

植物組織からの RNA 抽出キット (DNase I なし)

ISOSPIN Plant RNA (w/o DNase I)

Code No. 315-09581

操作マニュアル Ver.1-2408

ISOSPIN Plant RNA (w/o DNase I) は、植物組織から RNA を抽出・精製するためのキットです。本キットは、カオトロピックイオン存在下で RNA がシリカへ吸着する原理を応用しております。本キットでは、夾雑物を遠心分離により除去する方法とシリカゲル膜上での DNase I 処理を採用しており、別売りの DNase I との組み合わせで、約 1 時間で高純度の RNA を抽出・精製できます。

キット内容

保存：室温保存

| キット内容品 | 容量 (50 回用) | 備考 |
|----------------------------|-------------|------------------------------------|
| PT Extraction Buffer (植物用) | 30 ml × 1 本 | |
| PT Binding Buffer (植物用) | 40 ml × 1 本 | エタノール含有 |
| PT Wash1 Buffer | 40 ml × 1 本 | エタノール含有 (洗浄液) |
| PT Wash2 Buffer | 40 ml × 1 本 | エタノール含有 (洗浄液) |
| ddWater (RNase free) | 1 ml × 8 本 | 溶出用、DNase I 溶液調製用 |
| Spin Column | 50 本 × 1 袋 | 上部パーツ：カラム 下部パーツ：Collection Tube |

※エタノール含有の PT Binding Buffer (植物用)、PT Wash1 Buffer、PT Wash2 Buffer をご使用後は、蒸発を防ぐため速やかに蓋を閉め、保管して下さい。

「ISOSPIN Plant RNA (w/o DNase I)」 (Code No. 315-09581) について

本キットに DNase I は添付されていません。

本紙 P3 の標準プロトコール⑧で調製する DNase I 溶液には、DNase I (RNase free) と、10×DNase I Buffer が必要となります。

別売りの「DNase I (RNase free)」 (Code No. 314-08071) をご用意下さい。

プロトコール

<標準プロトコール>

① 1.5 ml マイクロチューブ

← 20-100 mg の新鮮な植物組織または凍結組織をマイクロチューブに採取

- ・ 組織は採取後速やかに液体窒素中で凍結させるか、すぐに②の処理に進む。
- ・ RNase の活性を抑制するため、秤量は氷冷しながら速やかに行うか、マイクロチューブにあらかじめ PT Extraction Buffer (植物用) を入れておく。

② ← 600 μ l の PT Extraction Buffer (植物用) を加え、ペッスルですり潰す

- ・ チューブの形状に応じたペッスルを使用すると効率よく組織を破砕できる。
- ・ ホモジナイズの不足は低収量につながるので念入りにすり潰す。
- ・ 試料が液中で浮遊する場合、スピンドウンするとすり潰しやすくなる。
- ・ 断片化したゲノム DNA が混入しやすくなるため、ボルテックスは行わない。
- ・ よくすり潰した状態であれば、 -70°C で一晩保存できる。

③ 遠心 (13,000 \times g、10 分間、 4°C)

- ・ 種子などの油分を多く含む試料は液表面に油分が浮遊していることがあるのでなるべく採取しないようにする。
- ・ 析出物を多く含む場合は回収した上清を再度、遠心 (13,000 \times g、10 分間、 4°C) し、上清を回収する。

④ 上清を新しいマイクロチューブに回収

← 上清と等量の PT Binding Buffer (植物用) を加えて、数回転倒混和

例) 上清 550 μ l の場合は、PT Binding Buffer (植物用) 550 μ l を添加する。

混合液を軽くスピンドウン

(次のページの⑤に続く)

(前のページからの続き)

⑤ Spin Column に④で調製した混合液を 600 μ l 添加 (残りは⑥で全量添加)



遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C)

- ・ 遠心後、スピncラム上に溶液が残っている場合は、追加で 1 分間遠心する (それでも溶液が残る場合は、抽出する植物試料の量を減らす)。

ろ液を捨てる

- ・ Spin Column のカラムを外し、Collection Tube の中のろ液を捨てた後、カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。(以降、「ろ液を捨てる」は同様)

