200 μ lを加えてよく混合し、氷上で10分間静置します。
6. 15,000 rpm、10分間、4°Cで遠心分離を行います。
7. 上清400 μ lを新しい1.5 mlチューブにとり、エタノールを400 μ l（上清と同量）添加し、チューブを上下に振ってよく混和します*。
*粘性物質が多く含まれるサンプルでは、粘性物質の析出が観察されま
す（写真右）。
8. 3,000 rpm、1分間^{注③}、室温（20-25°C）で遠心分離を行います。
9. 沈殿（粘性物質）を吸い上げないように注意しながら、上清600 μ lを新しい1.5 mlチューブにとり、RNA沈殿補助溶液を600 μ l（上清と同量）添加し、よく混和した後、氷上で15分間静置します。
10. 15,000 rpm、10分間、4°Cで遠心分離を行います^{注④}。
11. 上清を捨て^{注⑤}、70% エタノールを1,000 μ l入れ、沈殿の洗浄を行います。
12. 15,000 rpm、10分間、4°Cで遠心分離を行います。



13. 上清を捨て、沈澱を乾燥（風乾）^{注⑥}します。

14. 20～50 μ l の DEPC 処理水に溶解し^{注⑦}、RNA 試料とします。

***注①～⑦については 7 ページの「注解および留意点」をご参照ください。**

注解

注①試料を多く入れ過ぎますと RNA の収量の低下や夾雑物残存の原因となります。

注②乳鉢・乳棒など使用して液体窒素中で試料を完全なパウダー状になるまですりつぶし、十分に冷却したスパーテルですくいとって加えてください。サンプル自体が解凍しないうちに本品となじませることが重要です。乳鉢・乳棒がない場合は、1.5 ml マイクロチューブ内で本品に試料を浸漬したまま、氷上で 1,000 μ l 用ピペットチップの先*など使用して試料をホモジナイズすることも可能です。

*ピペットチップの先端をアルコールランプやライター等で炙り、先端の穴が閉じたものを利用すると便利です。

注③1 分間以上遠心分離を行わないで下さい。RNA 収量の低下の原因となります。サンプルの種類によっては、3,000 rpm、~15 秒などの短時間条件で遠心分離を行った方がより効果的な場合がございます。

注④沈殿が見えにくい為、沈殿の位置が予測できるようにチューブの向きを揃えて遠心分離を行って下さい。

注⑤沈殿が流出しないようご注意ください。

注⑥乾燥させすぎると DEPC 処理水への溶解が困難になります。

注⑦試料の種類や状態、また使用目的により最適量が異なりますので、適宜調整して下さい。

留意点

抽出した RNA には DNA も含まれています。リアルタイム PCR 解析、ノーザンブロット解析等の実験目的に合わせ、「DNase I 処理」や「リチウム沈殿処理」を行い、残存 DNA の除去を行ってください。

本プロトコールは微量サンプルからの RNA 簡易抽出用に考案されていますが、多量のサンプル向けにスケールアップすることも可能です。

トラブルシューティング

| 問題 | 考えられる原因 | 対策 |
|--------------|--|---------------------------------------|
| RNA の収量が低い。 | 試料の粉碎が不十分である。 | 乳棒・乳鉢など用いて液体窒素中で可能な限り試料を細かく粉碎して下さい。 |
| | 試料が本品に触れる前に RNA が分解している。 | 液体窒素等を用いて凍結状態で粉碎し、解凍しないうちに本品に浸漬して下さい。 |
| | 試料の量が多すぎる為、本品による RNase 活性の抑制が十分に行えていない。 | 試料の量を 50 mg 以下に減らして抽出して下さい。 |
| DNA が含まれている。 | 抽出した RNA には DNA も含まれています。リアルタイム PCR 解析、ノーザンブロット解析等の実験目的に合わせ、「DNase I 処理」や「リチウム沈殿処理」を行い、残存 DNA の除去を行ってください。 | |

抽出例

粘性物質が多い植物組織を用いた抽出例

本製品を使用して約 50 mg の組織から RNA 抽出を行い、電気泳動で確認しました。

(試料)

花びら

1. バラ
2. キク
3. スプレーギク

葉

4. バラ
5. イチゴ

果実

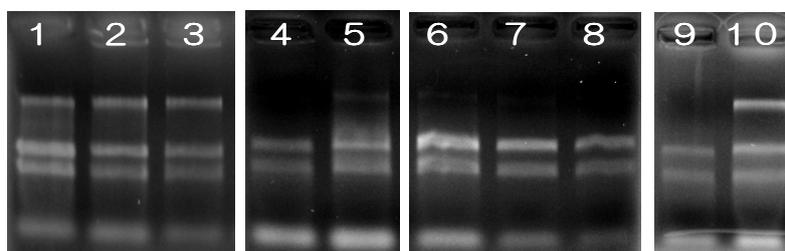
6. イチゴ*
7. ナシ
8. リンゴ

その他

9. サトイモ
10. ネギ

(電気泳動結果)

0.8% Agarose / 0.5×TBE



抽出した RNA には DNA も含まれています。リアルタイム PCR 解析、ノーザンブロット解析等の実験目的に合わせ、「DNase I 処理」や「リチウム沈殿処理」を行い、残存 DNA の除去を行ってください。

お問い合わせ先

株式会社リーゾ

研究部

茨城県つくば市天久保 2-9-2-B201

電話 ; 029-852-9351 FAX ; 020-4623-5611

E-mail ; info@rizo.co.jp

ホームページ ; <http://www.rizo.co.jp/>

Copyright ©2012 RIZO Inc. All Right Reserved.