

TRI REAGENT[®]

メーカー：Molecular Research Center, Inc. (メーカー略号：MOR)

品番：TR118

2015年4月2日作成

www.cosmobio.co.jp

【I】商品概要

ヒト、動物、植物、酵母、細菌、ウイルス由来の細胞や組織から、total RNAを抽出するための試薬です。また、同一試料からDNA、タンパク質も抽出可能です。

液体サンプル(羊水、血清、全血)には、TRI REAGENT[®] LS (MOR社品番TS 120)またはTRI REAGENT[®] BD (MOR社品番TB 126)をご使用ください。

RNA収量：

A) 組織(1mgあたりのRNA収量)

肝臓、脾臓：6～10 μ g、腎臓：3～4 μ g、骨格筋、脳：1～1.5 μ g、胎盤：1～4 μ g

B) 培養細胞(細胞10⁶個あたりのRNA収量)

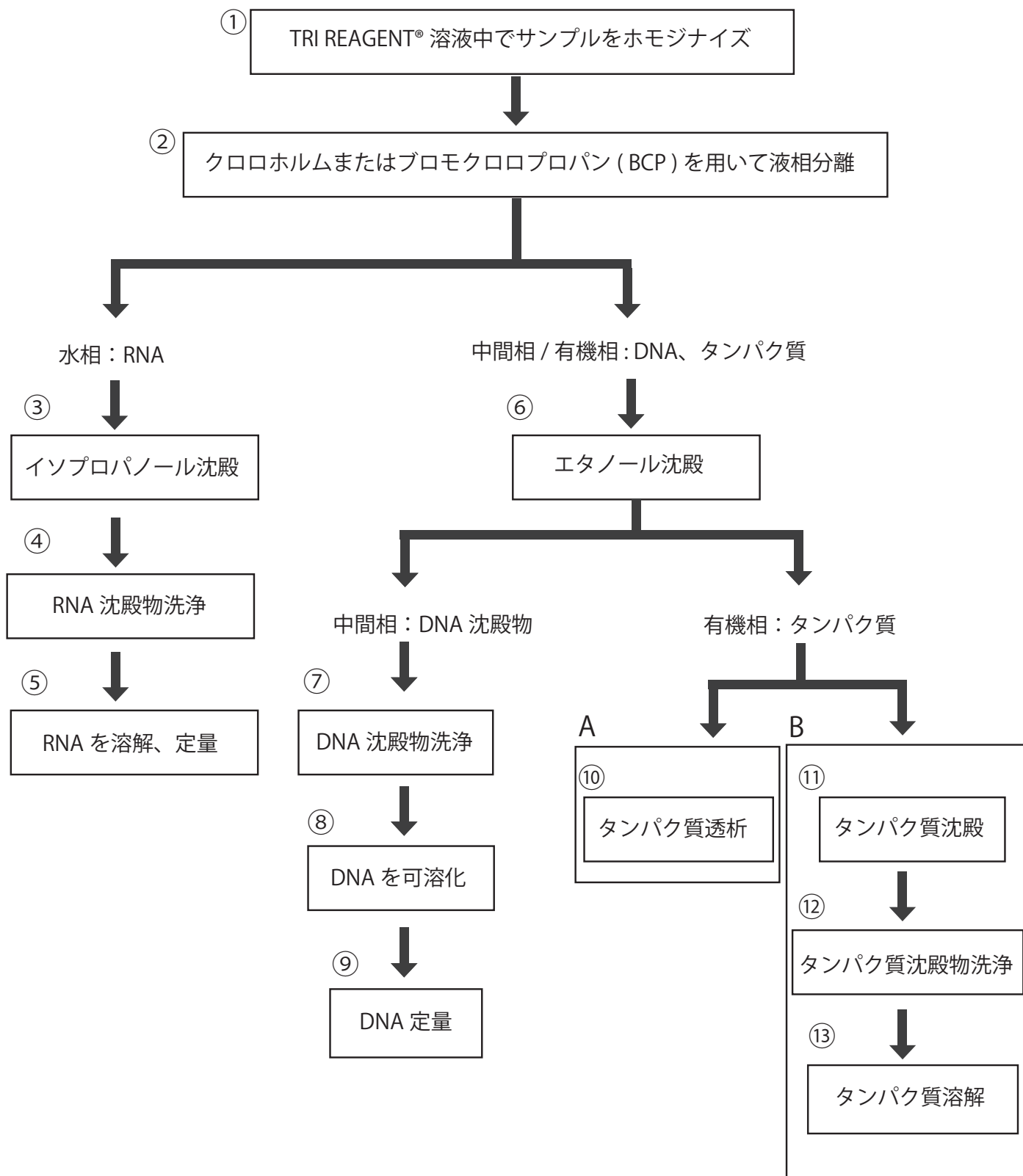
上皮細胞：8～15 μ g、線維芽細胞：5～7 μ g

【II】キット構成

保存温度：4～25 $^{\circ}$ C

内 容	危険表記および取扱上の注意
TRI REAGENT [®]	フェノール50%含有 医薬用外劇物・安衛表示・化管一種

【Ⅲ】 プロトコール概略



本手順は、特記された場合を除いて室温で実施します。

タンパク質の抽出については A (ステップ⑩) または B (ステップ⑪～⑬) の方法で行います。

クイックプロトコール **total RNA 抽出** (5 ページ〜) ※1

本手順は、特記された場合を除いて室温で実施します。

サンプル (組織: 50~100mg、哺乳類細胞・酵母: 5~10 x 10⁶ 個、細菌: 1 x 10⁷ 個) ※2, 3, 4

← 1mL TRI REAGENT®、溶解、ホモジナイズ、5 分間静置
 0.1mL BCP もしくは 0.2mL クロロフォルム、15 秒間ボルテックス、2~15 分間静置
 ↓
 遠心: 4°C、12,000 g、15 分間

上清 (水相) を回収。DNA、タンパク質抽出を行う場合は中間相、有機相を保存※6
 ⇒「DNA 抽出」(8 ページ〜)、「タンパク質抽出」(12 ページ〜) に使用

← 0.5mL イソプロパノール、転倒混合、5~10 分間静置
 ↓
 遠心: 4~25°C、12,000 g、8 分間

沈殿 に気をつけながら上清を取り除く、1mL 75% エタノール※5、ボルテックス
 ↓
 遠心: 4~25°C、7,500 g、5 分間

沈殿 を 3~5 分間風乾
 ↓
 ← RNase free water

total RNA 溶液

クイックプロトコール **DNA 抽出** (8 ページ〜) ※1

本手順は、特記された場合を除いて室温で実施します。

中間相、有機相

← RNA を含む水相 (中間相上部) を完全に取り除く
 0.3mL 100% エタノール、転倒混合、2~3 分間静置
 ↓
 遠心: 4°C、2,000 g、5 分間

沈殿 に気をつけながら、上清 (有機相) を取り除く

← タンパク質抽出を行う場合は有機相を保存 ⇒「タンパク質抽出」(12 ページ〜) に使用
 1mL 0.1M クエン酸三ナトリウム含有 10% エタノール溶液、30 分間転倒混合
 ↓
 遠心: 4~25°C、2,000 g、5 分間

