

Total RNA Extraction Kit Mini (Tissue)



Cat. No. YRT50
50 ミニプレップ

Cat. No. YRT100
100 ミニプレップ

RB Buffer: 30ml **
R-W1 Buffer: 25ml
R-Wash Buffer (conc.): 25ml *
RNase-free Water: 10ml
RB Column (2ml Collection Tube にセットして提供): 50 本
Filter Column (2ml Collection Tube にセットして提供): 50 本
Micropestle (RNase-free): 50 本

RB Buffer: 60ml **
R-W1 Buffer: 50ml
R-Wash Buffer (conc.): 25ml *
RNase-free Water: 10ml
RB Column (2ml Collection Tube にセットして提供): 100 本
Filter Column (2ml Collection Tube にセットして提供): 100 本
Micropestle (RNase-free): 100 本

対象サンプル (プロトコール掲載): 新鮮/凍結動物性組織

サンプル量: 10~15mg

収量: 3~25 µg

溶出量: 50 µl

* 初めにご使用になる前に、R-Wash Bufferに4倍量のエタノール(YRT100:100ml)を加えてください。

** ご使用になる前に、RB Buffer 1ml に対して 10 µl の割合で β-メルカプトエタノール (β-ME) を加えてください。β-ME を加えた RB Buffer は1ヶ月まで常温で保存できます。

本製品の付属品は全て RNase フリーです。

1

組織用プロトコール

追加でご用意いただくもの: 70%エタノール、エタノール、1.5ml 遠心チューブ (RNase フリー)、20G 注射針シリンジ、DNase I (RBC Cat. No. DN050)、β-メルカプトエタノール (β-ME)

※ ご使用前に RB Buffer 1ml に対して 10 µl の割合で β-ME を入れてください。β-ME を加えた後でも RB Buffer は室温 (15~25°C) で1ヶ月間安定しています。

細胞の溶解

- 新鮮な、または冷凍保存した動物性組織を 10mg 切り取り、RNase フリーの 1.5ml 遠心チューブ (本製品に付属しません) に移し入れる。
- (β-ME 添加済みの) RB Buffer 350 µl をチューブに加え、付属の micropestle (ミニすりこぎ) を使用して組織をすりつぶす。
- サンプル溶液を 20G 注射針シリンジに 10 回通して組織を剪断する。
- 室温で 5 分間インキュベートする。Collection Tube 内にセットされた Filter Column にサンプル溶液を加える。
- フルスピード (10,000xg, 13,000rpm) で 2 分間、遠心して、透明な排液を新しい 1.5ml 遠心チューブ (本製品に付属しません) に移し入れる。
- サンプル溶液に 70%エタノール 350 µl を加え、すぐに、ピペッティングにより混ぜ合わせる。

RNA の吸着

- Collection Tube 内にセットされた RB Column を準備する。
- 得られた溶液を RB Column にアプライする。
- フルスピード (10,000xg, 13,000rpm) で 2 分間、遠心する。
- 排液を捨て、RB Column を 2ml Collection Tube 内に戻す。

付加処理:

カラム上で DNase による DNA 消化を行う場合は、「推奨ステップ: 残留 DNA の分解」手順 A に従ってください。

洗浄

- RB Column に R-W1 Buffer 400 µl を加える。
- フルスピードで 1 分間、遠心する。
- 排液を捨て、RB Column を 2ml Collection Tube 内に戻す。
- RB Column に (96-100%エタノールを加えた) R-Wash Buffer 600 µl を加える。
- フルスピードで 1 分間、遠心する。
- 排液を捨て、RB Column を Collection Tube 内に戻す。
- 再度、遠心分離機にフルスピード (10,000xg, 13,000rpm) で 3 分間かけて、カラム充填材を乾かす。

3

Total RNA Extraction Kit Mini

概要

Total RNA Extraction Kit Mini (Tissue) は、様々な種類の動物性組織や動物細胞から全 RNA を精製するために設計されています。付属の micropestle (ミニすりこぎ) を使用して、チューブ内の組織試料を効率よくホモジナイズすることができます。

