23-06

Nucleic Acid Purification Kit

MagExtractor™ -RNA-

(Code No.: NPK-201F)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD.
Bioproducts Sales and Marketing Department
OSAKA JAPAN

TOYOBO

A4122K

- 目次 -

[1] はじめに・・・

[1]はじめに

本キットは、RNA結合促進剤を含むタンパク質変性剤溶液中でRNAが磁性ビーズに吸着する性質を利用したトータルRNA抽出用の試薬です。本キットにより培養細胞、組織などから得られたRNAは主にRT-PCR（逆転写PCR）に用いることができます。本キットは、全自動核酸抽出装置MFX-2000/2100用の試薬として用いる他に、マニュアル抽出法のキットとしてもご利用になれます。なお、MFX-2000/2100を用いて抽出を行う際はMFX-2000/2100の取扱い説明書もあわせてお読みください。

性能・特長

- 培養細胞をはじめ様々なサンプルよりトータルRNAを抽出・精製することができます。抽出されたRNAには、主にrRNA、mRNAが含まれます。
- フェノール、クロロホルムなどの危険な溶媒は一切使用しません。
- 磁石による粒子の分離により、高回転数の遠心分離操作を必要としません。
- 短時間でのRNAの分離が可能です。MFX-2000/2100を用いた場合、24サンプルを約4時間で抽出完了します。

[2]ご使用になる前に

MagExtractor™-RNA-は以下のサンプルに対応します。

対応サンプル	サンプル量	収量	備考
培養細胞	～5×10^6cells	～10μg/10^6cells	細胞の種類、培養条件によってRNAの収量は変動します。
組織	～30mg	～15μg/30mg	組織の種類、保存条件によってRNAの収量は変動します。
酵母	～10 O.D.(660nm) 培養液0.5mLより回収した細胞	～20μg/5 O.D.	Zymolyase等による前処理が必要です。培養条件等により、RNAの収量は変動します。

- 全血、血清サンプルからの直接抽出では収量が非常に低くなります。全血サンプルの場合、白血球のフィコール遠心分離等の操作が必要となります。
- 酵母同様にLysozyme処理した大腸菌からのRNAの抽出も可能ですが、電気泳動で確認できる程度のゲノムDNAの混入がみられる場合があります。

[3]キットに含まれるもの

本キットには100サンプルのRNA抽出ができる試薬が含まれています。以下の温度で保存してください。

溶解・吸着液（タンパク質変性剤含有）	:77mL	・・・4℃
洗浄液Ⅰ（タンパク質変性剤含有）	:66mL	・・・4℃もしくは室温
洗浄液Ⅱ（低濃度緩衝液）	:176mL	・・・4℃もしくは室温
溶出液（RNase free蒸留水）	:10mL	・・・4℃もしくは室温
磁性ビーズ	:6mL	・・・4℃もしくは室温

・ 試薬が手や衣服に付着した場合や使用後は十分に水洗してください。万一目に入った場合は十分に水洗した後、医師の手当を受けてください。
・ 溶解・吸着液と洗浄液Ⅰには、高濃度のタンパク質変性剤（グアニジン塩酸塩）が含有されていますので、取扱いには十分注意し、手袋を着用するなどの防護措置を講じてください。万一、試薬が手などの皮膚に付着した場合には、十分に水洗を行い、目に入った場合には、水洗を行った後に医師の手当てを受けてください。
・ マニュアルで使用される場合は、洗浄液Ⅰ，洗浄液Ⅱは必ず室温に戻してからご使用ください。 室温でも保存可能です。（長期保存の場合は4℃保存をおすすめします）
・ 溶解・吸着液は、2-メルカプトエタノールと100:1（v/v）の割合で混合して使用します。2-メルカプトエタノールは、キットには添付されておりませんので、別途ご用意ください。混合液は、4℃保存で3ヶ月間ご使用になれます。

[4]プロトコール

1. キットの他に必要なもの

(1)試薬

・ 2-メルカプトエタノール（2ME）（「特級」以上のものをお勧めします）

酵母よりRNAを抽出される場合、さらに以下の試薬が必要になります。
・ Zymolyase（20,000U/g；生化学工業社製）
・ Zymolyase buffer（0.9M Sorbitol, 0.1M EDTA, 50mM DTT(pH7.5)）