沈殿

← 1.5~2mL 75% エタノール※7、5 分間転倒混合
 ↓
 遠心: 4~25°C、2,000 g、5 分間

沈殿 を 3~5 分間風乾

← 0.3~0.6mL 8mM 水酸化ナトリウム溶液※8
 ↓
 遠心: 4~25°C、12,000 g、10 分間

上清 を回収し、DNA の定量を行う

もう一回行う

※1: 5 ページ参照

※2: 6 ページ参照

※3: 6 ページ参照

※4: 6 ページ参照

※5: 7 ページ参照

※6: 9 ページ参照

※7: 9 ページ参照

※8: 10 ページ参照

クイックプロトコール タンパク質抽出 (12 ページ~) ※1

本手順は、特記された場合を除いて室温で実施します。

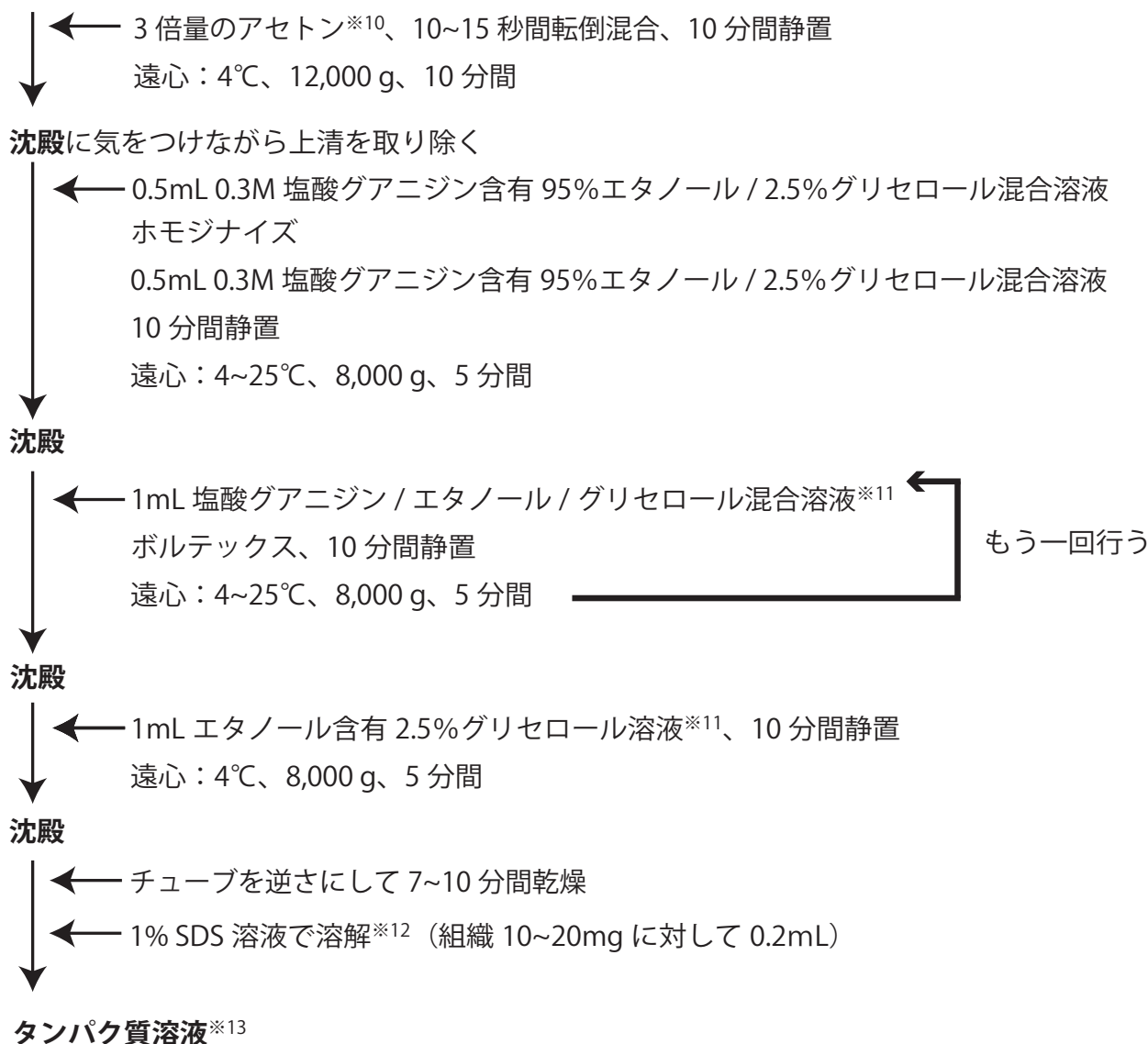
手順 A. 1% SDS 溶液を用いた透析

有機相を透析チューブに入れ、4°C、0.1% SDS で 3 回透析を行う。

透析バッファーは毎回新しいものを使用する。透析したタンパク質はウエスタンブロット解析に使用できる。

手順 B.

有機相から 0.2mL~0.5mL を分取する※9



※ 1: 5 ページ参照
 ※ 9: 13 ページ参照
 ※10: 13 ページ参照
 ※11: 14 ページ参照
 ※12: 14 ページ参照
 ※13: 14 ページ参照

【IV】 total RNA 抽出でご準備いただく試薬・チューブ

1. クロロフォルムまたはブロモクロロプロパン (BCP [MOR 社 品番 BP151])
2. イソプロパノール
3. 75%エタノール
4. FORMAzol®、RNase free water または 0.5% SDS (8 ページ参照)
5. ポリプロピレンチューブ※1

※1: MOR 社 品番 PP 141-144 のご利用をお勧めします。他社のチューブをお使いの際は、TRI REAGENT® を用いた 12,000 g での遠心に問題がないことを事前にご確認ください。