本製品では、界面活性剤とカオトロピック塩を使用して細胞を溶解させ、RNase を不活性化します。次に、フィルターカラムを使用して細胞溶解液からデブリを取り除きます。カオトロピック溶液中の RNA は、スピнкаラム内のガラスファイバー充填材に結合されます。不純物を洗い流した後、RNase-free Water を加えることにより、精製された RNA が溶出されます。

精製された RNA は RT-PCR、ノーザン・ブロットング、プライマー伸長、cDNA ライブラリ構築などの用途に使用できます。

品質管理

Total RNA Extraction Kit Mini (Tissue) はロット毎に、品質試験を行っています。

留意点 (混入したゲノミック DNA の除去について)

本製品は選択的に RNA を吸着するために最適化されていますが、RNA 抽出のプロセスにおいてゲノミック DNA の混入を完全に防ぐことは極めて困難です。混入したゲノミック DNA を完全に除去されたい場合は、プロトコールに従い DNase I (RNase フリー) を RB Column に加えてください。このとき DNase は必ず高純度のものをご使用ください。DNase に微量の RNase が含まれている場合、RNA 分解の原因となります。精製された RNA を高感度の用途に利用される場合は DNase のご使用をお勧めしますが、多くの用途においては、ゲノミック DNA の混入は無視できる程度であるため、必ずしも DNase をお使いいただく必要はありません。

参考文献 (1) Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615.

注意事項 (1) RB Buffer は、刺激性があり有害なカオトロピック塩を含有していません。
(2) 滅菌済みで RNase フリーのピペットチップと遠心チューブを使用してください。また、RNase のコンタミを防ぐため、白衣や使い捨ての手袋を着用してください。

2

Total RNA Extraction Kit Mini

RNA 溶出

- 乾いた RB Column を新しい 1.5ml 遠心チューブ (RNase フリー、本製品に付属しません) に移し入れる。
- カラム充填材の中央に、RNase-free Water 50 µl を加える。
- 20 RNase-free Water が充填材に吸収されるまで 3 分間、チューブを立てて置く。
- 遠心分離機にフルスピードで 1 分間かけて、精製された RNA を溶出させる。

推奨ステップ: 残留 DNA の分解 手順 A (ミニ・カラム)

- RB column に 200 µl の R-W1 Buffer を加える。静かに蓋を閉め、スピнкаラム・メンブレンを洗うため、フルスピード (10,000xg, 13,000rpm) で 15 秒間、遠心する。排液を捨てる。
- 続けて 2a または 2b の処理を行う。
 - 10 µl の DNase I (RBC Cat. No. DN050) 保存溶液 (DN050 のマニュアル参照) を RDD バッファー 70 µl に加える。RDD バッファーは、RNase-Free DNase I Set (DN050) に添付されています。
注意: DNase I は、物理的な変性に特別弱い酵素です。混合はボルテックスではなく、チューブの反転により行ってください。
 - 20 Unit の DNase I 保存溶液を 80 µl の DNase 反応バッファー (1M NaCl, 20mM Tris-HCl, 10mM MnCl₂ pH7.0 at 25°C) に加えてください。
- DNase I 混合溶液 (80 µl) を直接、RB column メンブレンに加え、20-30°C で 15 分間インキュベート。
注意: DNase I 混合溶液が、直接、RB column メンブレンにアプライされるように注意してください。溶液がチューブの壁やスピン・カラムの O リングに残っていると、DNase の消化が不完全になる可能性があります。
- RB column に R-W1 Buffer 200 µl を加える。静かに蓋を閉め、フルスピード (10,000xg, 13,000rpm) で 15 秒間、遠心する。排液を捨てる。R-Wash Buffer による洗浄ステップに進む。

製品の取扱い方法についてのお問合せは、以下の弊社窓口までご相談ください。

RBC Bioscience 社製品 日本総代理店
有限会社 サイトローブ

〒113-0031 東京都文京区根津 2-4-2-1 階
Tel: 03-5842-1749 Fax: 03-5842-1926
E-mail: rbc@scitrove.co.jp

4