

ISOGEN II

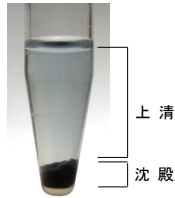
Code No. 317-07363

マニュアル（第5版）20190305

I 製品説明

ISOGEN II (アイソゼン II) は、動物組織および培養細胞からの total RNA および small RNA 抽出用試薬です。

本品は、フェノールとグアニジンを含む均一な液体であり、細胞成分との相互作用により、シングルステップで RNA を単離できます。従来法の試薬 (ISOGEN や ISOGEN-LS) のようにクロロホルムを用いた液相分離の必要がありません。試料に ISOGEN II を加えて溶解またはホモジナイズした後、水を添加すると、DNA、タンパク質、ポリサッカライド等は沈殿 (不溶化) するため、遠心分離によって除去できます (右図)。上清をエタノール沈殿、洗浄、溶解すると、高純度な RNA が単離できます。



■ 特長

- RNA の単離にクロロホルムを使用しない。
- 従来法の試薬 (ISOGEN など) よりも small RNA の抽出効率が良い。
- 高分子 RNA (> 200 base) と small RNA (< 200 base) を分画できる (分画しない方法もある)。
- DNA の混入が少なく、抽出した RNA はそのまま RT-PCR や定量 RT-PCR に使用できる。
- 約 1 時間で RNA が抽出可能。

II 製品内容

Code No. 317-07363

- ISOGEN II 10 ml
- マニュアル 1 部

III 保存

冷蔵保存

- お買い求めになった日から 6 ヶ月以内にご使用下さい。
- 本品は室温で送付しております。製品到着後、2~10℃で保存していただくことにより、問題なくご使用いただけます。

IV 使用上の注意

- 本品は、試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
- また、試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱わないで下さい。
- ISOGEN II は医薬用外劇物 (フェノール製剤) ですので、取り扱いにはご注意ください。
- ご使用の際には適切な保護具 (手袋、眼鏡等) を着用して下さい。
- 蒸気を吸入しないようにし、換気を十分に行ってください。
- 目に入ったり皮膚に付着したりした場合は、大量の水で少なくとも 15 分間は洗い流し、医師の診察を受けて下さい。
- 本品の取り扱い、マニュアル記載内容通りに行ってください。
- マニュアル記載内容と異なった取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。
- 安全性データシート (SDS) につきましては、ニッポンジーンホームページ (<https://www.nippongene.com/siyaku/list.html>) にてご覧いただけます。

V プロトコール

- 本品以外に RNase フリー水、エタノール、イソプロパノールを用意する。
- 必要に応じて、別途 p-Bromoanisole (富士フィルム和光純薬㈱、Code No.027-16801)、Glycogen (富士フィルム和光純薬㈱、Code No.076-06621) を用意する。
- チューブは透明なポリプロピレン製を用いるとよい。使用前に、遠心分離の強度 (12 K×g) と ISOGEN II (フェノール) に対する耐性があるか確認する。
- プロトコールでは 1 ml の ISOGEN II を添加する方法を記載しており、その場合 2.0 ml 容量のチューブが必要であるが、抽出スケールを使用する遠心チューブの容量に合わせてもよい。例えば、プロトコールを 0.8 倍にスケールダウンすると 1.5 ml 容量のチューブで使用できる (組織 ~80 mg + ISOGEN II 0.8 ml + RNase フリー水 0.32 ml の混合物を遠心分離して、上清を 0.8 ml 回収する)。
- 全ての操作は室温で行えるが、遠心は 4~28℃で行うことを勧める。

サンプル、目的に応じて A または B の方法で RNA を単離する。

A : total RNA の単離 (高分子 RNA と small RNA を別々に単離する場合)

A-1 : 高分子 RNA の単離

A-2 : small RNA の単離

B : total RNA の単離 (高分子 RNA と small RNA を合わせて単離する場合)

A : total RNA の単離 (高分子 RNA と small RNA を別々に単離する場合)

