

SV Total RNA Isolation System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS Z3100, Z3101, AND Z3105

Quick
PROTOCOL

プロトコル(遠心法、吸引法共通)

備考:すべての遠心操作は、12,000~14,000 × g (室温)で行う。

- オートクレーブしたチューブに SV RNA Lysis Buffer (+ β-メルカプトエタノール) 175μl を分注する。
- 溶解するサンプルを準備する。
- サンプルをすぐに分注した Lysis Buffer に入れ、転倒混和により混合する。
備考: Lysis Buffer の容量とサンプル量の最適な比率を確認する(標準プロトコル TM048 の表 1 を参照)。また、様々なサンプルの前処理についても標準プロトコルを参照する。
- SV RNA Dilution Buffer (blue) 350μl を添加し、3~4 回転倒混和し、70°C、3 分間加熱する。
備考:70°C、3 分間の加熱は、サンプルの種類などによっては標準プロトコル(TM048)に記載されていない場合もあるが、最大収量を得るために行うことを推奨する。
- 10 分間の遠心後、クリアーライセートを新しいチューブに移す。
- クリアーライセートに 95% エタノール 200μl を加え、ピペッティングで混合する。

遠心法プロトコル

- 混合液を Spin Basket Assembly に移し、1 分間遠心後、溶出液を捨てる。
- SV RNA Wash Solution (+ エタノール) 600μl を添加し、1 分間遠心後、溶出液を捨てる。
- 下の表を使用して DNase incubation mix を調製する。

Solution	Volume	x Number of Preps	= Total
Yellow Core Buffer	40μl		
MnCl ₂ , 0.09M	5μl		
DNase I	5μl		

備考:DNase incubation mix の調製は、ピペッティングにより穏やかに混合する。ボルテックスは不可。

- メンブレンに DNase incubation mix 50μl を添加し、室温で 15 分間インキュベートする。
- SV DNase Stop Solution (+ エタノール) 200μl を添加し、1 分間遠心後、溶出液を捨てる。
- SV RNA Wash Solution 600μl を添加し、1 分間遠心後、溶出液を捨てる。
- SV RNA Wash Solution 250μl を添加し、2 分間遠心後、Spin Basket を Elution Tube に移す。
- Nuclease-Free Water 100μl をメンブレンに添加し、1 分間の遠心により RNA を溶出する。精製した RNA は-70°C で保存する。

吸引法プロトコル

- マニホールドのポートに取り付けられた Luer-Lok® に Miniprep Vacuum Adapter を装着する。静かに SV RNA Spin Basket をアダプターに挿入し、混合液を Spin Basket に移し、吸引する。

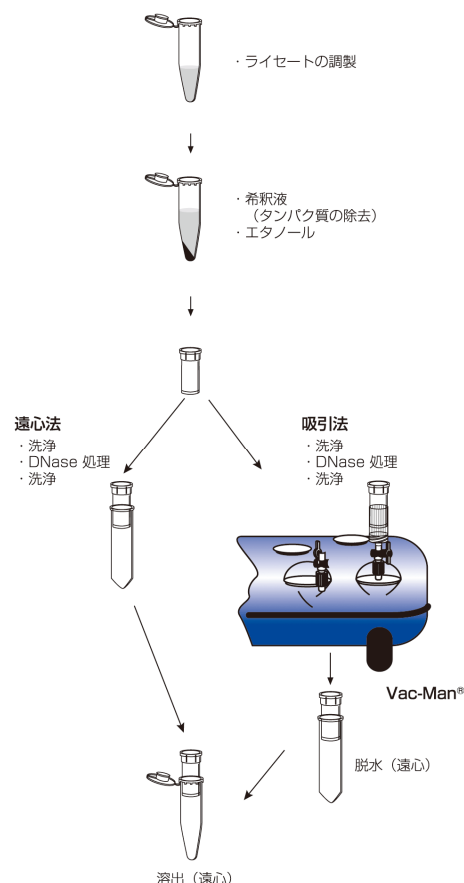
備考: ステップ 13 で使用するために Collection Tube にサンプル名などを記載しておく。

- SV RNA Wash Solution 900μl を添加し、溶液がメンブレンを通過するまで吸引する。ポンプを停止し、未使用のポートを開き、マニホールド内の陰圧を開放する。
- 下の表を使用して DNase incubation mix を調製する。

Solution	Volume	x Number of Preps	= Total
Yellow Core Buffer	40μl		
MnCl ₂ , 0.09M	5μl		
DNase I	5μl		

備考:DNase incubation mix の調製は、ピペッティングにより穏やかに混合する。ボルテックスは不可。

- メンブレンに DNase incubation mix 50μl を添加し、室温で 15 分間インキュベートする。
- SV DNase Stop Solution (+ エタノール) 200μl を Spin Basket に添加し、開いているポートを閉じて、吸引する。
- SV RNA Wash Solution 900μl を用いて洗浄を 2 回繰り返す。
- 吸引停止後、ステップ 7 で準備した Collection Tube を Spin Basket に挿入。Spin Basket/Collection Tube を 1 分間遠心する。
- Spin Basket を Elution Tube に移し、Nuclease-Free Water 100 μl を添加し、1 分間遠心する。精製した RNA は-70°C で保存する。



技術的なお問合せは:

e-mail: prometec@jp.promega.com • Tel: 03-3669-7980 • Fax: 03-3669-7982

Revised 08/07



SV Total RNA Isolation System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS Z3100, Z3101, AND Z3105