【V】 total RNA 抽出プロトコール※4

①ホモジナイズ ※2, ※3

1 × 10⁶ 個未満の細胞または 10 mg 未満の組織を用いて RNA 抽出を行う場合は 6 ページの※2 を、細胞外物質を多く含むサンプルを用いる場合は※3 をご確認ください。

本手順で使用する試薬・機器:

1. TRI REAGENT®
2. 高速ホモジナイザーまたはガラステフロンホモジナイザー (組織サンプルを使用する場合、または浮遊細胞において必要に応じて使用します。但し高速ホモジナイザーを用いると抽出されてくる DNA が切断されている場合があります。)

A. 組織サンプル

組織サンプル 50 ~ 100 mg あたり 1 mL の TRI REAGENT® を加え、高速ホモジナイザーまたはガラステフロンホモジナイザーを利用し、ホモジナイズします。

サンプル容量はホモジナイズに使用した TRI REAGENT® 容量の 10% を超えないようにご注意ください。

B. 接着細胞

接着細胞を培養ディッシュ内で直接溶解させます。培養培地を除去し、TRI REAGENT® を加えて複数回ピペティングし細胞を溶解します。培養ディッシュの面積 10cm² あたり 1mL の TRI REAGENT® を使用します。

C. 浮遊細胞

浮遊細胞をまず沈降させた後、TRI REAGENT® を加え複数回ピペティングして細胞を溶解します。動物細胞、植物細胞および酵母に対しては 5 ~ 10 × 10⁶ 個ごとに、細菌に対しては 1 × 10⁷ 個ごとに 1mL の TRI REAGENT® を使用します。

mRNA が分解する可能性があるため、TRI REAGENT® を添加する前に細胞を洗浄しないでください。酵母や細菌によってはホモジナイザーを使用する必要があります。

