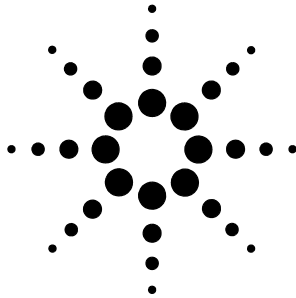


Agilent Plant RNA Isolation Mini キット



使用方法

部品番号 5188-1167

Second Edition
March 2005

キットおよびすべての試薬は室温で
保存してください。



Agilent Technologies

注意

© Agilent Technologies, Inc. 2005

米国著作権法および国際著作権法に定められているとおり、Agilent Technologies Inc. の事前の合意および書面による許諾なしに、このマニュアルの全部または一部をいかなる形態（電子データや検索用データ、または他国語への翻訳など）あるいはいかなる手段をもって複製することはできません。

カタログ番号

5188-1167

エディション

Second edition, March 2005

Printed in USA

Agilent Technologies, Inc.

2850 Centerville Road,

Wilmington, DE 19808-1610 USA

テクニカルサポート

テクニカルサポートは、国内の Agilent Support Service センターでお受けいたします。以下の URL より、電話番号が記載された Agilent のホームページを参照ください。

www.agilent.com/chem/dnasupport

または、以下のメールアドレスまでお問い合わせください。

yan_ccr@agilent.com

お客様へのお願い

この製品は研究用です。Agilent Technologies, Inc. の書面による承認なく、再販すること、再販を目的として変更すること、または商品として製造するために Agilent 製品を使用することはできません。

保証

このマニュアルに記載されている内容は、「現時点」の状況を前提としており、以後の改訂版では事前の通知なしに変更されることがあります。また、適用法が許容する最大限の範囲において、Agilent はこのマニュアルおよびこのマニュアルに記載されているすべての情報に関し、商品性や特定用途への適合性についての黙示保障など、明示または黙示を問わず、一切の保証はいたしません。

Agilent は、このマニュアルまたはこのマニュアルに記載されている情報の提供、使用または行使に関連して生じた過失、あるいは付随的損害または間接的損害に対し、責任を負わないものとします。このマニュアルに記載されている要素に関して保証条件付きの書面による合意が Agilent とお客様との間に別途にあり、その内容がここに記載されている条件と矛盾する場合、別途に合意された保証条件が優先されるものとします。

安全性データ / 分析証明書

製品安全性データシート (MSDS: Material Safety Data Sheet) または分析証明書については、Agilent の以下の Web サイトで入手できます。

http://www.chem.agilent.com/scripts/cag_msdssearch.asp

または、横河アナリティカルシステムズ株式会社までお問い合わせください。

注意

注意は、取り扱い上、危険があることを示します。正しく実行または遵守しないと、この製品が破損したり、重要なデータを損失したりする可能性のある操作手順や操作法などに注意を促すマークです。**注意**の部分でいったん作業をやめ、記載されている条件を完全に理解し、すべてを満たすまでは、先に進まないでください。

警告

警告は、取り扱い上、危険があることを示します。正しく実行または遵守しないと、怪我または死亡につながる可能性のある操作手順や操作などに注意を促すマークです。**警告**の部分でいったん作業をやめ、記載されている条件を完全に理解してすべて満たすまでは、先に進まないでください。

目次

1 はじめに

- この製品について 5
- キットの内容 9
- その他必要なアイテム 9
- 試薬類の保存 10
- 注文について 10

2 調製

- 試薬 11
 - Wash Solution 11
 - Extraction Solution 11
- RNase フリーの実施 12

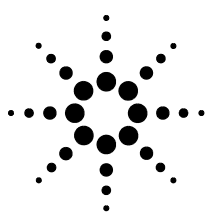
3 RNA 精製プロトコール

- 一般的な植物組織で利用できる Agilent Plant RNA 精製プロトコール 14

4 トータル RNA サンプルの品質チェックおよび定量

- UV 吸光 19
- Agilent 2100 バイオアナライザ 19
- 参考資料 20
- リファレンス 20
- その他の資料 20

5 トラブルシューティング



1

はじめに

この製品について

Agilent Plant RNA Isolation Mini キットでは、フェノールを使用せずに、スピンカラムを用いて、分解していないトータル RNA を高濃度かつ高純度で得ることができます（図 1 を参照）。このキットは、さまざまな植物種および組織のトータル RNA の精製に使用できます（図 2 を参照）。全細胞 RNA の収量は、シリカやグラスファイバーを用いた一般的な方法と同程度、またはそれ以上です。表 1 に一般的な結果を示します。

