# 取扱説明書 シカジーニアス® RNAプレップキット(種子&果実用)
Cica Geneus® RNA Prep Kit (for Seed & Fruit)

## 1. はじめに
本製品は、種・果実・根茎のような多糖類・ポリフェノールやでんぷん質が多い植物組織から簡便にトータル RNA を精製するためのキットです。多糖類が多いサンプル用の【プロトコールⅠ】、でんぷん質を多く含むサンプル用の【プロトコールⅡ】の 2 種類が選択可能です。本製品は、植物組織に最適化したバッファーシステムとシリカベースのメンブレンのスピンカラムを組み合わせることで、様々なアプリケーションに適用可能な精製 RNA を調製することができます。

## 2. 製品形態

| | |
|---|---|
| 製品名 | シカジーニアス® RNA プレップキット(種子&果実用)<br>(Cica Geneus® RNA Prep Kit (for Seed & Fruit) |
| 製品番号 | 08056-96 |
| 容量 | 50 回分 |
| 保管温度 | 室温(15 ℃～25 ℃) |

## 3. 構成試薬 (50 回)

| 個別名称 | 容量 | 用途 |
|---|---|---|
| EzPure Filter<br>(カラム:黄色)<br>(コレクションチューブ付) | 10 個×5 | サンプルろ過 |
| SV Column type F<br>(カラム:緑色)<br>(コレクションチューブ付) | 10 個×5 | 核酸結合 |
| 1.5 mL チューブ | 50 個×1 | RNA 回収 |
| ①Buffer SL | 30 mL×1 | 植物組織溶解 |
| ②Buffer ML | 30 mL×1 | 植物組織溶解 |
| ③Buffer RBW ※1 | 27 mL×1 | RNA 結合促進 |
| ④Buffer RNW ※2 | 6 mL×1 | カラム洗浄 |
| ⑤Nuclease-free water | 15 mL×1 | RNA 溶出 |
| ⑥Buffer DRB | 5 mL×1 | DNase I 処理 |
| ⑦DNase I ※3 | 240 Kunitz unit | ゲノム DNA の分解 |

## 4. 製品仕様

| | |
|---|---|
| 製品タイプ | スピンカラム |
| 最大サンプル量 | 100 mg |
| カラムへの最大ローディング量 | 750 µL |
| 最小溶出液量 | 30 µL |
| カラムの最大 RNA 結合量 | 500 µg |

## 5. 使用上の注意
②Buffer ML に沈殿が生じた場合には 56 ℃でインキュベートし、沈殿をよく溶かしてからご使用下さい。
本製品は、皮膚や眼、気道に対して有害な刺激物を含んでいます。本製品を扱う際は十分に注意し、手袋や保護メガネを着用して下さい。万が一試薬が付着した場合は、速やかに大量の水で洗い、医師の診察を受けて下さい。
②Buffer ML、③Buffer RBW はカオトロピック塩を含んでいます。カオトロピック塩は漂白剤と混ざると反応性の高い化合物を生じる可能性があります。本製品に漂白剤や酸性溶液が混入しないように十分注意して下さい。
RNase のコンタミネーションは RNA の分解を引き起こします。必ず手袋を着用し、RNase free グレードのプラスチック製品、ピペットチップ等を使用し、コンタミネーションに注意し作業を行なって下さい。

## 6. 必要な試薬・機器類
100 %エタノール、2-メルカプトエタノール、マイクロピペット、ピペット用チップ、ウォーターバス、1.5 mL チューブ、乳棒・乳鉢または細胞破砕装置、液体窒素、2 mL チューブ用遠心機、ボルテックスミキサー

## 7. プロトコール
**【重要】 実験を始める前の注意事項**
**※1:③Buffer RBW は、初回使用前に<u>エタノール(分子生物学用)(別売)</u>を<u>33 mL</u> 加え、合計 60 mL としてからご使用下さい。**
**※2:④Buffer RNW は、初回使用前に<u>エタノール(分子生物学用)(別売)</u>を<u>24 mL</u> 加え、合計 30 mL としてからご使用下さい。**
**※3:**⑦DNase I(凍結乾燥品)を使用する際は、120 µL の⑤Nuclease-free water を加え溶解して下さい(ボルテックス等による激しい攪拌は避けて下さい)。溶解した DNase I 溶液は 1 検体につき 2 µL 使用します。必要に応じて小分けをし、-20 ℃で保管して下さい。