※2: 6 ページ参照

※3: 6 ページ参照

※4: 6 ページ参照

※ 2: 少量のサンプル(1 × 10⁶ 個未満の細胞または 10 mg 未満の組織)を用いて RNA 抽出を行う場合は、2 ~ 8μL の Polyacryl Carrier (MOR 社 品番 PC 152)を添加した 0.8mL の TRI REAGENT® を用いてホモジナイズまたは可溶化を行います。BCP またはクロロフォルムを加えた後、前述の液相分離および以降のステップを行います。

また、接着細胞の場合、細胞数ではなく培養ディッシュの面積に応じて TRI REAGENT® 量を決定します(培養ディッシュの面積 10cm² あたり 1mL の TRI REAGENT® を使用)。TRI REAGENT® の量が不十分な場合、抽出した RNA に DNA が混入する場合があります。ホモジナイズ後、クロロフォルムを加える前のサンプルは -70℃で最低 1 ヶ月保存できます。

※ 3: タンパク質、脂質、多糖類または細胞外物質(筋肉、脂肪組織、植物の塊茎状部分など)を多く含むサンプルを用いる場合は、追加の抽出ステップが必要になる場合があります。ホモジナイズ後、4℃、12,000 g で 10 分間遠心して不溶性物質を沈殿させます。生じた沈殿物には細胞外膜、多糖類および高分子量 DNA が含まれ、上清には RNA が残ります。脂肪組織由来サンプルの場合、過剰な脂肪が上部に層を形成するので必ず除去します。透明な上清を新しいチューブに移した後、前述した液相分離および以降のステップを行います。高分子量 DNA を沈殿物から抽出する場合は、ステップ⑦とステップ⑧の DNA 抽出プロトコールに準じて行います。

※ 4: 素手で直接作業したり埃が入ったりすると RNase 汚染の原因となります。そのため、作業中は手袋を着用し、必ずチューブを閉じておきます。

②液相分離

本手順で使用する試薬・機器:

1. BCP またはクロロフォルム
2. 遠心機 (4℃)
3. ボルテックス・ミキサー

ホモジネートを室温で 5 分間静置し、核タンパク質複合体を完全に分離させます。

TRI REAGENT® 1mL あたり 0.1mL の BCP または 0.2mL のクロロフォルムを添加し、キャップを閉め、15 秒間激しくボルテックスします。混合溶液を室温で 2 ~ 15 分間静置し、4℃、12,000 g で 15 分間遠心します※ 1。遠心により、透明な水相(上相)、中間相、赤色の有機相(下相)に分離します。RNA は上相に、DNA とタンパク質は中間相と下相に含まれています。水相(上相)の容量はホモジナイズに使用した TRI REAGENT® の 60% 程度です。

BCP の代わりにクロロフォルムを使用しても、抽出される RNA、DNA、およびタンパク質の純度には影響がなく、また抽出した RNA に DNA が混入する事を低減することができます。※ 4

※ 1: 5 ページ参照

液相分離に使用するクロロフォルムにはイソアミルアルコールや他の添加物が含まれないよう
ご注意ください。

液相分離の遠心は冷却(4 ~ 10°C)して行うことが重要です。室温下で遠心すると、DNA が水相
に残る場合があります。抽出された RNA はノーザンブロット解析には使用できますが、PCR へ
の使用はお避けください※4。

③ RNA 沈殿

本手順で使用する試薬・機器：

1. 新しいポリプロピレンチューブ 1 本 (DNA、タンパク質を抽出する際は 2 本用意する) ※1
2. イソプロパノール
3. 遠心機 (4°C ~ 25°C)

上清 (水相) を新しいポリプロピレンチューブに分取します (DNA およびタンパク質抽出を行う
場合は中間相と有機相を新しいチューブに移して 4°C で保存します)。イソプロパノール
(TRI REAGENT® 1mL あたりイソプロパノールを 0.5mL) を加えて転倒混合させます。

サンプルを室温で 5 ~ 10 分間静置後、4 ~ 25°C において 12,000 g で 8 分間遠心します。RNA
沈殿はチューブの壁または底にゲル様または白色のペレットを形成します。

多糖類やプロテオグリカンを多く含むサンプルから RNA を抽出する場合、トラブルシューティ
ングガイド (15 ページ) でご紹介している沈殿法をお試してください。

④ RNA 洗浄※5

本手順で使用する試薬・機器：

1. 75% エタノール
2. ボルテックス・ミキサー
3. 遠心機 (4°C ~ 25°C)

上清を除去し、75% エタノール (使用した TRI REAGENT® と同量) を加え、

ボルテックスして RNA を洗浄します。その後、4 ~ 25°C、7,500 g で 5 分間遠心します。

RNA 沈殿物がチューブの側面にでき、浮遊しがちな場合は、12,000 g で遠心し沈殿させます。

※5：75% エタノールを加えた RNA 沈殿物は 4°C で最低 1 週間、-20°C で最低 1 年間保存でき
ます。

※1：5 ページ参照

※4：6 ページ参照

⑤ RNA 溶解・定量

本手順で使用する試薬・機器:

