

# ISOGEN上清(RNA)のスピнкаラム精製の組み合わせプロトコール検討

**[目的]**

ISOGENで分画した上清(RNA水相)を、スピнкаラム精製キット「ISOSPIN Cell & Tissue RNA」と組み合わせてRNA抽出・精製を行うプロトコールを検討する。また、RNA抽出用スピнкаラムキット単品との比較を行う。

**[対象試料]**

・マウス肝臓 (8週齢 (C57BL/6NCrSlc・オス) から採取)  
液体窒素中で乳鉢・乳棒を用いて粉碎し、各製品(プロトコール)で抽出するために3等分した。

**[対象製品]**

- ① ISOGEN with Spin Column
- ② ISOGEN + ISOSPIN Cell & Tissue RNAの組み合わせ
- ③ ISOSPIN Cell & Tissue RNA

**[プロトコール]**

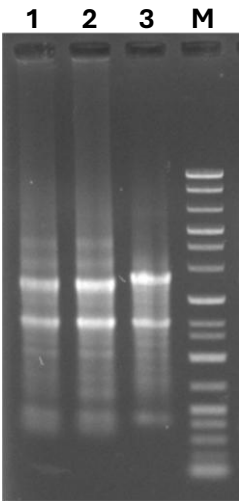
- ①ISOGEN with Spin Column および ③ISOSPIN Cell & Tissue RNAはキットプロトコールに従った。
- ②ISOGEN + ISOSPIN Cell & Tissue RNAについては、一部プロトコールを改変した(別紙1参照)。

**【結果：吸光度測定】**

試料	プロトコール	核酸(ng/μL)	A260/A280	A260/A230
マウス肝臓	① ISOGEN with Spin Column	615.2	2.10	2.27
	② ISOGEN + ISOSPIN Cell & Tissue RNA	490.2	2.17	2.26
	③ ISOSPIN Cell & Tissue RNA	641.7	2.12	2.14

**【結果：電気泳動】**

吸光度測定の結果を基に、RNAを各500 ngアプライした。



レーン	試料	プロトコール
1	マウス肝臓	① ISOGEN with Spin Column
2		② ISOGEN + ISOSPIN Cell & Tissue RNA
3		③ ISOSPIN Cell & Tissue RNA
M	-	Gene Ladder Wide 1 : 3 μL

0.8% Agarose S / TAE Buffer

**[結論]**

各プロトコールでマウス肝臓から高品質なRNAを抽出することができた。  
①ISOGEN with Spin Columnおよび②ISOGEN + ISOSPIN Cell & Tissue RNAでは、素通りしたる液中の低分子RNAを、再吸着させ回収するプロトコールを採用しており、③ISOSPIN Cell & Tissue RNA(単品)よりも、電気泳動で低分子RNAの回収量が多いことが分かった。

[別紙] プロトコール：② ISOGENとISOSPIN Cell & Tissue RNAの組み合わせ

ISOGEN 1 mL + 試料 (液体窒素中で乳棒を用いて粉碎)

↓  
 室温放置 5分間  
 ← クロロホルム 200  $\mu$ L  
 室温放置 2分間  
 激しく混和 15秒間  
 ↻ 遠心 (12 K  $\times$ g、15分間、4℃)

↓  
水相 (400  $\mu$ L)

← 70% エタノール 400  $\mu$ L  
 転倒混和

↓  
ISOSPIN Cell & Tissue RNAのSpin Columnにアプライ

↻ 遠心 (13 K  $\times$ g、1分間、4℃)

↓  
 ろ液(700  $\mu$ L)を回収 \*ろ液中の低分子RNAを回収する目的で実施

← 2-プロパノール 200  $\mu$ L

↓  
Spin Columnに全量アプライ

← PT Wash1 Buffer 500  $\mu$ L  
 ↻ 遠心 (13 K  $\times$ g、1分間、4℃)  
 ろ液を捨てる

← DNase I溶液 100  $\mu$ L  
 室温静置 15分間

← PT Wash1 Buffer 300  $\mu$ L  
 ↻ 遠心 (13 K  $\times$ g、1分間、4℃)  
 ろ液を捨てる

← PT Wash2 Buffer 600  $\mu$ L  
 ↻ 遠心 (13 K  $\times$ g、2分間、4℃)

↓  
Spin Columnのカラムを新しい1.5 mL  $\mu$ チューブの上に移す

← ddWater (RNase free) 50  $\mu$ L  
 メンブレンの中央に滴下  
 室温静置 3分間

↻ 遠心 (13 K  $\times$ g、1分間、4℃)

↓  
RNA溶液