

動物、植物などの組織や培養細胞より total RNA を分離するための

TRizol[®] Reagent

製品名	カタログ No.	サイズ	価格(円)
TRizol [®] Reagent	15596-026	100 mL	21,600
	15596-018	200 mL	38,000

用途: ・細胞 (>10⁷ cells) や組織 (>1 g) から total RNA を単離する試薬
 ・ノーザンプロット、ドットハイブリダイゼーション、poly(A) セレクション、*in vitro* translation

特徴: ・フェノールとグアニジンイソチオシアネートを含んだ赤色の試薬
 ・水層と有機層に分離後、水層に含まれる RNA をイソプロパノールを加え、沈殿させて回収
 ・得られた total RNA には、DNA、タンパク質のコンタミはない。
 ・PCR の際には、単離された RNA を amplification grade DNase I (Cat. No.18068-015) で処理することをすすめる。

保存: 4 、6 ヶ月保証 文献: Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156.

[RNA の分離操作]

1. ホモジネーション	: 1 mL の TRizol [®] 試薬 (50-100 mg の組織または 5-10x10 ⁶ 細胞)
2. 層分離	: 0.2 mL のクロロホルムを添加、2-3 分間静置 (室温) 遠心分離 (12,000 x g, 15 分間、4)
3. 上層の水層	: 0.5 mL のイソプロパノールを添加、5-10 分間静置 (室温) 遠心分離 (12,000 x g, 10 分間、4)
4. RNA 沈殿	
5. RNA 洗浄	: 1 mL の 75% エタノール

[RNA の収量]

試料	収量
(1 mg の組織、1x10 ⁶ 細胞)	(μg)
組織	
Liver and Spleen	6-10
Kidney	3-4
Skeletal muscles and brain	1-1.5
Placenta	1-4
培養細胞	
Epithelial cells	8-15
Fibroblasts	5-7

使用方法

注意

毒性: 実験中は手袋および保護メガネを使用すること。皮膚や衣服につかないようにすること。蒸気を吸わないようにすること。

【RNA の分離】

TRizol[®] 試薬以外に必要な試薬

- ・クロロホルム
- ・イソプロパノール
- ・75%エタノール
- ・RNase Free 蒸留水もしくは 0.5%SDS 溶液

(RNase Free 蒸留水の調製は、RNase Free のガラスボトルに水を入れ、DEPC (diethylpyrocarbonate) を最終濃度 0.01% (v/v) になるように加える。一晩静置後、オートクレーブをかける。SDS 溶液は、DEPC 処理、オートクレーブした水を使用すること。)

- ・RNase Free 滅菌チューブ、RNase Free 滅菌チップ

操作

1. ホモジナイズ

A. 組織

1 mL の TRizol[®] 試薬に対し、50-100 mg の組織をガラス-テフロンホモジナイザーか、ポリトロン等でホモジナイズする。

B. 培養細胞 (付着)

35 mm dish 中の細胞に直接 1 mL の TRizol[®] 試薬を入れ、数回ピペティングし、細胞を溶解する。加える TRizol[®] 試薬の量は細胞数ではなく、培養容器の面積に応じて調整する。(10 cm² に対し、1 mL の TRizol[®] 試薬) 不十分な量の TRizol[®] 試薬では、分離した RNA に DNA が混入する可能性がある。

C. 培養細胞 (浮遊)

遠心分離をし、細胞を集める。TRizol[®] 試薬を加え、繰り返しピペティングし、細胞を溶解する。1 mL の TRizol[®] 試薬に対し、動物、植物、酵母細胞では、5-10x10⁶ 細胞、バクテリアでは、1x10⁷ 細胞を溶解する。TRizol[®] 試薬を加える前に細胞を洗浄すると mRNA の分解を促進する可能性があるため避けること。酵母やバクテリアでは、細胞を破碎するためにホモジナイザーを使用することもある。

2. 層の分離

ホモジナイズしたサンプルを室温で 5 分間静置する。

↓

1 mL の TRIzol[®] 試薬に対し、0.2 mL のクロロホルムを加える。

↓

チューブのフタをしっかりと閉め、手で力強く振って攪拌し、室温で 2-3 分間静置する。

↓

遠心分離、12,000 x g、15 分間、4°C

↓

上層: 無色の水層 (ホモジナイズに使用した TRIzol[®] 試薬の約 60% 量) RNA を分離

下層: 赤色のフェノール・クロロホルム層

3. RNA の沈殿

水層を別のチューブに移す。

↓

添加した TRIzol[®] 試薬 1 mL に対し 0.5 mL のイソプロパノールを加える。

↓

室温で 10 分間静置する。

↓

遠心分離、12,000 x g、10 分間、4°C

↓

上静を除去

↓

1mL 75 % エタノール を加える

↓

遠心分離、7,500 x g、5 分間、4°C

↓

RNA 沈殿物を乾燥する。風乾またはバキュームドライで 5-10 分間。

(真空での遠心分離などで RNA を完全に乾燥させると RNA の溶解性が非常に悪くなる。)

↓

RNase Free 蒸留水、または 0.5% SDS 溶液を加え、2-3 回ピペッティングし、55-60°C で 10 分間インキュベーションして RNA を溶解する。