(2)器具・機材

MFX-2000/2100をご使用になる場合
・ 専用チューブ（Code No.：MFX-301）
・ 専用フィルター付きチップ（Code No.：MFX-401）
・ 試薬セット用チューブ（50mL用，15mL用，2mL用）[*1]

[*1]試薬セット用チューブには、以下の製品をおすすめします。50mLチューブ：BLUE MAX 2170, 15mLチューブ：BLUE MAX Jr 2196(いずれもBECTON DICKINSON社製), 2mLマイクロチューブ：2220, 2200（イナオプティカ社製），72.693，72.694（アシスト社製）のいずれか

マニュアル法でご使用になる場合

- 1.5mLマイクロチューブ用マグネッチックスタンド[*1]
- ボルテックスミキサー
- ヒートブロック（ウォーターバスでも可）（65℃）
- 簡易卓上遠心機（3,000～5,000r.p.m.くらいの簡易遠心の出来るもの）

2. 試薬の準備

- 溶解・吸着液は2MEと100:1（v/v）の割合で混合してから使用します。必要量だけ調製する場合は、1回分あたり、700μLの溶解・吸着液と7μLの2MEを混合します。また、全量調製する場合は、溶解・吸着液のボトル（77mL）に770μLの2MEを加え調製します。この混合液（溶解・吸着液（2ME含））は4℃に保存してく ださい（3ヶ月間保存可能）。
- マニュアル法にて抽出される場合、洗浄液Ⅰ，洗浄液Ⅱは室温に戻してから使用してください。

3. サンプル前処理方法

サンプル中のRNAは不安定ですので、サンプルをあらかじめ溶解・吸着液（2ME含）にて溶解しておきます[*2]。また、酵母などは溶解する前に細胞壁を酵素的に消化する処理工程が必要となります。以下に代表的なサンプルの前処理方法を示します。

(1) 培養細胞

- 培養細胞を遠心分離などにより1.5mLマイクロチューブに回収し、700μLの溶解・ 吸着液（2ME含）を加え、ピペッティングにより粘性がなくなるまで念入りに攪拌します。（この操作が短いとRNA収量が低下します）
- ボルテックスミキサーにてさらに30秒間程度混和した後に、10～15分間室温にてインキュベートします。

(2) 組織

- 溶解・吸着液（2ME含）をマイクロチューブに750～900μL分注し、氷上に置きます。
- 組織を切り取り、速やかに液体窒素にて凍結します。その後、ハンマーなどで組織を砕き、凍結組織片（10～30mg程度）を上記溶解・吸着液に移します（柔らかいサンプルなどはそのまま用いることができます）。
- マイクロチューブ用のホモジナイザーなどを用い、氷上で組織をホモジナイズします。

[*1] 弊社マグネッチクスタンドMag*ical Trapper*® (Code No.:MGS-101)などがご使用になれます。

[*2] 溶解・吸着液中でRNAは安定です。この状態で保存される場合は-20～4℃に保存してください。

・ ボルテックスミキサーにて粘性がなくなるまで約30～60秒間攪拌します。
・ 3,000～5,000r.p.mで10秒間程度遠心し[*1]、上清620～750μLを新しいマイクロチューブに移します[*2]。この時点で、まだ粘性が高い場合はピペッティングするか、21Gの針をつけた注射筒に出し入れし、粘性がなくなるまで処理します。（粘性が残っている場合、収量が減少する場合があります）
・ 室温で10～15分間インキュベートします。

(3)酵母[*3]

・ 使用直前に、Zymolyase 20T（20,000U/g）をZymolyase bufferにて30mg/mLに調製し、Zymolyase溶液とします（氷上保存）。（試薬組成:2ページ参照）
・ 培養液を遠心分離し、酵母を回収します。
・ 沈殿を50μLのZymolyase溶液に懸濁します。（コロニーの場合は、白金耳にてピックアップし、50μLのZymolyase溶液に懸濁します）
・ ボルテックスミキサーにて懸濁し、37℃，5～20分間インキュベートします。
・ 処理液に直接 700μLの溶解・吸着液（2ME含）を加え、ピペッティングにより念入りに攪拌します。
・ ボルテックスミキサーにてさらに30秒間程度混和した後に、10～15分間室温にてインキュベートします。