短時間で結果を出せるこの方法の大きな利点は、ゲノム DNA (gDNA) のコンタミネーションを最小限に抑えることができることです。細胞または組織のホモジネートを独自の mini prefiltration カラムを使って遠心することで、ほとんどすべての gDNA を初期の段階で取り除くことができます。植物試料に対してシリカまたはグラスファイバーを用いた一般的な方法に比べ、この方法では gDNA は通常、1/1,000 ~ 1/10,000 に低減します。マイクロアレイによる遺伝子発現解析など、多くのダウンストリームアプリケーションにこの方法で精製されたトータル RNA を用いれば、面倒な DNase 処理を省くことができます。さらなる利点として、わずか 10 µL の水で RNA を溶出することができるので、高濃度の RNA を必要とするアプリケーションにも最適です。精製後の酵素的、化学的または物理的な反応を妨げる可能性のあるバッファーや溶媒を使うことなく、高収率でトータル RNA を回収することができます。

この方法で調製される分解していないかつ高純度の RNA は、cDNA の合成やラベル化、RT-PCR、定量 RT-PCR、マイクロアレイによる遺伝子発現実験、ノーザンブロットング、RNase プロテクションアッセイ等のダウンストリームアプリケーションに最適です。



1 はじめに

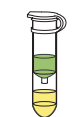
組織または細胞をホモジナイズする

- 1 適量の Extraction Solution/ β -ME 混合液を入れ、組織または種子のホモジネートを調製する。



mini prefiltration カラムで遠心する

- 2 最大で 600 μ L のホモジネートを mini prefiltration カラム（無着色）に入れ、16,000 x g で3分間、遠心する。



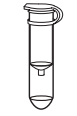
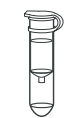
mini isolation カラムで RNA を捕捉する

- 3 同量のイソプロパノールをろ過液に加え、溶液が均一になるまで混合する。5分間インキュベートする。
- 4 この混合液を mini isolation カラム（青）に加え、16,000 x g で 30 秒間、遠心する。ろ過液を廃棄し、RNA を捕捉したカラムを同じコレクションチューブに戻す。



2 回洗浄し、脱水乾燥させる

- 5 あらかじめ準備しておいた Wash Solution 500 μ L を mini isolation カラムに加え、16,000 x g で 30 秒間、遠心する。ろ過液を廃棄し、isolation カラムを同じコレクションチューブに戻す。
- 6 500 μ L の Wash Solution を加え、16,000 x g で 2 分間、遠心する。