【プロトコールⅠ:多糖類が多いサンプル(種子・果実等)】
1) 液体窒素で凍らせた植物組織サンプルを乳棒・乳鉢等を用いて粉末状になるまですり潰します。すり潰したサンプル(最大 100 mgまで)を 1.5 mL チューブ(別売)に入れます。
2) 500 µL の①Buffer SL、500 µL の②Buffer ML、10 µL の 2-メルカプトエタノール(別売)を加えてボルテックスミキサーで 15 秒間激しく攪拌した後、室温で 3 分間インキュベートします。
   *②Buffer ML は、でんぷん質を多く含むサンプルでは凝固する可能性があります。その場合は、下記【プロトコールⅡ】を実施下さい。
3) 2)のライセートを室温で 1 分間 10,000×*g* 以上で遠心します。その後、上清 600 µL を EzPure Filter(カラム:黄色)に移します。
4) EzPure Filter を 1 分間 10,000×*g* 以上で遠心します。ろ液 500 µL を新しい 1.5 mL チューブ(別売)に移します。ろ液に 250 µL の 100 % エタノール(別売)を加え、ピペッティングにより混和します。
   *エタノールを加えた後沈殿物が発生することがありますが、RNA 精製には影響しません。
5) 4)の混合液を SV Column type F(カラム:緑色)に加え、室温で 1 分間 10,000×*g* 以上で遠心します。ろ液を捨て、同じコレクションチューブに SV Column type F をセットします。
6) 500 µL の③Buffer RBW を SV Column type F に加え、室温で 30 秒間 10,000×*g* 以上で遠心します。ろ液を捨て、同じコレクションチューブに SV Column type F をセットします。
7) 2 µL の DNase Ⅰ溶液と 70 µL の⑥Buffer DRB をピペッティングで混合して DNase Ⅰ希釈液を調製します。
   *DNase 希釈液は使用量だけを用事調製して下さい。
8) SV Column type F のメンブレンの中心に 70 µL の DNase Ⅰ希釈液を加え、室温で 10 分間インキュベートします。
9) SV Column type F のメンブレンの中心に 500 µL の③Buffer RBW を加え、室温で 30 秒間 10,000×*g* 以上で遠心します。ろ液を捨て、再び同じコレクションチューブに SV Column type F をセットします。
10) 500 µL の④Buffer RNW を加え、室温で 30 秒間 10,000×*g* 以上で遠心します。ろ液を捨て、同じコレクションチューブに SV Column type F をセットします。
11) 室温で 1 分間 13,000×*g* 以上で遠心します。ろ液が付着しないように注意して SV Column type F を新しい 1.5 mL チューブ(付属)にセットします。
12) SV Column type Fのメンブレンの中心に50 µLの⑤Nuclease-free waterを加え、室温で1分間10,000×*g*以上で遠心し、RNAを溶出します。
   *用途に応じ、30 µL～50 µLの⑤Nuclease-free waterが使用可能です。
   *溶出した RNA は-70 ℃以下にて保存して下さい。

【プロトコールⅡ:でんぷん質を多く含むサンプル(根茎・穀物・一部の種子等)】
1) 液体窒素で凍らせた植物組織サンプルを乳棒・乳鉢等を用いて粉末状になるまですり潰します。すり潰したサンプル(最大 100 mgまで)を 1.5 mL チューブ(別売)に入れます。
2) 500 µL の①Buffer SL、5 µL の 2-メルカプトエタノール(別売)を加えて 15 秒間ボルテックスミキサーで激しく攪拌した後、室温で 3 分間インキュベートします。
3) 2)のライセートを室温で 1 分間 10,000×*g* 以上で遠心します。上清 300 µL を 1.5 mL チューブ(別売)に移します。