4. 抽出フロー

MagExtractor™-*RNA*-を用いた抽出フローを以下に示します。

サンプル
｜← 溶解・吸着液（2ME含）：10～15分間放置　［サンプルの溶解］
前処理溶液
｜← 磁性ビーズ ： 約1分間　［RNA吸着］
｜B/F分離
｜← 洗浄液Ⅰ ： 約10秒　［非特異的吸着物の除去］
｜B/F分離
｜← 洗浄液Ⅱ ： 約5秒（2回）　［タンパク質変性剤の除去］
｜B/F分離
｜← 溶出液（蒸留水） ： 約2分間（65℃）　［RNAの磁性ビーズからの溶離］
｜B/F分離
上清回収(40μL)

[*1]RNAが夾雑物と共沈することがありますので高回転数で遠心は避けてください。

[*2]多少不溶物が残ることもありますが、極端でない場合は問題ありません。また、機械にセットする液量は620μL以上あれば差し支えありません。

[*3]大腸菌の場合も同様にLysozyme処理し、再沈殿させた菌体を用いて抽出を行うことができます。大腸菌の場合、RNA溶液に電気泳動で確認できる程度のゲノムDNAが混入することがありますので11ページのDNaseⅠ処理をお勧めします。

5. MFX-2000/2100を用いたRNA抽出

MFX-2000/2100をご使用になる前には、MFX-2000/2100の取扱い説明書を必ずお読みください。MFX-2000/2100を用いてRNA抽出する場合、加温機能が必要となります。標準仕様（加温，簡易保冷機能/ Code No.：MFX-102）または特別仕様（加温，電子冷却機能/ Code No.：MFX-103）の機種をお使いください。

(1)プロトコールの選択

MFX-2000/2100にはRNA抽出用プロトコールとして以下の2つが用意されています。必要に応じていずれかを選択してください。

①通常プロトコール

・ RNAを40μL[*1]の溶出液にて溶出します。
・ 回収液を直接、DNase I 処理、逆転写反応などに使用可能です。
・ 回収液の吸光度測定が可能です。
・ 抽出に必要な時間は1サンプルあたり約10分です。

②エタノール[*2]沈殿プロトコール

・ 40μLの溶出液を前もって分注した500μLのアルコール沈殿用試薬中に吐出します。
・ RNAをすぐに使用しない場合、RNAを長時間保存する場合などに使用します。
・ 遠心によるRNAの回収が必要です。
・ 抽出に必要な時間は1サンプルあたり約10分です。

プロトコール名	入力番号	液晶の表示内容
通常	21	RNA : Normal
エタノール沈殿	22	RNA : Ethanol

(2)加温ブロック，冷却ブロックの温度設定

加温ブロック，冷却ブロックを以下の温度に設定します。

	加温ブロック	冷却ブロック
設定温度	65℃	10℃

・ 簡易保冷ブロックの場合、ブロックを冷蔵庫もしくは低温室であらかじめ冷やしておきます。簡易保冷ブロックは短時間の回収液の保冷に適しています。
・ ブロック温度の設定方法は、MFX-2000/2100の取扱い説明書をご参照ください。

[*1] 溶出液量は多少増減することがあります。

[*2] 自家調製したアルコール沈殿用の試薬を試薬スタンドにセットします。アルコール沈殿用試薬はあらかじめ回収用チューブに分注され、その中に溶出液40μLを吐出します。

(3) 専用フィルター付きチップのセット

専用フィルター付きチップ（Code No .：MFX-401）を、チップラックにセットします。セット本数は次表を参考にしてください。

・ 必ず専用のフィルター付きチップ（Code No .：MFX-401）をご使用ください。
・ チップを規定本数より多くセットすることは特に問題ありません。
・ チップはガンマ線滅菌されております。手袋を着用してセットしてください。
・ チップはチップラックの左下より縦向きに必要量を並べます。詳しいセット位置 はMFX-2000/2100の取扱い説明書をお読みください。