純粋な分解していない RNA を溶出する

- 7 Nuclease-free 水 10–50 μ L を加えて 1 分間おいた後、16,000 x g で 1 分間遠心し、精製 RNA を溶出する。

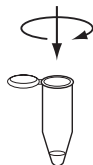


図 1 Agilent plant RNA 精製法

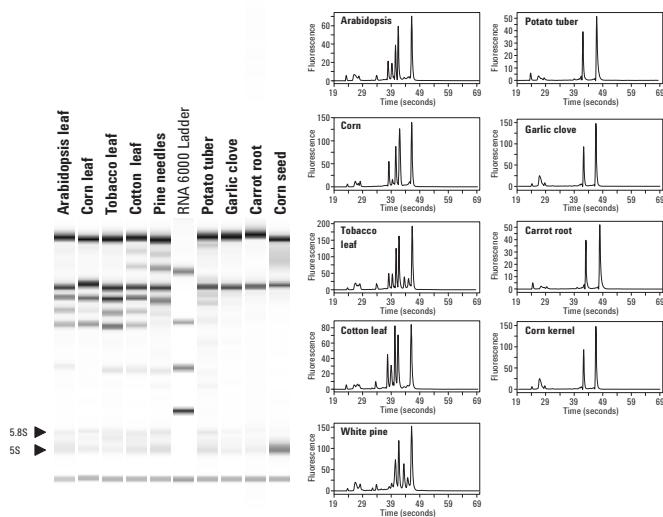


図2 さまざまな植物種と組織から精製したトータルRNAのAgilent Technologies バイオアナライザによる一般的なデータ

1 はじめに

表 1 全細胞 RNA の標準的収量

葉組織	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	収量* (ng/mg 組織)	gDNA ^{††} (pg/μg NA)
Arabidopsis	2.11	2.29	512	0.21
Corn	2.13	2.31	346	1.92
Rice	2.11	2.35	1104	6.26
Wheat	2.14	2.35	437	0.75
Cotton	2.10	1.99	217	11.51
Tobacco	1.88	1.84	280	0.77
Cucumber	2.10	2.39	959	2.56
Tomato	2.12	2.30	613	0.13
White pine (needles)	2.11	2.20	214	3.25
非光合成組織				
Corn root	2.12	2.14	92	5.35
Arabidopsis root	2.12	2.24	330	ND

* 10 mM Tris/1 mM EDTA、pH 8 (40 μg/mL RNA per unit A_{260}) で 260 nm の吸光率で測定。組織の収量は 40-mg の試料を前提としています。生育段階または環境条件により、収量は大幅に異なります。

† Arabidopsis の DNA を基準として使用し、特に 18S rRNA 遺伝子に対しプライマー/プローブセットを用いてリアルタイム PCR で測定。

ND 未測定

キットの内容

Agilent Plant RNA Isolation Mini キットは、表 2 に示したアイテムで構成されています。

表 2 キットの内容

量	内容
50 mL	Extraction Solution
19.5 mL	Wash Solution
25 mL	Nuclease-free 水
50 本	2mL コレクションチューブと対になった mini isolation カラム（青）
50 本	2mL コレクションチューブと対になった mini prefiltration カラム（無着色）
50 本	1.5mL RNase-free final コレクションチューブ
1	Agilent Plant RNA Isolation Mini キットプロトコール
1	Agilent Plant RNA 精製プロトコールクイックリファレンスカード

その他必要なアイテム

プロトコールを実行するには、表 3 に挙げたアイテムも必要となります。

表 3 その他必要なアイテム

必要なアイテム
100% エタノール
イソプロピルアルコール
14.3 M β -メタカプトエタール（neat）（ β -ME）
マイクロ遠心機
Nuclease-free 水
組織ホモジナイザー

試薬類の保存

すべての試薬は室温で保存してください。β-ME を加えた後の Extraction Solution の使用可能期間は 4 °C で 1 ヶ月です(ページ 11 を参照)。

注文について

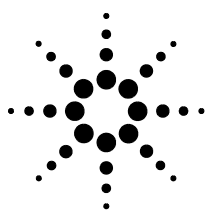
部品番号 5188-2780 「Agilent Plant RNA Isolation Mini キット (50)」
をご注文ください。

関連製品

Agilent Mini Prefiltration カラムおよび コレクションチューブ (50)	5188-2736
Agilent Low Input RNA Fuorescent Linear Amplification キット	5184-3523
Agilent cRNA Cleanup キット	5188-2770
Agilent Arabidopsis 2 Oligo Microarray キット	G4136A
Agilent Arabidopsis 3 Oligo Microarray キット	G4142A
Agilent Rice Microarray キット	G4138A
60-mer Custom Oligonucleotide Microarray - 11K フォーマット	G2513
60-mer Custom Oligonucleotide Microarray - 22K フォーマット	G2509A

上記製品およびその他の Agilent 製品の詳細については、下記の
Web サイトをご参照ください。

<http://www.chem.agilent.com>



2 調製

試薬

開始前に以下の試薬を調製しておきます。

Wash Solution

ACS グレードの 100% エタノール 45.5 mL を「**Wash Solution**」というラベルのあるボトルに加え、Wash Solution を調製します。よく攪拌します。ボトルのラベルのボックスにチェックマークを付け、エタノールが加えられていることを表示します。

Extraction Solution

β -メルカプトエタノール (β -ME) 500 μ L を Extraction Solution が入ったボトルに加えて調製します。少量の Extraction Solution を調製するには、Extraction Solution 1 mL あたり 10 μ L の β -ME を加えます。