A-1 : 高分子 RNA の単離

サンプル*¹⁾

(組織 : ~100 mg、細胞 : 培養ディッシュ (10 cm²) または ~10⁷ 細胞、液体試料 : 0.4 ml)

- 1 ml ISOGEN II
溶解またはホモジナイゼーション*²⁾
- 0.4 ml (または 0.4 倍量) RNase フリー水
15 秒間、激しくシェイクして混合
室温 5~15 分間*³⁾ 放置
遠心 (12 K×g, 15 分間)*⁴⁾

上清 (1 ml : このとき上清は全量取らない)*⁵⁾

- 5 μl (または 0.5% 量) p-Bromoanisole
15 秒間、シェイクして混合
室温 3~5 分間 放置
遠心 (12 K×g, 10 分間)

オプション*⁶⁾

上清

- 0.4 ml (または 0.4 倍量) 75% エタノール 転倒混合
室温 10 分間 放置
遠心 (12 K×g, 8 分間)

沈殿*⁷⁾

上清*⁸⁾ A-2. small RNA の単離に使用

- 0.5 ml 75% エタノール*⁹⁾
遠心 (4 K~8 K×g, 1~3 分間)
- もう一回繰り返す

沈殿

- RNase フリー水*¹⁰⁾

高分子 RNA 溶液*¹¹⁾ (高分子 RNA >200 base)

A-2 : small RNA の単離

A-1 のエタノール沈殿後に得られた上清*⁶⁾

- 2 μl 20 mg/ml Glycogen*¹²⁾
ボルテックス
- 0.8 倍量のイソプロパノール 転倒混合
4℃ 30 分間 放置
遠心 (12 K×g, 15 分間)

沈殿*¹³⁾

- 0.5 ml 70% イソプロパノール*⁹⁾
遠心 (4 K~8 K×g, 1~3 分間)
- もう一回繰り返す

沈殿

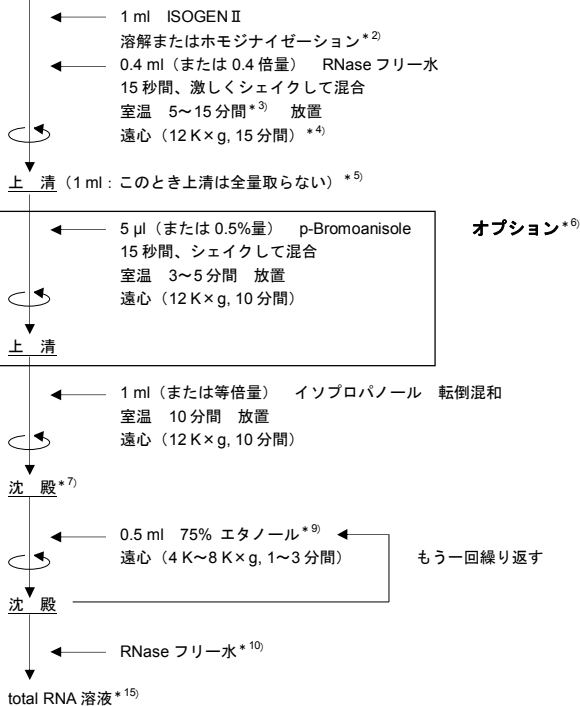
- RNase フリー水*¹⁰⁾

small RNA 溶液*¹⁴⁾ (small RNA 10~200 base)

B: total RNAの単離 (高分子 RNA と small RNA を合わせて単離する場合)

サンプル*1)

(組織: ~100 mg, 細胞: 培養ディッシュ (10 cm²) または ~10⁷ 細胞, 液体試料: 0.4 ml)



プロトコル A-1 および B で得られる RNA の収量の目安は次の通りである。

試料	プロトコル A-1	プロトコル B	
組織	肝臓	5~7 μg RNA/mg tissue	6~8 μg RNA/mg tissue
	腎臓、脾臓	3~4 μg RNA/mg tissue	3~4 μg RNA/mg tissue
	骨格筋、脳、肺	0.5~1.5 μg RNA/mg tissue	0.5~1.5 μg RNA/mg tissue
	胎盤	1~3 μg RNA/mg tissue	1~3 μg RNA/mg tissue
培養細胞	上皮細胞	5~8 μg RNA/10 ⁶ cells	5~10 μg RNA/10 ⁶ cells
	繊維芽細胞	3~5 μg RNA/10 ⁶ cells	4~6 μg RNA/10 ⁶ cells