・ 通常プロトコールの場合；

サンプル数	チップ本数	サンプル数	チップ本数
1	5	13	31
2	7	14	33
3	9	15	35
4	11	16	37
5	13	17	39
6	15	18	41
7	17	19	43
8	19	20	45
9	21	21	47
10	23	22	49
11	25	23	51
12	27	24	53

・ エタノール沈殿プロトコールの場合；

サンプル数	チップ本数	サンプル数	チップ本数
1	6	13	33
2	8	14	35
3	10	15	37
4	12	16	39
5	14	17	41
6	16	18	43
7	18	19	45
8	20	20	47
9	22	21	49
10	24	22	51
11	26	23	53
12	28	24	55

(4) 専用チューブのセット

専用チューブ（Code No.：MFX-301）を抽出ラックのA ～E，加温ブロック， 冷却ブロックにサンプル数分セットします。

・ 抽出ラックのA～E，加温ブロックには専用チューブ以外はセットしないでください。トラブルの原因となることがあります。
・ 抽出ラックのA～Eには専用6連チューブ（Code No.：MFX-302）をセットすることもできます。
・ 冷却ブロックにはスクリューキャップ式の1.5mLチューブをセットすることもできます（RNAの保存により適しています）
・ 詳しいセット方法はMFX-2000/2100の取扱い説明書をお読みください。

(5) 試薬のセット

試薬はそれぞれ指定の大きさのチューブに移し、試薬ラックの所定の位置にセットします。サンプル数に応じて必要な試薬量が異なります。8ページの表に従って試薬をセットしてください。

・ 試薬の分注は、少量の場合はピペッターを用い、多量の場合は試薬チューブの横の目盛りを目安にして行ってください。
・ 磁性ビーズはあらかじめよく攪拌して試薬ラックにセットしてください。
・ エタノール沈殿プロトコール時にセットするアルコール沈殿用試薬の組成は自由に設定することができます。（例1；蒸留水：3M 酢酸ナトリウム(pH5.2)：エタノール=7:1:25、例2；蒸留水：5M 酢酸アンモニウム：イソプロパノール=0.9:1:2)
・ 抽出後残った試薬は、再びお使い頂けますが、長時間放置した場合、乾燥などにより液組成が変化する可能性がありますので、ご注意ください。
・ 規定量を越える量の試薬をセットしないでください。ノズルの汚染や液ダレの原因になります。

セット位置	試薬名	チューブ
1	洗浄液Ⅱ	50mLチューブ
2[*1]	エタノール	
7	磁性ビーズ	2mLマイクロチューブ
9	洗浄液Ⅰ	15mLチューブ
10	溶出液	

[*1] エタノール沈殿プロトコール時のみ、自家調製したエタノール（イソプロパノール）沈殿用試薬をセットします。

【各試薬の分注量】

試薬名	洗浄液Ⅱ	アルコール沈殿用試薬	磁性ビーズ	洗浄液Ⅰ	溶出液
チューブの大きさ	50mL	50mL	2mL	15mL	15mL
セット位置	1	2	7	9	10