β -ME を加えた後の Extraction Solution は、4 °C で保存します。この溶液の使用可能期間は 4 °C で 1 カ月です。

警告

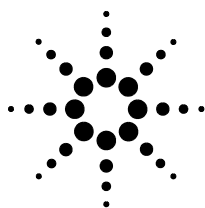
Extraction Solution は、吸い込んだり、飲み込んだり、皮膚を通して吸収されると人体に有害なグアニジンヒドロクロライドを含有しています。グアニジンヒドロクロライドは、皮膚、目、呼吸器系に炎症を起こします。漂白剤や酸と混ぜないでください。Extraction Solution を使用する際には手袋を着用し、薬品の取り扱いおよび廃棄法についての各実験室の規則に従ってください。



RNase フリーの実施

RNase は非常に安定度の高い酵素であるため、失活させることは困難です。RNA を扱う実験を成功させるには、この酵素との接触を避けることが重要です。以下の一般的な原則に従い、RNA サンプルが RNase に汚染されないようにしてください。

- RNA の精製を行う間、およびこのプロトコールに用いる実験設備やその他の用具および薬品を扱う際は、常に清潔な実験用手袋を着用します。
- 実験室のベンチ、ピペット、ホモジナイザー、その他の器具を RNase 汚染防止用の溶液で拭きます。その後、Nuclease-free 水で十分に洗い流してください。
- フィルター付きピペットチップおよびマイクロ遠心機用試験管は RNase フリーのものだけを使用します。
- 可能であれば、滅菌されたプラスチック製の使い捨て実験器具を使用してください。ガラス製の器具を使用する場合は、180 °C で一晩滅菌したうえでお使いください。
- ゲル電気泳動槽はすべて洗浄および滅菌し（たとえば、3% の過酸化水素で処理するなど）、その後 RNase フリー水で洗い流してください。



Agilent Plant RNA Isolation Mini キット
使用方法

3

RNA 精製プロトコール

この章では Plant RNA Isolation Mini キットのために用意されたプロトコールについて説明します。



一般的な植物組織で利用できる Agilent Plant RNA 精製プロトコール

このメソッドは植物組織からの小規模な RNA 精製用にデザインされ、25–100 mg の組織試料を前提として最適化されています。次のプロトコールは、45mg の組織を 450 μ L の Extraction Solution (10 倍量) で抽出した例について述べています。450 μ L の Extraction Solution を使用する場合でも、組織の種類により、適用する組織量を 25–100 mg の範囲で調整してください。適用する組織量が多い場合は、収量が多くなることがありますが、mini prefiltration カラムが詰まったり、一部の組織では純度が低下することがあります。また、乾燥した種子などの組織では、少量の試料で抽出することができます。様々な組織から得られる RNA 収量と組織タイプを表 1 に示します。

注

キット内のカラム

キットには 2 種類の色分けされたカラムが入っています。mini prefiltration カラム（無着色）および mini isolation カラム（青）です。必ずプロトコールに従って正しい種類のカラムを使用するようにしてください。

注

全てのステップは室温で実施してください。全ての遠心分離の作業はフルスピードのマイクロ遠心機で実施してください（約 16,000 $\times g$ ）。

警告

ケガを防ぐため、液体窒素を扱う際には、かならず防護用の眼鏡を装着してください。

操作を開始する前に、適切に試薬の準備を行ってください。

Extraction Solution

1/100 の量の β -ME (10 μ L β -ME/mL の Extraction Solution) を Extraction Solution に加えます。この Extraction Solution の作業用ストックは、その都度作成することも、500 μ L の β -ME を加え、まとめて 1 瓶を作成しておくこともできます。 β -ME を加えてからは 4 $^{\circ}$ C の温度で保管します。

Wash Solution

45.5mL の ACS グレード 100% のエタノールを、「Wash Solution」とラベルのあるボトルに加え、Wash Solution を調製します。よく攪拌します。エタノールを加えた後で、ボトルのラベル上のチェックボックスに忘れずに印をします。

組織の準備とホモジナイゼーション

注

植物組織の処理には、いくつかの方法があります。次に示す手順は、ローターステーター型ホモジナイザー（Omni International TH ホモジナイザー または Brinkmann Polytron ホモジナイザー）を使用し、このキット用に最適化されています。液体窒素内での磨砕、Dounce ホモジナイザー、またはマイクロチューブに対応したホモジナイザーなど、他の方法でも行えます。収率を高くするには、ホモジナイゼーションを完全に行うことが非常に重要です。

