

RNAgents® Total RNA Isolation System Protocol

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS Z5110

Quick
PROTOCOL

簡易プロトコル

用意するもの

付属のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコールを15分間室温で温める。使用前に有機層と水層が分かれていることを確認する。

Denaturing Solutionを氷上で冷やす。必要に応じて、1×PBS buffer を用意し同様に冷やしておく。

A. RNA抽出

1. Technical Bulletin # TB087 Section IVに示すように、組織又は細胞をDenaturing Solution中で破碎する。
2. 破碎した組織や細胞に推奨量の2M 酢酸ナトリウム (pH 4.0; 表を参照) を加えチューブを4-5回転倒混和して、十分に混ぜる。
3. 下層(有機層)のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコールをStep 2.のチューブに推奨量加える。チューブに蓋をし、よく混ぜるように3-5回転倒混和し、その後10秒間激しく攪拌する。氷上で15分間冷やす。
4. EPC処理又は滅菌したチューブへ混和物を移し、10,000 ×g、4、20分間遠心する。
5. RNAを含有する水層を注意深く採取し、DEPC処理又は滅菌したチューブへ移す。

B. RNAの沈殿

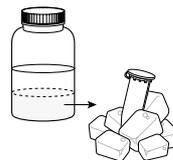
1. A-5でチューブに移した水層と等量のイソプロパノールを加え、-20 で少なくとも5分間インキュベートし、RNAを沈殿させる。
2. 10,000 ×g、4、10分間遠心し、RNAをペレットとして回収する。
(注) RNAをRT-PCRに使用する場合は次に「RNAの洗浄」のプロトコルへ進み、以下のStep 3-5は省いても構いません。
3. 上清を捨てる。推奨量のDenaturing Solution(表参照)で再懸濁し、RNAのペレットを完全に溶解するまでボルテックスする。
4. 等量のイソプロパノールを加え、本セクションのStep1, 2に従い、RNAを沈殿させる。
5. RNAの洗浄へ進む。

C. RNAの洗浄

1. 氷冷した75%エタノール1mL(サンプル量が少ない場合)もしくは10mL(サンプル量が多い場合)を加え、沈殿物(RNA)を洗う。RNase-freeのピペットチップまたはガラス棒で沈殿物(RNA)を破碎する。10,000 ×g、4、10分間遠心する。
2. ペレットをRNase-free環境下または、真空デシケーター内で5-20分間(ペレットの大きさによる)乾燥させる。
(注)乾燥させすぎないようにお気を付けください。
3. Nuclease-Free Water 又はRNase-free TE bufferでRNAを溶解し、-20で保存する。



酢酸ナトリウムを
ライセートに追加



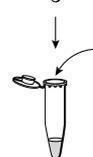
フェノール：クロロホルム：
イソアミルアルコールを
チューブに加え、混和後、氷冷



新しいチューブに移し、遠心



上部の水層を
新しいチューブに移す



イソプロパノールを添加後、
-20 でインキュベーション



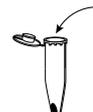
遠心後、上澄を除去



(RT-PCRを行う場合は、
"RNAの洗浄" にジャンプ)
Denaturing Solutionを加え
ボルテックス



イソプロパノールを加え、
遠心後、上澄を除去



RNAの洗浄：
氷冷した75%エタノールを添加



遠心後、上澄を除去



RNAペレットを風乾し、
水またはTEに溶解し保存

チューブサイズ (推奨する 最小のもの)	組織	培養細胞	Denaturing & Solution	2M Sodium Acetate	Phenol : Chloroform : IAA	Denaturing Solution (2nd Addition)
30ml	1,000mg	1.0 × 10 ⁸	12ml	1,200 μl	12ml	5ml
30ml	750mg	7.5 × 10 ⁷	9ml	900 μl	9ml	
15ml	500mg	5.0 × 10 ⁷	6ml	600 μl	6ml	2.5ml
15ml	250mg	2.5 × 10 ⁷	3ml	300 μl	3ml	
15ml	100mg	1.0 × 10 ⁷	1.2ml	120 μl	1.2ml	
2ml	75mg	7.5 × 10 ⁶	900 μl	90 μl	900 μl	500 μl
1.5ml	50mg	5.0 × 10 ⁶	600 μl	60 μl	600 μl	
1.5ml	25mg	2.5 × 10 ⁶	300 μl	30 μl	300 μl	
0.5ml	10mg	1.0 × 10 ⁶	120 μl	12 μl	120 μl	100 μl
0.5ml	5mg	5.0 × 10 ⁵	60 μl	6 μl	60 μl	

IAA: Isoamyl Alcohol

技術的なお問合せは:

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



Promega

Revised 6/03
Part #RNAgentJ