各試薬チューブに分注する試薬量（mL）

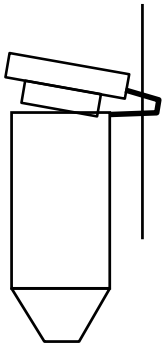
<table>
<tr><td rowspan="24">サンプル数</td><td>1</td><td rowspan="2">5</td><td rowspan="8">5</td><td rowspan="7">0.5</td><td rowspan="2">1.5</td><td rowspan="4">0.5</td></tr>
<tr><td>2</td></tr>
<tr><td>3</td><td rowspan="3">7.5</td><td>2</td></tr>
<tr><td>4</td><td>3</td></tr>
<tr><td>5</td><td rowspan="2">4</td><td rowspan="4">1</td></tr>
<tr><td>6</td><td rowspan="4">15</td><td rowspan="6">0.8</td></tr>
<tr><td>7</td><td rowspan="2">5</td></tr>
<tr><td>8</td></tr>
<tr><td>9</td><td rowspan="3">20</td><td rowspan="8">10</td><td>6</td><td rowspan="8">1.5</td></tr>
<tr><td>10</td><td rowspan="3">7</td></tr>
<tr><td>11</td><td rowspan="5">1.1</td></tr>
<tr><td>12</td><td rowspan="3">25</td><td rowspan="2">8</td></tr>
<tr><td>13</td></tr>
<tr><td>14</td><td rowspan="2">9</td></tr>
<tr><td>15</td><td rowspan="2">30</td></tr>
<tr><td>16</td><td rowspan="5">1.4</td><td>10</td></tr>
<tr><td>17</td><td rowspan="4">35</td><td rowspan="8">15</td><td rowspan="2">11</td><td rowspan="8">2</td></tr>
<tr><td>18</td></tr>
<tr><td>19</td><td rowspan="2">12</td></tr>
<tr><td>20</td></tr>
<tr><td>21</td><td rowspan="3">40</td><td rowspan="5">1.7</td><td rowspan="2">13</td></tr>
<tr><td>22</td></tr>
<tr><td>23</td><td rowspan="2">14</td></tr>
<tr><td>24</td><td>42</td></tr>
</table>

(6) サンプルの前処理及びセット

サンプルは、3～4ページのサンプル前処理方法に従って処理します。処理サンプルを抽出ラックのサンプルセット位置にセットしてください。サンプルのセット位置には1～24までの番号が抽出ラックの各ホールの手前にナンバリングされています。

・ サンプルの調製はスクリューキャップ式の1.5mLサンプルチューブをおすすめします。キャップを外した状態で、セット位置にセットしてください。

・ 通常の1.5mLチューブを使われる場合は、キャップの部分をはさみ等で切断し、セットしてください。切断の際はくれぐれも安全にご注意ください。



・ 前処理液量は620～750μLでセットしてください。培養細胞、酵母などの前処理液は700～750μL、組織破砕液は沈殿物によるロスがありますので620μL以上を目安にセットします。（600μL以下の液量では攪拌時に泡立ち、収量が低下することがあります）

(7) 抽出開始，サンプルの回収

以下の要領で，機械をスタートさせます。

・ サンプル、試薬チューブ（試薬量）、チューブ類、専用チップが説明書通りにセットされていることを確認します。

・ 各ラックのセット位置を確認して（ロックして）、ステージが完全に奥まで収納されていることを確認し、前面扉を閉めてください。

・ 液晶画面にプロトコール番号、サンプル数を入力します。

・ “スタートキーヲオシテクダサイ”と画面に表示されていることを確認して“START”キーを押してください。

・ 抽出操作が始まると液晶画面に“ドウサチュウ”と表示されます。

・ すべての抽出操作が終わると再び“スタートキーヲオシテクダサイ”と表示されます。前面の扉を開けサンプルを取り出します。

6. マニュアル法によるRNA抽出

・ 3～4ページのサンプル前処理方法に従って調製したサンプル前処理溶液700μLを用意します。

前処理済みサンプル（700μL）

｜← 50μL磁性ビーズ溶液（転倒攪拌して均一に混和した後に加える）
｜20sec攪拌[*1]（ボルテックス攪拌強度：最大）
｜40～60sec　室温放置。
｜B/F分離[*2*3]
｜← 600μL洗浄液Ⅰ
｜10sec攪拌（ボルテックス攪拌強度：最大）
｜B/F分離
｜← 800μL洗浄液Ⅱ
｜5sec攪拌（ボルテックス攪拌強度：最大）
｜B/F分離
｜← 800μL洗浄液Ⅱ
｜5sec攪拌（ボルテックス攪拌強度：最大）
｜B/F分離
｜スピンダウン後，再度上清を除去[*4]
｜← 40μL溶出液
｜5sec攪拌（粒子を懸濁）
｜65℃，2min.放置
｜5sec攪拌
｜スピンダウン