1. FORMAzol®, RNase free water または 0.5% SDS
2. ヒートブロック (55 ~ 60°C)
3. 吸光度計

RNA 溶解

上清を除去し、沈殿物を 3 ~ 5 分間、風乾します。RNA 沈殿物を完全に乾燥させると再溶解が困難になるため注意します。また、遠心濃縮機による RNA 沈殿物の乾燥はお避けください。FORMAzol® (MOR 社 品番 FO 121) に RNA を再溶解させる場合、RNA 沈殿物を乾燥させる必要はありません。RNA に FORMAzol®, RNase free water または 0.5% SDS を加えて数回ピペティングし、55 ~ 60°C で 10 ~ 15 分間静置します。RNA 溶解に使用する RNase free water または SDS 溶液は、ジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理を行って RNase 除去します。FORMAzol® を使用した場合、RT-PCR を行う前にエタノールによる RNA 沈殿を行います。

RNA 定量

調製された total RNA は DNA やタンパク質を含まず、OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比が 1.6 ~ 1.9 です。RT-PCR を行う際には、最適な結果を得るために DNase 処理が必要な場合があります。分光光度計で最適な測定を行うためには、RNA 溶液を RNase free water またはリン酸バッファー (MOR 社 品番 SP 130) といった pH > 7.5 のバッファーで希釈する必要があります。pH < 7.0 の蒸留水を使用すると OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比が低くなり、RNA サンプル中のタンパク質混入検出の障害になります。

【VI】 DNA 抽出について

total RNA 抽出プロトコールで説明した最初のホモジネートから分離した中間相や有機相より DNA を抽出します。

DNA の収量:

A) 組織 (1mg あたりの DNA 収量)

肝臓、腎臓: 3 ~ 4µg、骨格筋、脳、胎盤: 2 ~ 3µg

B) 細胞 (細胞 1 × 10⁶ 個あたりの DNA 収量)

ヒト、ラット、マウス培養細胞: 5 ~ 7µg

【VII】 DNA 抽出でご準備いただく試薬

1. 75%、100%エタノール
2. 0.1M クエン酸三ナトリウム含有 10% エタノール溶液 (pH 調整の必要なし)
3. 8mM 水酸化ナトリウム
4. RNase free water またはバッファー (pH >7.5[11 ページ参照])
5. ポリプロピレンチューブ※1

【VIII】 DNA 抽出プロトコール

⑥ DNA 沈殿 ※6

本手順で使用する試薬・機器：

1. 100% エタノール
2. 遠心機 (4℃)

中間相の上部に残った RNA を含む水相を完全に取り除きます。最初のホモジネートに 100% エタノール(使用した TRI REAGENT®1mL あたり 0.3mL)を加え、転倒混合させます。サンプルを室温で 2～3 分間静置後、4℃、2,000 g で 5 分間遠心します。純度の高い DNA を単離するには、残余した水相を慎重に除去することが非常に重要です。

※ 6 : 中間相と有機相は 4℃で一晩保存可能です。

⑦ DNA 洗浄 ※7

本手順で使用する試薬・機器：

1. 新しいポリプロピレンチューブ (タンパク質抽出をする場合) ※1
2. 0.1M クエン酸三ナトリウム含有 10% エタノール溶液 (pH 調整の必要なし)
3. 75% エタノール
4. 遠心機 (4～25℃)

タンパク質抽出を行う場合は上清を新しいポリプロピレンチューブに移し替えて 4℃で保存します。

DNA 沈殿を 0.1M クエン酸三ナトリウム含有 10% エタノール(pH 調整の必要なし、使用した TRI REAGENT® と同量)を加え、室温で 30 分間転倒混合し、4～25℃、2,000 g で 5 分間遠心します。2 回洗浄を行った後、DNA 沈殿物に 75% エタノール (使用した TRI REAGENT® 1mL あたり 1.5～2mL) を加え、室温で 10～20 分間転倒混合し、4～25℃、2,000 g で 5 分間遠心します。エタノール洗浄にて DNA 沈殿物中のピンクがかった色を除去します。

200µg 以上の DNA や大量の非 DNA 物質を含む大きなペレットの場合、0.1M クエン酸三ナトリウム含有 10% エタノールでもう一回洗浄します。

※ 7 : 75% エタノールを加えた DNA 沈殿物は 4℃で長期間 (数ヶ月) 保存できます。

注意

DNA 含量が少ないサンプルから DNA を抽出する場合には、RNA 抽出のステップ①ホモジナイズ、ステップ②液相分離はプロトコール通りに行い、DNA 抽出のステップ⑥ DNA 沈殿で中間相の上に残った水相を完全除去後に 2 ~ 8 μ L の Polyacryl Carrier (MOR 社 品番 PC152) を中間相、有機相に加えます。

DNA 抽出手順のステップ⑥に準じて DNA 沈殿を行います。ステップ⑦のクエン酸三ナトリウム溶液洗浄の代わりに、DNA / キャリア沈殿を 75% エタノールと断続的に混合し 10 分間洗浄します。2 回洗浄を行った後、ステップ⑧の DNA 溶解へと進みます。

