



## ISOGEN, ISOGEN-LS プロトコール(RNAの単離)

### [プロトコール1-1 RNAの単離]

以下の操作は、RNaseのコンタミを防ぐとともに安全のために手袋を着用し、清潔な環境で行う。なお、クロロホルム、イソプロパノール及びエタノールは別に準備しなければならない。また、チューブは透明なポリプロピレン製を用いるとよい。

sample<sup>\*1)</sup>

(for ISOGEN:50-100mg tissue, 10cm<sup>2</sup> of culture plate, 5-10×10<sup>6</sup> cells)

(for ISOGEN-LS:0.25ml liquid sample)

↓ add 1ml of ISOGEN or 0.75ml ISOGEN-LS

↓ lysis or homogenization<sup>\*2)</sup>

↓ store for 5min. at room temperature<sup>\*3)</sup>

↓ add 0.2ml of chloroform<sup>\*4)</sup>

↓ shake vigorously for 15sec.

↓ store for 2-3min. at room temperature

↓ 12K×g for 15min. at 4°C<sup>\*5)</sup>

↓→→→→interphase and organic phase<sup>\*6)</sup>

↓ (for subsequent isolation of DNA[protocol 2] and proteins[protocol 3] )

↓

aqueous phase<sup>\*7)</sup>

↓ add 0.5ml of isopropanol ( or 0.8 volume isopropanol)<sup>\*5)</sup>

↓ store for 5-10min. at room temperature<sup>\*8)</sup>

↓ 12K×g for 10min. at 4°C

precipitate<sup>\*9)</sup>

↓ add at least 1ml of 75% ethanol

↓ vortex<sup>\*10)</sup>

↓ 7.5K×g for 5min. at 4°C<sup>\*11)</sup>

precipitate

↓ dry briefly<sup>\*12)</sup>

↓ add ddH<sub>2</sub>O, TE(pH8.0) or 0.5% SDS

↓ dissolve

total RNA solution<sup>\*7)\*13)</sup>

\*1) 1.5mlプラスチックチューブを用いて処理する場合、組織や培養細胞等、試料の体積が100μl以下のものにはISOGEN、血液等、試料の体積が大きい(100μlを越える)ものにはISOGEN-LSが有効である。試料の体積が大きくても、濃縮により100μl以下にできる場合にはISOGENを使用することができる。

培養細胞などの試料の場合、培地などの水分は可能な限り除去する。

ISOGEN-LSを用いて液体試料を処理する場合、試料の容量が0.25ml以下の時には、水を加えて0.25mlにする。ISOGEN-LSと容量比が常に3：1になるようにする。血液や血清のように多くの成分が含まれる液体試料は、水で2倍に希釈してからISOGEN-LSを加える。

\*2) 組織の場合は、ガラス・テフロンあるいはポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイゼーションする。また、培養皿に付着して増殖した細胞の場合には、10cm<sup>2</sup>当たり1mlのISOGENを直接加えてピペットで吸出して溶解する。細胞懸濁液の場合には遠心して沈殿させた後、5-10×10<sup>6</sup>cells当たり1mlのISOGENを加えて同様にピペットで吸出して溶解する。筋、脂肪細胞、植物のようにタンパク質、脂質などを多く含む試料の場合は、ホモジナイゼーション後に一度遠心(12K×g, 10min., 4°C)して、上清を以下の操作に用いる。この時脂肪は最上層に位置することに注意する。

\*3) この状態で-70°Cで少なくとも1か月は保存できる。

\*4) イソアミルアルコールの添加されたクロロホルムは使用できない。

\*5) ホモジネートは、遠心分離により下層の有機相、中間層及び上層の水相にわかれる。RNAは水相に含まれるが、この水相にはDNAやタンパク質はほとんど含まれない。この時の水相の体積は加えたISOGENの体積の約60%である。もし60%より少ない場合には、この後の操作で添加するisopropanol量は分取した水相の体積に対して0.8倍容を添加する。30%以下の場合、組織量を減らすなどして、再度抽出し直すことを推奨する。

\*6) ここで得られた中間相と有機相はそれぞれDNA及びタンパク質を単離するため、4°Cにて保存する。ただし、中間相や有機相中に多量の不溶物(カス状、繊維状のもの等)がある場合、DNA及びタンパク質の単離には適さない。

\*7) DNAやタンパク質との夾雑を少なくすることによりRNAの回収率を上げるため、4中間相や有機相ができるだけ混入しないように、水相を新しいチューブに移して以下の操作を行う。ゲノムDNAのコンタミが予想される場合には新しいチューブに移した水相に等量のクロロホルムを加え、再抽出を行う。ポリサッカライド、プロテオグリカン、グリコーゲン等の夾雑物が含まれることが予想される場合、あるいは最終的に得られたRNAに含まれていることが確認された場合には、high-salt precipitation solution(1.2M NaCl, 0.8M sodium citrate, pH未調整)とイソプロパノールをそれぞれ水相の1/2容量加えてイソプロパノール沈殿を行い、10K×g, 15分遠心してRNAのみを沈殿させると効果的である。その後75%エタノールによる洗浄を行う。

RNA量が10 $\mu$ g以下の場合、水相にEthachinmateを加えることにより、RNAの収率を上げることができる。

\*8) この状態で、通常RNAの沈殿は見えない。

\*9) RNAの沈殿は、ゲル様のペレットとしてチューブの内壁と底に付着する。

\*10) この状態で4°Cで少なくとも1週間、-20°Cであれば1年間は保存することができる。

\*11) もしRNAの沈殿がチューブの内壁から流れ出しそうな状態の場合は、エタノール洗浄後の遠心は12K×gにて行う。

\*12) RNAの沈殿は、風乾または5-10分間真空乾燥する。真空遠心機を用いて乾燥してはいけない。沈殿を完全に乾燥してしまうと溶解性が著しく減少する。溶解性が減少したRNAのOD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>は、1.6以下なので目安となる。得られたRNAは、滅菌蒸留水、TE(pH8.0)または0.5% SDSにピペットチップで吸出して溶解し、55-60°Cにて10-15分間保温すると良い。溶解する蒸留水、0.5% SDSは、あらかじめジエチルピロカーボネート(DEPC)処理によってRNaseフリーにしておくか、RNaseフリーグレードの市販品を用いること。また、TE (pH8.0)を使用する場合は、RNaseフリーグレードの市販品を用いること (TEに含まれるTris-HClは、DEPC処理にて分解してしまうため)。

\*13) 得られたRNAをアガロースゲル電気泳動すると、主に約2kbと5kbのリボソームRNAのバンドの他に0.1-0.3kbの低分子RNAと、7-15kbの高分子RNAを観察することができる。得られたRNAのOD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>は、1.6-1.8である。

---

>[ISOGEN のページへ](#)

体外診断用医薬品

検査・診断試薬(非医薬品)

Copyright © 2010 NIPPON GENE CO., LTD. All Rights Reserved