上清

・ 回収液の一部を10～20倍希釈してA260を測定し，RNA濃度[*5]を算出します。

[*1] 攪拌強度を最大にしたボルテックスミキサーで攪拌してください。

[*2] チューブをマグネッチックスタンドにセットし磁性ビーズを磁石に寄せ、さらに何度か転倒混和することにより蓋についた磁性ビーズを完全に磁石に寄せます。続いて、マグネッチックスタンドごと軽く振り、蓋についた溶液を落とします。ピペットにて上清をとり除きます。

[*3] 磁気スタンドがない場合は、簡易卓上遠心機を用い3,000r.p.m.前後で約5sec間遠心します。遠心により粒子がほぐれにくくなることがありますので、攪拌時に粒子が懸濁されていることを確認してください。

[*4] できるだけ丁寧に取り除いてください。

[*5] RNA濃度(ng/μL)=A260×40×希釈率により算出します。

7. DNase Ⅰ処理

RT-PCRに際して、mRNAの構造が未知のためイントロンを挟んだプライマー対が作製困難な場合や、mRNAと同一構造を持つPseudogeneがゲノム上に存在する場合などは、微量に混入したゲノムDNAの影響を考慮に入れる必要があります。特に発現量の少ないmRNAをRT-PCRにて増幅する場合などは RNase freeのDNase Ⅰを用いて混入したDNAを酵素的に分解処理することが不可欠となります。以下にその一例を示します。

(1) 用意するもの

- 10×DNase Ⅰ buffer[*1]
- RNase free DNase Ⅰ（10U/μL）
- DEPC処理水
- TE飽和フェノール
- クロロホルム：イソアミルアルコール(24:1)
- 5M 酢酸アンモニウム溶液（pH未調整）
- グリコーゲン溶液（2mg/mL)（分子生物学用）
- イソプロパノール
- 70%エタノール溶液

(2)プロトコール

①DNase Ⅰ処理

RNA溶液	X（μL）
DEPC処理水	8.5－X
10×DNase Ⅰ buffer	1
Rnase free DNase Ⅰ（10U/μL）	0.5
Total	10（μL）

- 氷上で10～30min.間反応させる[*2]。

②フェノール・クロロホルム処理 / イソプロパノール沈澱

10μL DNase Ⅰ処理液
｜← 100μL DEPC処理水
｜← 100μL TE飽和フェノール
｜ボルテックスミキサーにて良く攪拌懸濁
｜氷上放置，5min.
｜4℃，12,000r.p.m.×5min.遠心分離
｜上清を別のマイクロチューブに移す

[*1] 100mM Tris-HCl, 20mM $MgCl_2$(pH 7.5)

[*2] DNase Ⅰは氷上で十分に機能します。高温で反応させるとRNAの分解の原因になります。

｜← 等量のクロロホルム：イソアミルアルコール（24:1）
｜良く攪拌後，4℃，12,000r.p.m.×5min.遠心分離

100μL 上清

｜← 5μL グリコーゲン溶液（2mg/mL)
｜← 100μL 5M 酢酸アンモニウム溶液
｜← 200μLイソプロパノール
｜ボルテックスミキサーにて攪拌
｜-20℃，30～60min.放置
｜4℃, 12,000r.p.m.×10～15min.遠心分離し、上清除去[*1]
｜← 1mL 70%エタノール
｜← 緩やかに転倒混和
｜← 4℃, 12,000r.p.m.×2min.程度遠心分離し、上清除去
｜スピンダウン、完全にエタノールを除く

沈殿

｜← DEPC処理水，もしくは逆転写反応液
｜逆転写反応[*2]

[*1] グリコーゲンの沈殿が確認できます。ピペットで吸わないように気をつけてください。

[*2] 逆転写反応を行っていないNegative controlも同時に調製し、PCRの増幅がRNA由来であることを確認します。

[5]トラブルシューティング

トラブルが生じた場合以下の対策をご参照ください。

(1)RNAの収量が低い[*1]