⑧ DNA 溶解 ※ 8

本手順で使用する試薬・機器：

1. 8mM 水酸化ナトリウム溶液
2. 遠心機
3. 新しいポリプロピレンチューブ 1 本※ 1

エタノール洗浄液を除去後、室温でチューブのキャップを開き 3 ~ 5 分間風乾します。8mM 水酸化ナトリウム溶液を加えて、ゆっくりとピペティングし DNA 沈殿を溶解します。DNA 濃度が 0.2 ~ 0.3 μ g/ μ L になるよう、適量の 8mM 水酸化ナトリウム溶液を加えます。

通常、50 ~ 70 mg の組織または 1×10^7 個の細胞より抽出した DNA には 0.3 ~ 0.6mL の 8mM 水酸化ナトリウム溶液が必要です。軽度のアルカリ溶液を使用することで DNA 沈殿物を完全に溶解することができます。調製した DNA には膜断片などの不溶性物質が含まれます。

この物質を除去するため、12,000 g で 10 分間遠心し、DNA を含む上清を新しいチューブに分取します。高分子量の DNA を含む場合は、上清の粘度が高くなります。

※ 8 : 8mM 水酸化ナトリウム溶液に再溶解したサンプルは 4°C で一晩保存可能です。長期保存する場合は、1mM EDTA を加えて pH 7 ~ 8 に調整します。

⑨ DNA 定量

本手順で使用する試薬・機器：

1. RNase free water またはバッファー (pH>7.5)
2. 吸光度計

DNA を定量する際には RNase free water もしくは バッファー (pH>7.5) で希釈します。

pH < 7.0 の蒸留水を使用すると OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比が低くなり、RNA サンプル中のタンパク質混入検出の障害になります。

一般的に OD₂₆₀ 値の 1 ユニットは 50μg の二本鎖 DNA/mL に相当するので、ヒト、マウス、ラットの 10⁶ 個の二倍体細胞から調製した DNA の収量はそれぞれ 7.1μg、6.5μg、5.8μg になります。これを参考に DNA を希釈し、吸光度を測定します。

組織から抽出した DNA は通常 60 ~ 100kb DNA (70%) と ~ 20kb DNA (30%) から構成されます。培養細胞より抽出した DNA は通常 60 ~ 100kb DNA (80% 以上) と ~ 20kb DNA (20% 未満) から構成されます。抽出した DNA に RNA やタンパク質が含まれない場合、OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比は > 1.7 になります。

PCR による DNA 増幅

本手順で使用する試薬・機器：

1. 0.1M もしくは 1M の HEPES (free acid)
2. PCR サーマルサイクラー

8mM 水酸化ナトリウム溶液による溶解後、HEPES (free acid) を用いて DNA 溶液の pH を 8.4 に調整します (12 ページ参照)。サンプルより分注した DNA 溶液 (通常 0.1 ~ 1μg DNA) を PCR 反応溶液に加え、通常のプロトコールにより PCR を行います。

制限酵素による DNA 切断

本手順で使用する試薬・機器：

1. 0.1M か 1M の HEPES (free acid) または 1mM EDTA、pH 7 ~ 8
2. 制限酵素

HEPES (free acid) を用いて DNA 溶液の pH を 8.4 に調整します (12 ページ参照)。または 1mM EDTA、pH 7 ~ 8 を用いてサンプルを透析します。使用する制限酵素の至適条件下で DNA サンプルを処理します。

8mM 水酸化ナトリウム溶液に溶解した DNA サンプル pH 調整

1mL の 8mM 水酸化ナトリウム溶液に対し、下記に示す 0.1M または 1M HEPES (free acid) を使用します。

最終 pH	0.1M HEPES (μ L)	最終 pH	1M HEPES (μ L)
8.4	86	7.2	23
8.2	93	7.0	32
8.0	101		
7.8	117		
7.5	159		

【IX】 タンパク質抽出プロトコール

DNA をエタノールで沈殿させた後の有機相からタンパク質を抽出します (ステップ⑥のエタノール沈殿)。ここで調製したサンプルはウエスタンブロットに使用できます。

タンパク質抽出には 2 通りの方法があります。プロトコール A または B からお選びください。

【X】 タンパク質抽出でご準備いただく試薬

プロトコール A

1. 0.1% SDS 試薬

プロトコール B

1. 0.3M 塩酸グアニジン含有 95% エタノール / 2.5% グリセロール混合溶液 (v/v)

2. エタノール / 2.5% グリセロール溶液 (v/v)

3. アセトンまたはイソプロパノール

5. 1% SDS 溶液もしくは 10M 尿素溶液

6. トリブチルフォスフィン

プロトコール A

⑩ タンパク質透析

本手順で使用する試薬・機器：

1. 再生セルロース製透析チューブ

2. 0.1% SDS 溶液

3. 遠心機 (4℃)