⑥ ← 残りの④の混合液を Spin Column に全量添加



遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C)

ろ液を捨てる

⑦ ← 500 μ l の PT Wash1 Buffer を Spin Column に添加



遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C)

ろ液を捨てる

⑧ ← 用事調製した 100 μ l の DNase I 溶液を Spin Column に添加

用事調製

| | |
|----------------------------|-------------------|
| 10 \times DNase I Buffer | 10 μ l |
| DNase I (RNase free) | 30 units |
| ddWater (RNase free) | up to 100 μ l |

* DNase I (10 \times DNase I Buffer 付属) は別売

静置 (15 分間、室温)

- ・ 抽出する植物試料が多いとき、DNase I 溶液が浸透しない場合がある。その場合は、抽出する植物試料の量を減らす。

⑨ ← 300 μ l の PT Wash1 Buffer を Spin Column に添加



遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C)

ろ液を捨てる

⑩ ← 600 μ l の PT Wash2 Buffer を Spin Column に添加



遠心 (13,000 \times g、2 分間、4 $^{\circ}$ C) し、ろ液と Collection Tube を捨てる

⑪ Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す

← 50 μ l の ddWater (RNase free)をメンブレン中央に滴下

静置 (3 分間、室温)



遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C)

RNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される

<オプションプロトコール> (標準プロトコールでは RNA 抽出が困難な植物試料の場合)

別売りの「Assist Buffer for ISOSPIN Plant RNA」(Code No. 315-08501) を用意する。

① 1.5 ml マイクロチューブ

← 5-100 mg の新鮮な植物組織または凍結組織をマイクロチューブに採取

- ・ 少量の植物試料から検討を始め、段階的に植物試料の量を増やす。
- ・ 夾雑物が多い試料は洗浄等の前処理を行うと有効な場合がある。
前処理例：植物試料に 300 μ l の TE を加え、1 分以内に軽くペッスルですり潰し、遠心 (13,000 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ C) した後、上清を取り除く。

② ← 用事調製した 600 μ l の抽出液を添加

- ・ 「Assist Buffer for ISOSPIN Plant RNA」の Assist Buffer 1 と Assist Buffer 2 は、混合した状態で保存できません。

用事調製 (使用する直前に調製する)

| | |
|----------------------------|-------------|
| PT Extraction Buffer (植物用) | 500 μ l |
| Assist Buffer 1 | 60 μ l |
| Assist Buffer 2 | 40 μ l |

ペッスルですり潰す

- ・ 試料が液中で浮遊する場合、スピンドウンするとすり潰しやすくなる。
- ・ ホモジナイズの不足は低収量につながるので念入りにすり潰す。
- ・ 断片化したゲノム DNA が混入しやすくなるため、ボルテックスは行わない。
- ・ よくすり潰した状態であれば、-70 $^{\circ}$ C で一晩保存できる。

③  遠心 (13,000 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ C) し、上清を新しいマイクロチューブに回収

- ・ 液表面に油分が浮遊している場合、なるべく採取しないようにする。

 回収した上清を再度、遠心 (13,000 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ C)

④ 上清を新しいマイクロチューブに回収

← 上清と等量の PT Binding Buffer (植物用) を添加
均質になるまで数回転倒混和

 混合液を遠心 (13,000 \times g、30 秒間、4 $^{\circ}$ C)

混合液の上清を新しいマイクロチューブに回収
(前のページ、標準プロトコールの⑤に続く)

※トラブルシューティングは、ISOSPIN Plant RNA (310-08171) の詳細マニュアル [WEB 版] をご参照下さい。

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。
マニュアル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。

<お問い合わせ先>

株式会社ニッポンジーン 学術営業課 TEL 076-451-6548 (受付：平日 9 時-12 時、13 時-17 時)

ホームページ URL <https://www.nippongene.com/siyaku/>