Quick
PROTOCOL

Q1) A_{260}/A_{280} の値が低い原因には何が考えられますか？

A1) 一般的にはタンパク質の混入が考えられます。フェノール/クロロフォルム抽出を行うことで改善されますが、RNA の収量は下がることが予想されず (最大 40%程度低下)

Q2) A_{260}/A_{230} の値が低い原因には何が考えられますか？

A2) 一般的にはグアニジンチオシアン酸の混入が考えられます。エタノール沈殿を行うことで改善されます。

Q3) RNA の収量が低い原因には何が考えられますか？

A3-1) サンプル中の RNA 量が少ないのかもしれませんが。組織や細胞によって湿重量あたりの精製できる RNA 量は異なります。また、凍結保存された組織または細胞溶解液は、Total RNA 量が減っている場合があります。サンプル抽出後すぐに精製ができない場合は、液体窒素で直ちに凍結し、 -70°C で保存してください。SV RNA Lysis Buffer (+ BME) でホモジナイズしたサンプルも -70°C で保存してください (少なくとも 1 週間は保存できます)。

A3-2) Spin Basket のメンブレン結合容量を超えているのかもしれませんが。メンブレンの結合容量は、150-160 μg RNA です。

サンプルから最大の回収量が必要な場合には、サンプルのホモジネートを分けて精製し、得られた RNA 溶液をひとつに集めて、最終的な収量を決定してください。

A3-3) 最大の回収量を得るためには、 70°C で 3 分間の加熱を必ず行ってください。この操作は、RNA の 2 次構造を変性させて、メンブレンへの結合を促すこと、タンパク質とゲノム DNA の凝集を減らすこと、RNase を不活化することに役立ち、安定して RNA を精製することができます。この操作を省くと収量が 15-50%低下します。

Q4) ゲノム DNA の混入が確認されました。何に注意すればよいでしょうか？

A4-1) RT-PCR 反応でゲノム DNA の混入が確認された場合は、ゲノム DNA 由来の増幅を回避するために RT 反応に用いる Total RNA 量を 50 ~ 100ng に減らしてください。一般的に 50ng Total RNA を使用すれば、希少な mRNA から特異的な産物を確認できます。

A4-2) ホモジネートを調製するとき用いる組織量を減らしてください。1 回の精製に使用する量が 30mg またはそれ以下であれば、ほとんどの組織でゲノム DNA の混入は見られません。腎臓組織に関しては 1 回の精製で 20mg、また脾臓組織に関しては 15mg をそれぞれ超えないようにします。培養細胞は、1 回のプレップが 5×10^6 cells を超えないようにします。

A4-3) DNase I 溶液が完全にメンブレンを覆っているかどうか、目で確認して下さい。溶液は、容易に確認できるよう黄色く着色されています。また、インキュベーション時間を標準プロトコルの 15 分間から 30 分間まで長くすることも効果があります。

A4-4) 密度の高い組織や培養細胞では DNA が多く含まれているために十分にゲノム DNA を除去できない場合もあります。もし、サンプル中への DNA の混入が問題であれば、RNA を単離した後に RQ1 RNase-Free DNase (カタログ番号 M6101) を使用して DNase 処理し、続いてフェノール/クロロフォルム抽出を行うことをお勧めします。

Q5) Spin Basket のメンブレンが目詰まりしました。

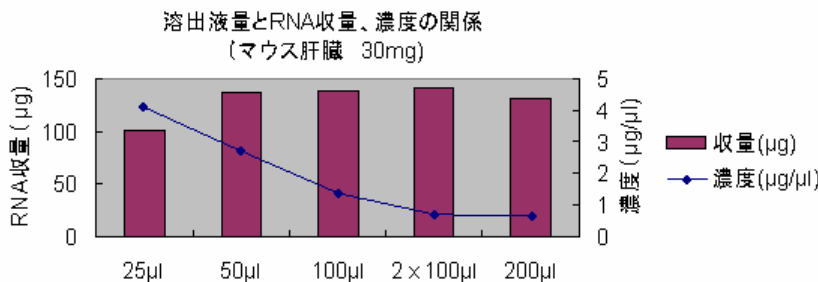
A5) ライセートの濃度が高すぎることが原因として考えられます。ライセートの粘性が高いようであれば、SV RNA Dilution Buffer を添加する前に、SV RNA Lysis Buffer で希釈してください。1 回の精製には、175 μl 以上のライセートを用いないでください。

Q6) RNA が分解しています。

A6) 操作中に RNase が混入したのかもしれませんが。RNA の操作や保存には、DEPC 処理したガラス容器や溶液、および使い捨てのプラスチック容器を使用してください。また、全行程で、手袋を着用してください。溶出後の RNase の混入によっても RNA は分解されます。

Q7) 精製する RNA 溶液の濃度を高くすることはできますか？

A7) RNA 溶液の濃度を高くする場合は、溶出液を遠心エバポレーターなどで濃縮した後に少量の水に懸濁することをお勧めします。また、標準プロトコルでは、100 μl での溶出を推奨していますが、溶出液量を少なくすることで、以下の図に示したように濃度を高くすることができます。ただし、RNA の収量は低下しますので、ご注意ください。詳しくは、Promega Notes Number 64, p.7 をご参照ください。



技術的なお問合せは:

e-mail: prometec@jp.promega.com • Tel: 03-3669-7980 • Fax: 03-3669-7982



Revised 08/07