

【MagExtractor -RNA-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の値が低くなる場合があります。
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が低くなる場合があります。

^{*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を用います。また、加温はできるだけ70°Cまでとします。
DNase I 処理条件	DNase I 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DNase I 処理条件をおすすめします。DNase I を加熱により失活させるプロトコールもありますが、DNase I バッファ中で80°C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°C))→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。