**表 4 組織のホモジナイゼーションで推奨される
Extraction Solution の量**

組織の種類	Extraction Solution の量 ($\mu\text{L}/\text{mg}$ 組織)
一般的な組織	5–10
水分の少ない組織 (高バイオマス)	10–20
高でんぷん (貯蔵組織)	10–20
乾燥した種子	20–40

- 組織試料を採取します。** RNA の分解は、組織の採取直後に始まります。よって、凍結せずに素早く処理を開始するか、液体窒素で急速冷凍することが重要です。急速冷凍は複数の試料を採取する場合に特に便利です。急速冷凍された組織は、 -70°C で保存します。
- ホモジナイゼーションのための組織の準備** 凍結していない試料はローターステーターブローブのブレードの間に入る程度に細かくしておく必要があります。葉の場合にはレーザーブレードで 0.5 cm 角に切ります。これは、トウモロコシの葉のような繊維の多い組織の場合に特に重要です。組織が凍っている場合、チューブの中で液体窒素で冷却したへらやガラス棒で直接砕くことができます。緩衝液を加えて直ちにホモジナイゼーションを開始するまで、組織は冷凍したままにしておくことが重要です。
- 試料** (25 ~ 100 mg) の重量を測り、**適当な大きさのチューブに入れます。** 15 mL の丸底ポリプロピレン管の使用は、1 ~ 8 mL の量に適しています。
- Extraction Solution を加えます。** ホモジナイゼーションを行う組織 1 mg に対して 10 μL の Extraction Solution (1% $\beta\text{-ME}$ が含まれます) を使用し、**直ちにホモジナイゼーションを行います (手順 5)。**

3 RNA 精製プロトコール

RNA 収量を高めるために、使用する Extraction Solution を 5 倍量にすることができます。しかし、一部の組織、特に水分の少ないまたは高でんぶんの組織の場合は、mini prefiltration カラムのキャパシティを超えることがあります（表 4 を参照）。

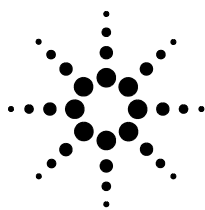
- 5 **直ちに十分に組織をホモジナイズします。** 標準的なローターステーターホモジナイザーでは、15,000 rpm (これは Omni International TH ホモジナイザーをフルスピードで用いた場合の 50% の速度です) で 30–60 秒ホモジナイズします。液体窒素内での磨砕、Dounce 型ホモジナイザー、またはマイクロチューブに対応したホモジナイザーなど、他の方法でも行えます。気泡の形成を少なくするため、プローブを上下ではなく、左右に動かします。容量が大きい (10mL 以上)、または繊維の多い組織の場合は、ホモジナイゼーションの時間を若干長くしてください。ホモジナイゼーションが不完全な場合は、収量が減少し、mini prefiltration カラムが詰まる場合があります。
- 6 **600 μ L のホモジネート (60 mg の組織に相当) を、mini prefiltration カラムに加えます (無着色)。** ホモジネートには粒子や細胞の破片が存在することがよくあり、標準のチップでは詰まることがあるため、Wide-Bore ピペットチップの使用をお薦めします。600 μ L を超えるホモジネート进行处理する場合、別の新しい mini prefiltration カラムを使用してください。mini prefiltration カラムの再利用はできません。
- 7 フルスPEEDで 3 分間 (標準のマイクロ遠心機では、約 16,000 $\times$ g) **遠心**します。このステップにより、組織を完全にホモジナイゼーションし、gDNA および他の細胞破片を除去します。ろ過液は透明か、やや黄色味を帯びています。光合成組織からの通過液が緑色になる場合、ホモジナイゼーションが不完全で、フィルターが詰まっている可能性があります。この場合、RNA 収量および品質は高いままですが、gDNA のコンタミネーションのレベルは通常よりも高くなる場合があります。
- 8 **同量のイソプロピルアルコールをろ過液に加えます。** 手順 6 で prefiltration カラムに最初に加えたホモジネートの量と同じ量を使用してください。上下に 2–3 回ピペッティングして混合し、室温で 5 分インキュベートします。mini isolation カラム (青) に移します。mini prefiltration カラムは細胞の破片をも取り除くためコレクションチューブにペレットは流出しません。このため、別の新しいチューブに移すことなく、コレクションチューブで混合して、直接 mini isolation カラムに移すことができます。