単離した RNA の A260/A280 は 1.7~2.1 である。

VI トラブルシューティング

トラブル	対策
低収量	サンプルのホモジナイゼーションまたは溶解を十分に行う。*2) 参照 得られた RNA 沈殿の溶解を十分に行う。
A260/A280 < 1.6	試料の量に対して添加する ISOGEN II の量を増やす。 吸光度測定には、TE (pH 8.0) など pH 8.0 以上のバッファーを使用する。 得られた RNA 沈殿の溶解を十分に行う。 プロテオグリカンやポリサッカライドが混入している可能性があるため、下記の対策を行う。
RNA の分解	組織を抽出後、すぐに ISOGEN II で処理する。または速やかに液体窒素で凍結させる。 凍結させた試料は -70°C で保存する。 培養細胞の場合、トリプシン処理や洗浄などの前処理を行わない。 RNA 溶解用の溶液やチューブは、RNase フリーのものを使用する。 オプション操作を行う。*6) 参照
DNA の混入	試料の量に対して添加する ISOGEN II の量を増やす。 有機溶媒、強緩衝液、塩、アルカリ性溶液を含む試料を用いない。 ホモジネートに水を添加した後の混合液を 15 分間放置し、16 K×g で遠心し、DNA を沈殿させる。 DNA 沈殿後の上清は慎重に取る。*5) 参照
脂肪、プロテオグリカン、ポリサッカライドの混入	ホモジネートを遠心 (12 K×g, 10 分間) して、脂肪や沈殿 (不溶物) を除去する。 オプション操作を行う。*6) 参照

VII 関連製品

Code No.	製品名	包装単位
311-07361	ISOGEN II	100 ml
311-02501	ISOGEN	100 ml
311-02621	ISOGEN-LS	100 ml

・記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。
・Molecular Research Center, Inc. よりライセンスを受けています。

*1) **組織**の場合、ISOGEN II 1 ml あたり 100 mg を上限として、ガラスフェロンホモジナイザーまたはポリロンホモジナイザーでホモジナイゼーションする。夾雑物の多い組織 (肝臓や脾臓など) の場合、ISOGEN II 1 ml あたり使用する組織の量は 50 mg にする。プロトコルでは 1 ml の ISOGEN II を添加する方法を記載しているが、使用する遠心チューブの容量に合わせてよい。残りのホモジネートは凍結して保存できる。*2) 参照

接着細胞の場合、培養ディッシュから培地を除去し、3.5 cm ディッシュ (10 cm²) あたり少なくとも 1 ml の ISOGEN II を加え、ピペティングして完全に溶解する。使用する ISOGEN II の量は、細胞数ではなく培養ディッシュの面積をもとにする。

浮遊細胞の場合、遠心分離して細胞を沈殿させた後、培地を除去し、10⁷ 細胞あたり少なくとも 1 ml の ISOGEN II を加え、ピペティングして細胞を溶解する。

培養細胞は、トリプシン処理や洗浄などの前処理をすると、RNA の分解が起こる可能性があるため、培地の除去後すぐに ISOGEN II を加える。また、使用する ISOGEN II の量が試料に対して不十分な場合、単離した RNA に DNA が混入することがある。

液体試料の場合、0.4 ml までの液体試料に対し 1 ml の ISOGEN II を加え、溶解する。0.4 ml に満たない少量の液体試料で行う場合は、試料と 1 ml の ISOGEN II をいったん混合した後、混合液がトータル 1.4 ml になるように RNase フリー水を追加する。この後、室温で 5~15 分間放置する操作に進む。

