

土壌からの RNA 抽出キット

ISOIL for RNA

Code No. 312-07411

マニュアル(第3版)20101124YM-1807

I 製品説明

ISOIL for RNA は土壌サンプルから RNA を抽出するためのキットです。ビーズによる強力な物理的破碎と試薬による溶菌作用を併せることで強固な細胞壁を持つ微生物からも RNA を抽出することができます。さらに、RNA 抽出液にフッ素化合物を添加することで、非火山灰土壌はもちろん、これまで困難とされてきた火山灰土壌からも RNA の抽出が可能になりました。また、酵素反応を阻害する腐植物質などの夾雑物質を効果的に除去できる精製プロトコルの採用により、簡便に高純度の RNA を精製することができます。得られた土壌 RNA は RT PCR-DGGE 解析や RT real-time PCR などに適しています。

本品は、日本の土壌からの RNA 抽出に最適化したものであり、約 4 時間で純度の高い RNA を高収量で抽出できます。

II 製品内容

Code No. 312-07411 (50 回用)

内容	容量	保存温度
Beads Tube R ^{*1)}	50 本	室温
Sodium Silicofluoride Solution	10 ml × 1 本	室温(劇物) ^{*3)}
Lysis Solution R	25 ml × 1 本	室温
Lysis Solution 20S	1.25 ml × 3 本	室温 ^{*4)}
Purification Solution R ^{*2)}	25 ml × 1 本	室温 ^{*4)}
Precipitation Solution R ^{*2)}	35 ml × 1 本	室温(冷蔵) ^{*5)}
Ethachinmate	100 µl × 1 本	室温(冷蔵) ^{*5)}
3M Sodium Acetate (pH5.2)	500 µl × 1 本	室温
TE (pH8.0)	10 ml × 1 本	室温
Deoxyribonuclease (RT Grade)	250 units × 1 本	-20°C
10 × DNase (RT Grade) Buffer	1 ml × 1 本	-20°C
2 mg/ml BSA Solution	1 ml × 1 本	-20°C

*1) RNA 抽出プロトコルは本キット添付の Beads Tube R をご使用下さい。別途、2 ml チューブ対応のビーズ式破碎装置をご用意していただく必要があります。

*2) 「Purification Solution R」の蓋には赤色のシールを、「Precipitation Solution R」の蓋には緑色のシールを貼付しました。ご使用の際には、お取り間違えのないようにお気を付け下さい。

*3) Sodium Silicofluoride Solution (ケイフッ化ナトリウム溶液) は、医薬用外劇物ですので取り扱いには十分ご注意ください。

*4) Lysis Solution 20S および Purification Solution R 中に結晶が析出する場合がありますが、品質、性能に問題はありません。このような場合には、容器ごと 65°C で 1 時間程インキュベートし、結晶を完全に溶解させてからご使用下さい。

*5) Precipitation Solution R および Ethachinmate については、使用時のコンタミネーション(カビや雑菌等の混入)に注意し、開封後は冷蔵(2~10°C)で保存することをお勧めします。Precipitation Solution R は特にカビ等が繁殖しやすい溶液組成となっていますので、溶液中に浮遊物が見られた場合は使用を中止し、新しいキットをご購入下さい。

III 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。
- ・ Sodium Silicofluoride Solution (ケイフッ化ナトリウム溶液) は、医薬用外劇物ですので、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。
- ・ 本品の取扱いは、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 WEB ページ(www.nippongene.com)にてご覧になれます。
- ・ 本品は国立研究開発法人 科学技術振興機構(JST)が所有する特許のライセンスを受けて製造販売しております。

IV プロトコル

重要 新鮮な土壌を用いて下さい。採取した土壌をすぐにご利用できない場合は、低温(2~10°C)で保存し、できるだけ早く RNA 抽出プロトコルにご使用下さい。

<本品以外に必要な試薬、機器など>

- エタノール、80% エタノール、70% エタノール
- クロロホルム
- フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)
- RNase フリー水
- ビーズ式破碎装置(2 ml チューブ対応のもの)
- マイクロピペット(P10~P1000)
- ピペットチップ(10 µl~1000 µl 用)
- 1.5 ml~2 ml 容マイクロチューブ
- インキュベーター(ウォーターバス等)
- マイクロ遠心機
- ボルテックスミキサー

(関連製品)

Code No.	製品名	包装単位
311-90151	Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1)	250 ml
316-90101	Distilled Water, Deionized, Sterile	100 ml
318-90105		500 ml
312-90103		100 ml × 6
314-90021	TE (pH 8.0)	100 ml
316-90025		500 ml
310-90023		100 ml × 6
312-01791	Ethachinmate	0.2 ml
317-07363	ISOGEN II	10 ml
311-07361		100 ml
316-06211	ISOIL	50 回用
319-06201	ISOIL for Beads Beating	50 回用

1. <RNA 抽出プロトコール>

土壌サンプル 0.5 g を Beads Tube R に入れる

- ← 120 µl Sodium Silicofluoride Solution*¹⁾
- ← 420 µl Lysis Solution R
- ← 300 µl フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール
- ← 60 µl Lysis Solution 20S
- ビーズビーティング (5 m/秒間, 30 秒間)*²⁾
- インキュベート (65°C, 2 時間)

遠心 (12,000 × g, 5 分間, 室温)

水層 450 µl を新しい 2 ml 容チューブに移す*³⁾

- ← 450 µl Purification Solution R (赤シール貼付)
- ボルテックスで混合
- ← 450 µl クロロホルム、ボルテックスで 15 秒間混合

遠心 (12,000 × g, 20 分間, 室温)