- 9 mini isolation カラムを 16,000 x g で 30 秒間遠心します。ろ過液を捨て、RNA を補足したカラムをコレクションチューブに戻します。イソプロピルアルコールとホモジネートの混合液が 600 μ L を超える場合は、まず、その等分した量を処理し、残りの混合液は、同じ mini isolation カラムを使い同じ手順で遠心をしてろ過液を捨てます。
- 10 あらかじめ準備した 500 μ L の Wash Solution を mini isolation カラムに加えます。16,000 x g で 30 秒間、遠心します。通過液を捨て、mini isolation カラムを同じコレクションチューブに戻します。
- 11 あらかじめ準備した 500 μ L の Wash Solution を mini isolation カラムに加えます。16,000 x g で 2 分間、遠心します。この 2 分間の遠心で mini isolation カラムを完全に乾燥させ、エタノールのキャリーオーバーを防ぎます。ろ過液を捨て、mini isolation カラムを新しい RNase フリーの 1.5 mL コレクションチューブに移し替えます。
- 12 10–50 μ L の nuclease-free 水を（メンブランに触れないようにして）メンブランのトップ中央に加えます。1 分間インキュベートした後、16,000 x g で 1 分間、遠心します。

注

精製後の RNA を用いたアプリケーションでより高い濃度の RNA サンプルが必要な場合には、溶出量を 10 μ L まで下げることができます。ただし、最終的な RNA 濃度が 3 μ g/ μ L を超える場合は、RNA の収量が低下する可能性があります。溶出量を選択するときには、予想収量を考慮する必要があります。予想収量が不明の場合、溶出に 10 μ L の nuclease-free 水を使用し、 $A_{260\text{nm}}$ によって濃度を決定します。濃度が 3 μ g/ μ L よりも高い場合、残留 RNA がメンブランに残っている可能性があります。isolation カラムにさらに 10 μ L を適用し、16,000 x g で 1 分間、回転させ、2 回目の溶出の濃度を決定します。2 回目の溶出に RNA が顕著に存在する場合、最初の溶出と一緒にプールします。

3 RNA 精製プロトコール



4

トータル RNA サンプルの 品質チェックおよび定量

このセクションでは、キットで回収したトータル RNA の品質および収量の測定を、3 種類の方法（UV 吸光、Agilent 2100 バイオアナライザ、およびゲル電気泳動）により行うためのガイドラインを説明します。

UV 吸光

分光光度計では、トータル RNA の核酸濃度の測定および、RNA 純度を確認できます。

RNA 濃度 分光光度計を用いて 260 nm (A_{260}) での吸光度を測定することで、RNA の濃度を測定できます。吸光度測定の精度を高めるには、サンプルを TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA) で希釈します。 A_{260} が 0.10 未満となるサンプルでは、実験データの変動が大きくなる傾向があります。1cm キュベットで A_{260} の吸光度が 1 の場合、40 μg RNA/mL に相当します。

RNA 純度 A_{260}/A_{280} 、および A_{260}/A_{230} の比は核酸の純度を示します。純度の高い RNA は一般に、 A_{260}/A_{280} の比が約 2.0 (DNA は 1.8 に近い数値) ですが、比が 1.8 と 2.2 の間であれば、正常であるといえます。 A_{260}/A_{280} の比が 1.8 以下の場合、通常、たんぱく質が混ざっていることを示しています。フェノールやグニジンなどの多糖および他の有機分子は、230 nm 前後で強く吸収します。純度の高い核酸の A_{260}/A_{230} の比は 2.0 です。比が低い場合は、多糖や他の有機化合物で汚染されていることを示しています。 A_{260}/A_{280} または A_{260}/A_{230} の比が 1.8 未満の RNA の取り扱いには注意が必要です。

RNA の吸光度測定に関する詳細なプロトコールについては、「Molecular Cloning. A Laboratory Manual」ボリューム 3、セクション A8.20 (Sambrook & Russell, 2001) を参照してください。