原因	対策
溶解・吸着液での溶解処理が不十分	サンプルを溶解・吸着液で溶解する際、液の粘性がなくなるまで完全にピペッティングにより攪拌してください。
溶解・吸着液での放置時間が短い	サンプルを溶解・吸着液に懸濁した後、15分間以上室温でインキュベートしてください。
サンプル過剰	サンプルを過剰に処理した場合、粒子が凝集し、収量が下がる場合があります。サンプル量を減らした条件でもう一度検討します。MFX-2000/2100で自動抽出する場合は特に気をつけてください。
遠心過剰	組織サンプルなどの不溶物をのぞく場合に、5,000r.p.m.以上で長時間遠心すると、RNAが夾雑物と共沈する場合があります。
セット試薬の不足	MFX-2000/2100で自動抽出する際に、試薬のセット量が少なかった場合、抽出が正常にできない場合があります。RNA量が極端に少ない場合などは抽出チューブに試薬が残っていることを確認してください。

(2)A260/280が低い

原因	対策
サンプル過剰	サンプル量を減らして検討します。
RNA濃度	吸光度測定時のRNA濃度が低い場合、A260/280の値が低くなることがあります。
RNA希釈液	バッファーで希釈した場合に比べ、蒸留水でRNAを希釈して測定するとA260/280が低くなることがあります。

[*1]RNA収量は細胞、組織の種類により大きく左右されます。

(3)RT-PCRがうまくいかない

原因	対策
ゲノムDNAの混入	サンプルによってはゲノムDNAの混入[*1]が認められることがあります。11ページの DNase I処理のプロトコールに従って処理します。また、RT-PCRを行うときは、逆転写を行っていないサンプルについてもPCRを行いゲノムDNA由来のバンドがないか確認することをおすすめします。
RNAの分解	(4)参照
[*1]大腸菌などの場合、電気泳動で確認できる程度のゲノムDNAのコンタミが認められることがあります。	

(4)RNAが分解される

原因	対策
RNAの加温処理	RNAを反応バッファー中で長時間加温すると分解を受けることがあります。長時間加温する場合はRNaseインヒビターを加えたバッファーを用います。また、加温はできるだけ70℃までとします。
DNaseⅠ処理条件	DNaseⅠ処理条件によって、RNAが分解を受ける場合があります。本プロトコール11ページのDNaseⅠ処理条件をおすすめします。DNaseⅠを加熱により失活させるプロ トコールもありますが、DNaseⅠバッファー中で80℃以上に加熱処理することによりRNAの分解が促進されることがあります。
サンプル過剰	過剰のサンプルを用いて抽出したRNA溶液にはRNaseが残存することがあります。サンプル量を減らした条件で再度検討してください。

(5)磁性ビーズが凝集し，ほぐれない

原因	対策
サンプル過剰	サンプルを過剰に処理した場合、粒子が凝集し、収量が下がる場合があります。サンプル量を減らした条件で再度検討してください。
溶解・吸着液での溶解処理が不十分	サンプルを溶解・吸着液で溶解する際、液の粘性がなくなるまで完全にピペッティングにより攪拌してください。
溶解・吸着液での放置時間が短い	サンプルを溶解・吸着液に懸濁した後、15分間以上室温でインキュベートしてください。

(6)回収RNA溶液が着色する

原因	対策
ヘモグロビンやクロロフィルなどの残存	ヘモグロビンやクロロフィルを多量に含むサンプルを用いた場合、回収液が若干着色することがあります。サンプル量を減らして検討してください。また、動物臓器を採取する場合は、血液成分の混入をなるべく避けるようにします。 （DNase Ⅰ 処理（0℃））→フェノール，クロロホルム処理→イソプロパノール沈殿により色素の除去は可能です。
磁性ビーズの混入	磁性ビーズが回収液に混入すると回収液が茶色く見えることがあります。磁性ビーズが、酵素反応等を阻害することはありませんが、軽く遠心して除いてください。

[6]参考文献

1) Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76:** 615-619.

2) Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E., and van der Noordaa, J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28:** 495-503.

[7]　関 連 商 品

品　名	内　容	Code No.
Mag*ical Trapper*®<磁性ビーズ分離用スタンド>	1台	MGS-101

TOYOBO

【製造・販売元】

ー価格・在庫に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社　バイオプロダクト営業部（大阪）
〒530-0001　大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　バイオプロダクト営業部（東京）
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目 17 番 10 号　住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819　FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00（土日祝日、休日を除く）
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］ https://lifescience.toyobo.co.jp/