水層 650 µl を新しい 2 ml 容チューブに移す*⁴⁾

- ← 650 µl Precipitation Solution R (緑シール貼付)*⁵⁾
- ボルテックスで混合

遠心 (20,000 × g, 15 分間, 4°C)*⁶⁾

上清を除去し、沈殿を残す*⁷⁾

- ← 1 ml 70%~80%エタノール
- ← 2 µl Ethachinmate、ボルテックスで混合*⁸⁾

遠心 (20,000 × g, 5 分間, 4°C)

上清を除去したあと、沈殿を風乾*⁹⁾

- ← 155 µl RNase フリー水で溶解*¹⁰⁾

核酸溶液 155 µl (DNase 処理プロトコールへ続く)*¹¹⁾

2. <DNase 処理プロトコール>*¹²⁾

核酸溶液 155 µl

- ← 5 µl Deoxyribonuclease (RT Grade)
- ← 20 µl 10 × DNase (RT Grade) Buffer
- ← 20 µl 2 mg/ml BSA Solution
- ピペッティングで軽く混合
- インキュベート (37°C, 15 分間)*¹³⁾

- ← 200 µl フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール、ボルテックスで混合

遠心 (12,000 × g, 5 分間, 室温)

水層 ~200 µl を新しい 1.5 ml 容チューブに移す*⁴⁾

- ← 200 µl フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール、ボルテックスで混合*¹⁴⁾

遠心 (12,000 × g, 5 分間, 室温)

水層 ~200 µl を新しい 1.5 ml 容チューブに移す*⁴⁾

- ← 200 µl クロロホルム、ボルテックスで混合

遠心 (12,000 × g, 5 分間, 室温)

水層 ~200 µl を新しい 1.5 ml 容チューブに移す

- ← 6.6 µl 3M Sodium Acetate (pH5.2)
- ← 500 µl エタノール、ボルテックスで混合*¹⁵⁾

遠心 (15,000 × g, 5 分間, 室温)

上清を除去し、沈殿を残す

- ← 1 ml 70%エタノール、軽く転倒混合*¹⁶⁾

遠心 (15,000 × g, 5 分間, 室温)

上清を除去したあと、沈殿を風乾*⁹⁾

- ← 10 µl~30 µl TE (pH8.0) で溶解*¹⁰⁾

RNA 溶液*¹⁷⁾

* 1) Sodium Silicofluoride Solution はゾル状態のため、よく懸濁してから、200 µl~1000 µl 用のピペットチップを用いて土壌サンプルへ添加します。

* 2) Beads Tube R の蓋がしっかり閉まっていることを確認して下さい。蓋のゆるみはビーズビーティング中の液漏れの原因となります。

* 3) 土壌サンプルの水分含量が少ない場合、遠心後の上清の容量が 450 µl よりも少なくなることがあります。この場合、遠心後の「上清の容量:Purification Solution R の容量:クロロホルムの容量」の比率が、「1:1:1」となるようにして下さい。

* 4) 遠心終了後、慎重にチューブを取り出し、中間層を入れないように注意しながら水層を新しいチューブに移します。

* 5) 水層の容量が 650 µl よりも少ない場合、水層の容量と等量の Precipitation Solution R を添加します。

* 6) ご使用の遠心機の最大遠心力が 20,000 × g よりも小さい場合は、遠心機の最大遠心力 (ただし 12,000 × g 以上) で遠心して下さい。

* 7) できるだけ上清を取り除いて下さい。上清に含まれる着色物質 (腐植物質) は PCR を阻害することが知られています。

* 8) このときの沈殿ははがれやすくなっています。Ethachinmate の添加で、沈殿を可視化し RNA を安定して回収できるようになります。Ethachinmate を添加しない場合は、ボルテックスを避け、転倒混合によって穏やかに沈殿を洗浄して下さい。

* 9) チューブの蓋を開けたまま、ほこりが入らないようキムワイブなどで覆って、室温で 15 分間程放置して風乾します。

* 10) 沈殿を溶解した状態ですぐに次の操作に進まれる場合は RNase フリー水で溶解し、中断して一時保管する場合は、RNase フリー水ではなく TE 溶液で溶解することをお勧めします。

* 11) RNA 抽出プロトコール終了後の核酸溶液には、RNA の他に多くの DNA が含まれていますが、DNA 溶液としての利用はお勧めできません。DNA 抽出専用キット (ISOIL, Code No.316-06211 など) で回収した DNA 溶液をご利用下さい。

* 12) DNase 処理プロトコールの代わりに、RNA 抽出・精製用キット (ISOGEN II, 311-07361 など) を用いた精製も可能です。実験例はニッポンジーン WEB ページをご参照下さい。

* 13) 最終的に得られた RNA 溶液に DNA が残留している場合は、DNase 処理条件 (反応時間をのばす、酵素量を増やす、反応系を大きくする、等) を検討して下さい。

* 14) RNA の純度を上げるため、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出は 2 回行います。

* 15) 水層の量に対して 2.5 倍量のエタノールを添加します。エタノールの代わりにイソプロパノールも使用できますが、その場合は、水層の量に対して等量 (水層の量が 200 µl の場合は、イソプロパノールの量を 200 µl) 添加して下さい。

* 16) RNA 溶液は、70%エタノール溶液中で -70°C で安定して保管できます。

* 17) RT-PCR などの鋳型に使用できる純度の RNA が得られます。

土壌は極めて多様なサンプルです。土壌の種類によってはプロトコールを一部変更することで RNA 収量が改善する場合があります。詳細についてはニッポンジーン ホームページをご覧ください。

株式会社ニッポンジーン 遺伝子工学研究用試薬
www.nippongene.com/siyaku/