回収した有機相 / エタノール上清 (DNA 抽出、ステップ⑥) を透析チューブ (再生セルロース製) に入れ、4℃の 0.1% SDS で 3 回透析を行います。透析バッファーは毎回新しいものを使用してください。透析物を 4℃、10,000 g で 10 分間遠心し、透明な上清をウエスタンブロットに使用します。

プロトコール B

⑪ タンパク質沈殿

本手順で使用する試薬・機器：

1. ポリプロピレンチューブ※ 1
2. アセトンもしくはイソプロパノール
3. 遠心機 (4℃)

有機相の一部 (0.2 ~ 0.5 mL) ※ 9 をポリプロピレンチューブに分取します。3 倍量のアセトンを加えてタンパク質を沈殿させます ※ 10。

10 ~ 15 秒間転倒混合を行い均一な溶液にします。サンプルを室温で 10 分間静置後、4℃、12,000 g で 10 分間遠心して沈殿させます。

※ 9: チューブあたりの有機相の容量を 0.2 ~ 0.5 mL に制限することで、扱いやすい大きさのタンパク質沈殿物が得られ、タンパク質収量が改善されます。例えばラット組織から TRI REAGENT® を用いてタンパク質抽出を行う場合、タンパク質の収量は 1 mg の組織あたり 50 ~ 110 µg です。

※ 10: タンパク質沈殿の際、アセトンの代わりにイソプロパノールを使用することもできますが、タンパク質収量は 5 ~ 10% 程度減少する場合があります。

⑫ タンパク質洗浄 ※ 11

本手順で使用する試薬・機器：

1. 0.3M 塩酸グアニジン含有 95% エタノール / 2.5% グリセロール混合溶液 (v/v)
2. スターラー
3. ピペットチップ、シリンジ針、または小さい円錐体のテフロン乳棒
4. エタノール含有 2.5% グリセロール溶液 (v/v)
5. ボルテックス・ミキサー
6. 遠心機 (4℃と室温)

有機相を除去し、タンパク質沈殿物に 0.5 mL の 0.3M 塩酸グアニジン含有 95% エタノール / 2.5% グリセロール混合溶液 (v/v) を加えます。

ピペットチップ、シリンジ針、またはテフロン製マイクロチューブホモジナイザーを用いて沈殿物を分散させます (800 ~ 1000 rpm で最大 30 秒間)。

沈殿物を分散後、さらに 0.5 mL の塩酸グアニジン / エタノール / グリセロール混合溶液を加え、室温で 10 分間静置します。8,000 g で 5 分間遠心してタンパク質を沈殿させます。

※ 1: 5 ページ参照

※ 11: 14 ページ参照

上清を除去し、1mLの0.3M塩酸グアニジン / 95%エタノール / 2.5%グリセロール溶液 (v/v) を加え、ボルテックスで残ったフェノールをタンパク質沈殿物から取り除きます。室温で10分静置し、8,000 gで5分間遠心します。2回洗浄を行った後に、1mLの95%エタノール / 2.5%グリセロール溶液を加え、室温で10分間静置し、4℃、8,000 gで5分間遠心します。上清を除去し、チューブを逆さにして7~10分間沈殿物を乾燥させます。

※ 11 : 0.3M 塩酸グアニジン / エタノール / グリセロール洗浄溶液またはエタノール / グリセロール洗浄溶液中のタンパク質沈殿物は 4℃で少なくとも 1 ヶ月、-20℃で 1 年保存できます。タンパク質によって長期保存できる期間が異なるため、至適保存条件を確立する必要があります。

⑬タンパク質溶解

本手順で使用する試薬・機器：

1. 1% SDS 溶液、10M 尿素溶液などの溶剤
2. トリブチルフォスフィン
3. 新しいポリプロピレンチューブ 1 本※ 1
4. 遠心機
5. ヒートブロック (100℃)

タンパク質沈殿物を風乾させた後、組織 10 ~ 20mg あたり 0.2mL の 1% SDS 溶液もしくは 10M 尿素溶液などで溶解します *12。15 ~ 20 分間揺らしたりピペティングしたりして沈殿物を緩やかに溶解させます。溶液容量の 2.5% 量のトリブチルフォスフィン(還元剤)を加える事でタンパク質の収量が改善します。

すぐにウエスタンブロット解析に使用する場合、溶液を 100℃で 3 分間加熱し、室温において 10,000 g で 5 分間遠心して不溶性物質を沈殿させます。上清を新しいチューブに分取し、このタンパク質溶液をすぐにウエスタンブロット解析に使用します※ 13。溶解させたタンパク質を -20℃で保管する場合は、使用時に熱処理、遠心を行ってください。

※ 12 : タンパク質の溶解度や安定性は溶剤溶液によって異なる場合があります。最適な結果を得るためには、タンパク質サンプルを少量ずつ異なる溶剤に溶解し、実験目的に応じた最適な溶剤を決定してください。

