

## 対象試料：

オクラ、オレンジ(外皮)、カキ(果肉)、キュウリ(葉)、コショウラン(葉)\*、シクラメン(葉)、チャ(葉)\*、ツバキ(葉)、トマト(果肉、種子)\*、ネギ(葉)\*、バナナ(果肉)、バラ(葉、花弁)、ブドウ(果肉、外皮)、マツ(葉)、ミカン(外皮)

## 抽出困難な植物試料からの total RNA抽出

使用キット： ・ ISOSPIN Plant RNA (Code No.310-08171,316-08173) + Assist Buffer for ISOSPIN Plant RNA (Code No.315-08501)

もしくは

・ ISOSPIN Plant RNA (with Assist Buffer) (Code No.311-09061)

変更点： ・ Assist Bufferの併用

## &lt;簡易プロトコール&gt;

植物の葉：5 - 100 mg

← 600  $\mu$ lのAssist Buffer抽出液

ペッスルですり潰す



遠心 (13,000  $\times$  g, 10 min. 4°C)

回収した上清を再度遠心



遠心 (13,000  $\times$  g, 10 min. 4°C)

上清を回収

← 上清に等量のPT Binding Buffer

転倒混和

遠心(13,000  $\times$  g, 30 sec, 4°C)

混合液の上清600  $\mu$ lをSpin Column (2回に分けて全量)



遠心 (13,000  $\times$  g, 1 min. 4°C)

ろ液を捨てる

← 残りの混合液を添加



遠心 (13,000  $\times$  g, 1 min. 4°C)

ろ液を捨てる

← 500  $\mu$ l PT Wash1 Buffer



遠心 (13,000  $\times$  g, 1 min. 4°C)

ろ液を捨てる

← 100  $\mu$ lのDNase I溶液

室温静置 15分間

← 300  $\mu$ lのPT Wash1 Buffer



遠心 (13,000  $\times$  g, 1 min. 4°C)

ろ液を捨てる

← 600  $\mu$ lのPT Wash2 Buffer



遠心 (13,000  $\times$  g, 2 min. 4°C)

ろ液とCollection Tubeを捨てる

Spin Columnのカラム部を1.5 mlマイクロチューブに移す

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

室温静置 3 min.



遠心 (13,000  $\times$  g, 1 min. 4°C)

RNA溶液

## 備考

少量の試料から検討を始め、段階的に量を増やす。

\*コショウラン(葉)、チャ(葉)、トマト(果肉、種子)、ネギ(葉)は、キット単品でもRNAを得られるが、Assist Bufferを併用することで収量・純度が向上する。

Assist Buffer抽出液(全量600  $\mu$ l)は以下を用事調製

・ PT Extraction Buffer (植物用) : 500  $\mu$ l

・ Assist Buffer 1 : 60  $\mu$ l

・ Assist Buffer 2 : 40  $\mu$ l

RNAの分解を避けるために、遠心は4°Cを推奨 (以降同様)

DNase I溶液は以下を用事調製

・ 10  $\times$  DNase I Buffer : 10  $\mu$ l

・ DNase I (RNase free) : 30 units

・ ddWater (RNase free) : up to 100  $\mu$ l

\*DNase Iの活性は、ロットにより9 - 14 units/ $\mu$ lで異なる

## データ

- ・ 吸光度測定 (収量および純度)

# データ

## ・吸光度

試料	A260/280	A260/230	RNA収量	備考
オクラ	2.14	2.31	80 ng/mg	試料は50 mg程度までにする。 (試料量が多いと粘性により操作が困難となる)
オレンジ(外皮)	2.08	1.81	35 ng/mg	試料は30 mg程度までにする。 (試料量が多いと純度が低下する)
カキ(果肉)	2.09	1.99	30 ng/mg	
キュウリ(葉)	2.15	2.43	0.8 $\mu$ g/mg	
コショウラン(葉)	2.08	1.59	20 ng/mg	*1
シクラメン(葉)	2.16	2.15	0.1 $\mu$ g/mg	
チャ(葉)	2.13	2.20	0.6 $\mu$ g/mg	*1
ツバキ(葉)	1.88	1.12	70 ng/mg	
トマト(葉)	2.15	2.29	0.3 $\mu$ g/mg	
トマト(果肉)	2.31	2.28	25 ng/mg	*1
トマト(種子)	2.20	2.22	60 ng/mg	*1
ネギ(葉)	2.20	2.47	0.1 $\mu$ g/mg	*1
バナナ(果肉)	2.08	1.80	15 ng/mg	
バラ(花卉)	2.08	2.04	80 ng/mg	
バラ(葉)	1.98	1.71	50 ng/mg	
ブドウ(果肉)	1.91	0.86	10 ng /mg	
ブドウ(外皮)	1.93	1.20	60 ng/mg	
マツ(葉)	2.12	2.03	0.3 $\mu$ g/mg	
ミカン(外皮)	1.87	1.95	89 ng/mg	

\*1 Assist Bufferの併用無しでも抽出可能だが、併用により収量・純度が向上した。