全血の場合、ISOGEN-LS の使用を勧める。

脂質が多い試料の場合、ホモジネートを一度 12 K×g で 5 分間遠心する。このとき脂肪はチューブの最上層に集まるので、ピペットやシリンジで脂肪層を貫通して上清を取り、新しいチューブに移す。遠心操作を 4~10°C で行うと、脂肪層が固まり、操作しやすくなる。

*2) RNA の純度と収量を維持するため、組織の抽出を素早くすることと効果的にホモジナイゼーションすることが重要である。

- ・抽出した組織は ISOGEN II 中ですぐにホモジナイゼーションするか、速やかに液体窒素中で凍結させる。
- ・ホモジナイゼーション方法は、ハイスピードにセットしたポリロンホモジナイザーで 2~3 分破砕する方法が最も効果的である。脳サンプルは泡立ちやすいので、ガラスフェロン製のホモジナイザーを使用する。
- ・RNase を多く含む組織の場合、RNA の分解を防ぐため、冷した ISOGEN II を使用する。
- ・組織の重量を測定する際には、チューブにあらかじめ ISOGEN II を 1~5 ml 入れ、電子天秤に載せてゼロ合わせする。その中に抽出直後の新鮮な組織または凍結組織を入れて重量を測定し、すぐにホモジナイゼーションする。組織をいったん破砕した後、不足分の ISOGEN II を追加し、再懸濁する (例えば、組織 80 mg に対して ISOGEN II 1 ml の比率にする)。
- ・ホモジネートは 4°C で一晩、-20°C または -70°C で少なくとも 1 年間保存できる。凍結保存していたホモジネートは、37~40°C で 5 分間インキュベートすると融解する。

*3) サンプル処理濃度上限の 100 mg の組織に 1 ml の ISOGEN II で処理した場合や DNA が多く含まれるサンプルの場合、15 分間放置する。

*4) 遠心後、DNA、タンパク質、ポリサッカライド等の多くは、チューブの底に青色の半固体の沈殿を形成する。RNA は上清に溶解している。例えば、組織 100 mg に対して ISOGEN II 1 ml で処理した場合、DNA とタンパク質の沈殿は、ホモジネートと水の混合液のトータル容量の約 10% になる (組織 80 mg に対して ISOGEN II 1 ml であれば、約 8%)。

*5) 上の方から慎重に上清を 1 ml (上清のトータル容量の 75%) を取り、新しいチューブに移す。このときの上清には青色が残っている。沈殿には DNA が含まれているので、沈殿近くの上清は残し、DNA を混入させないように注意する。

*6) このオプション操作を行うことで、混入していた DNA、タンパク質、ポリサッカライド等が沈殿するため、夾雑物の多いサンプル (特に肝臓、腎臓、脾臓、筋肉などの組織) の場合に有効である。

*7) RNA の白い沈殿は、チューブの底に付着する。

*8) 上清を新しいチューブに移し、small RNA を単離するために 4°C または -20°C で保存しておく。このとき高分子 RNA の混入を防ぐため、上の方から慎重に上清の 85% 量を取るようにする。このときの上清には薄く青色が残っている。この上清は、-20°C で少なくとも 1 年間保存することができる。

*9) この状態で、室温で一晩、4°C で 1 週間、-20°C または -70°C で 1 年間保存することができる。

*10) 上清をマイクロピペットでできるかぎり取り除いた後、RNA 沈殿を適量の RNase フリー水で溶解する。RNA 沈殿を乾燥させすぎると、溶解性が著しく減少する。RNA 沈殿は、ボルテックスやピペティングで溶解させ、室温で 2~5 分間放置するとよい。使用するチューブは RNase フリーのものを用意する。

*11) ここで単離した RNA は、200 base 以上の高分子 RNA で、rRNA と mRNA が含まれる。これらの RNA は、細胞内の RNA の約 80~85% を占める。残りの small RNA 画分はプロトコル A-2 で単離できる。

*12) Glycogen を添加すると、効率良く small RNA を回収することができる。

*13) このときの沈殿はかなり小さく、見えにくいことがあるので注意する。

*14) ここで単離した RNA は、10~200 base の small RNA である。

*15) ここで単離した RNA は、高分子 RNA と small RNA を含む total RNA である。