取 扱 説 明 書

# シカジーニアス® RNAプレップキット(種子＆果実用)
Cica Geneus® RNA Prep Kit (for Seed & Fruit)

4) 300 μL の②Buffer ML を加え、ボルテックスミキサーで 15 秒間激しく撹拌します。その後、混合液を EzPure Filter(カラム:黄色)に移します。
5) 【プロトコールⅠ】ステップ 4)～12)の手順を行なって下さい。

【DNA 量の多いサンプル用プロトコール】
DNA 量の多いサンプルでは、以下の手順に従い、オンカラムでの DNase I 処理を行なわずに、RNA 精製後のサンプルに対して DNase I 処理を行なうことで、より効率的に DNA の除去が可能です。

7)～9)の操作を省略し、12)まで、**7. プロトコール**と共通の操作を行なって下さい。

13) 50 μL RNA 溶液が入った 1.5 mL チューブに、5 μL の⑥Buffer DRB、1 μL の DNase I 溶液(⑥Buffer DRB で希釈していないもの)を加え、ピペッティングで混合します。
14) 室温で 10 分間静置します。
15) 1 μL の 0.25 M EDTA(別売)を加えます。
16) DNase I を失活させるため、75 ℃で 10 分間インキュベートします。

**◇本取扱説明書の補足資料として、本製品の操作方法を簡潔にまとめたプロトコールシートを当社 HP にて公開しております。こちらの資料もご活用下さい。**

https://products.kanto.co.jp/uploads/pj46_m_pdf/764/pdf1.pdf

## 8. トラブルシューティング

| 現象 | 考えられる原因 | 対策 |
|---|---|---|
| RNA の回収量が少ない | 溶解バッファーが不適合 | サンプルの種類に応じて、【プロトコールⅠ】、【プロトコールⅡ】を選択下さい。 |
| | サンプルの破砕が不十分 | プロトコール 1)に従い、十分に破砕を行なって下さい。 |
| | サンプル量が多すぎる | サンプル量を減らして下さい。 |
| | サンプル中の RNA 量が少ない | サンプル量を増やして下さい。 |
| RNA が分解している | 2-メルカプトエタノール量が適切ではない | 2-メルカプトエタノールは、溶解したサンプル量の 1 %を加えて下さい。 |
| | サンプル中の RNA が分解している | サンプル採取後、速やかに RNA を精製して下さい。 |
| | RNase のコンタミ | RNase フリーの試薬、実験器具を使用して下さい。 |
| | RNA 溶液の保存が不適切 | 精製した RNA 溶液は-70 ℃以下で保存して下さい。 |
| EzPure Filter が目詰まりする | サンプルが固形化している | 【プロトコールⅠ】で処理したサンプルが目詰まりを起こした場合、サンプルにでんぷん質・多糖類が多すぎる可能性があります。【プロトコールⅡ】を選択下さい。 |
| | サンプルが高粘度化している | 高粘度のサンプルは下流の反応で RNA を分解します。プロトコール 1)の遠心時間、*g*を増やして下さい。 |
| SV Column type F が目詰まりする | サンプルの粘度が高い | プロトコール 5)の遠心時間、*g*を増やして下さい(例:3 分間 10,000×*g* 以上)。サンプルによっては、エタノールと混合した上清は不透明または粘性になりますが、RNA の精製には影響しません。 |
| RNA 溶液に DNA が混入している | サンプル中の DNA 量が多い | 【DNA 量の多いサンプル用プロトコール】を行なって下さい。 |
| | DNase I 処理が正しく行なわれていない | 十分な酵素反応を起こすため、DNase I 溶液はカラムのメンブレン中央部に加えて下さい。 |

## 9. その他
1) 本製品は試験研究用です。医療や臨床診断の目的には使用しないで下さい。
2) 試薬及び器具等を廃棄する場合には、関係法令に従って処理して下さい。



関東化学株式会社 試薬事業本部 〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 (03)6214-1090 https://www.kanto.co.jp