※ 13 : 溶解したタンパク質が -20℃で保存中に不溶性の凝集物を形成することがあります。ウエスタンブロット解析に使用する前にサンプルを 25℃で 10 ~ 15 分間解凍します。100℃で 3 分間加熱し、溶液をピペティング後、プロトコール通りに遠心して不溶性タンパク質を除去します。

※ 1 : 5 ページ参照

【XI】 トラブルシューティングガイド

手順	内容	原因
RNA 抽出	低収量	試料のホモジナイズまたは溶解が不十分 (ステップ①)
		RNA 沈殿物の溶解が不十分 (ステップ⑤)
	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀ 比が 1.6 未満	ホモジナイズの際の溶液量が不十分 (ステップ①)
		吸光度測定に酸性の水を使用した (ステップ⑤)
		水相に有機層が混入していた (ステップ③)
		RNA 沈殿物の溶解が不十分 (ステップ⑤)
	RNA 分解	動物から組織採取後、直ちに処理または凍結保存していなかった
		試料または抽出した RNA を -70℃ではなく -20℃で保存した
		細胞がトリプシン消化により分散していた
		RNA 溶解に使用した水溶液やチューブが RNase free でなかった
		アガロースゲル電気泳動で使用したホルムアルデヒドが pH3.5 以下であった
	DNA の混入	ホモジナイズの際の溶液量が不十分 (ステップ①)
		試料が有機溶剤、アルカリ性溶液を含んでいた
		液相分離を 10℃以上で行った (ステップ②)
	プロテオグリカンと多糖の混合	<p>ステップ③の代わりに、以下の手順で RNA 沈殿を行うことで、RNA から混入物を除去することができます。</p> <p>水相にイソプロパノール、0.8M クエン酸ナトリウム・1.2M 塩化ナトリウム混合液 (TRI REAGENT® 1mL あたり 0.25mL) を加え、混合します。5～10 分間静置し、4～25℃、12,000 g で 8 分間遠心します。その後、ステップ④のプロトコールに従って、RNA 洗浄を行います。</p> <p>多量の多糖を含んでいる植物素材から、RNA 抽出をする際、RNA 抽出プロトコールの※ 3 に記されている遠心 (6 ページ参照) を組み合わせることをお勧めします。</p>
DNA 抽出	低収量	試料のホモジナイズまたは溶解が不十分 (ステップ①)
		DNA 沈殿物の溶解が不十分 (ステップ⑧)
	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀ 比が 1.7 未満	DNA 調合液からフェノールを十分に取り除いていない (ステップ⑦)
		吸光度測定に酸性の水を使用した (ステップ⑨)
	DNA 分解	動物から組織採取後、直ちに処理または凍結保存していなかった
		高速ホモジナイザーでホモジナイズした (ステップ①)
	RNA の混入	中間相と有機相に多量の水相が残っていた (ステップ⑥)
		DNA 沈殿を 0.1M クエン酸三ナトリウム含有 10% エタノール溶液で十分に洗浄していなかった (ステップ⑦)

手順	内容	原因
タンパク質抽出	低収量	試料のホモジネートまたは溶解が不十分 (ステップ①)
		タンパク質沈殿物の溶解が不十分 (ステップ③)
	タンパク質分解	動物から組織採取後、直ちに処理または凍結保存していなかった
	PAGE の際の バンドのゆがみ	タンパク質沈殿物の洗浄が不十分 (ステップ⑫)

【XII】 その他

Poly A⁺ RNA の単離

ステップ③ (RNA のイソプロパノール沈殿) の際に、RNA 沈殿を Poly A⁺ 結合バッファーに溶解し、oligo-dT カラムを用いて Poly A⁺ RNA を回収します。(Aviv and Leder (*Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, **69**, 1408-1412.) のプロトコール参照)

文献

- Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, **15**, 532-537.
- Mackey K and Chomczynski P (1996) Long-term stability of RNA isolation reagents. *J NIH Res.*, **8**, 72.
- Chomczynski P and Mackey K (1995) Substitution of chloroform with bromochloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Anal Biochem*, **225**, 163-164.
- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A and Struhl K (1990) Appendix 1, in *Current Protocols in Molecular Biology*, vol 2, p. A.1.5, John Wiley and Sons, Inc., New York, NY.
- Chomczynski P and Mackey K (1995) Modification of the TRI Reagent™ procedure for isolation of RNA from polysaccharide - and proteoglycan - rich sources. *Biotechniques*, **19**, 942-945.
- Wilfinger W, Mackey K and Chomczynski P (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, **22**, 474-481.
- Wu, LC (1997) Isolation and Long-Term Storage of Proteins from Tissues and Cells Using TRIzol Reagent. *FOCUS*, 17,98-100.
- Banerjee, S, Smallwood A, Chambers AE and Nicolaides K. (2003) Quantitative Recovery of Immunoreactive Proteins from Clinical Samples Following RNA and DNA Isolation. *BioTechniques*, **35**, 450-456.

TRI Reagent®、FORMAzol® は Molecular Research Center, Inc. の登録商標です。

