

# ISOGEN上清(RNA)のスピニカ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、スピニカラム精製キット「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抽出用スピニカ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]

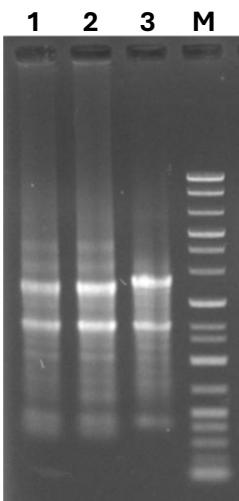
- ①ISOGEN with Spin Column および ③ISOSPIN Cell & Tissue RNAはキットプロトコールに従った。  
 ②ISOGEN + ISOSPIN Cell & Tissue RNAについては、一部プロトコールを改変した(別紙1参照)。

## 【結果：吸光度測定】

試料	プロトコール	核酸(ng/ $\mu$ L)	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		① ISOGEN with Spin Column
2	マウス肝臓	② ISOGEN + ISOSPIN Cell & Tissue RNA
3		③ ISOSPIN Cell & Tissue RNA
M	-	Gene Ladder Wide 1 : 3 $\mu$ L

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、素通りしたろ液中の低分子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 &amp; 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°C)

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°C)  
 ↓ 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°C)  
 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°C)  
 ろ液を捨てる

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

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°C)

RNA溶液