Agilent 2100 バイオアナライザ

RNA 収量および品質の測定には、Agilent 2100 バイオアナライザのご使用をお勧めします。その際には、適切な RNA 分析用キットをご利用ください。この方法では、RNA のサイズ、分布、および濃度が、ゲル電気泳動と同じように得られます。



4 トータル RNA サンプルの品質チェックおよび定量

植物セルまたは組織試料の場合、高品質のトータル RNA は、はっきりとしたリボソーマル RNA バンドを示します。種および組織タイプによって、リボソーマルバンドの数は異なります。たとえば、葉組織などの光合成組織には、25S および 18S rRNA バンドに加え、葉緑体からの数個のさらに小さいリボソーマル RNA が含まれます。種子や根組織などの非光合成組織には、これらの特殊な色素体 rRNA バンドは含まれません。質の高い植物のトータル RNA は、鋭くはっきりとした rRNA のピークを示します（図 2 を参照）。ベースラインが高く、ピークがはっきりしない場合は、RNA が分解していることを示しています。植物から採取される mRNA は、一般にトータル RNA のわずか 0.1% であるため、通常は電気泳動図では表示されません。トータル RNA サンプルの分解の程度は、試料の採取、処理、および、不適切な保存や取り扱いによっても異なります。

参考資料

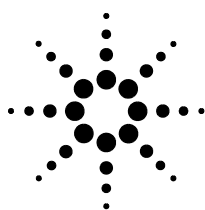
RNA 分析アッセイおよび Agilent 2100 バイオアナライザについての詳細は、次のサイトを参照してください。
<http://www.agilent.com/chem/chip>

リファレンス

- 1 『Molecular Cloning. A Laboratory Manual』 ボリューム 3、セクション A8.20 (Sambrook & Russel, 2001)
- 2 『Current Protocols in Molecular Biology』 セクション 4.9 (Ausubel et al., eds., 1994)

その他の資料

Plant RNA Isolation に関するその他の情報については、『High-Purity RNA Isolated from a Wide Range of Plant Species and Tissue Types Using the Agilent Plant RNA Isolation Mini Kit』、カタログ番号 5988-2271EN を参照してください。



5

トラブルシューティング

下の表 5 に、処理の手順に起因して生じる可能性のある一般的な現象、および考えられる解決策を示します。

表 5 よくある問題と、考えられる解決策

現象	解決策
Mini prefiltration カラムが詰まる	次のいずれかの手順で粘性を低下させます。 - Extraction Solution を追加して、ホモジネートを希釈する。 - ホモジネートをより完全にホモジナイズする。 - 試料の量を減らす。 - Mini prefiltration の前にホモジネートを遠心する。
RNA 収量が低い	- 破碎およびホモジナイゼーションを十分に行う。組織試料を完全に磨碎する。 - ホモジネートを調製後、素早く RNA を精製する。−70 °C で保存されたホモジネートを使用する場合、使用前に 37 °C で 15 ~ 20 分、解凍します。 - 試料に問題がないかどうかを調べる。組織を採取後、すぐに液体窒素で冷凍することを徹底する。 - カラム（mini prefiltration および mini isolation）に加えた試料がキャパシティを超えていないか確認する。 - 種および組織の種類によって予想される RNA 収量が大きく異なるため、試料の量を調節する。
RNA が分解している	- 使用する機器および器具は十分に RNase フリー処理を行う（「RNase フリーの実施」 12 ページを参照）。 - Extraction Solution に浸す前に、組織が解凍していないように注意する。 - 試料に問題がないかどうかを調べる。組織を採取後、直ちにホモジナイズ、または液体窒素で直ちに冷凍することを確認する。 - ホモジネートを調製したら、素早く RNA を精製する。
A ₂₆₀ /A ₂₈₀ 比が低い	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ 比が試料の pH によって変化する。信頼性のある測定値は、水ではなく、TE pH 8.0 などの緩衝液を使用することで得られる。



情報、説明および仕様は事前の通知なしに変更されることがあります。以下の URL から Agilent にオンラインでご登録いただければ、製品のアップデートに関するデータをお送りいたします。

www.agilent.com/chem/dnasupport

www.agilent.com/chem/JParrrayreagent



5188-1167

