

Agilent Plant RNA Isolation Mini プロトコール

(簡略プロトコール)

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整する。

prefiltration カラムで遠心分離する

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 $\times$ g で 3 分間、遠心分離する。

mini isolation カラムで RNA を捕捉する

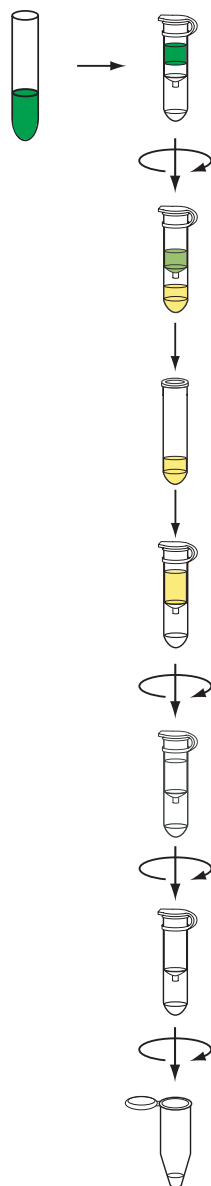
3. 同量のイプロパノールをろ過液に加え、溶液が均一になるまで混合する。5 分間培養する。
4. この混合液を mini isolation カラム（青）に加え、16,000 $\times$ g で 30 秒間、遠心分離する。通過液を廃棄し、RNA を捕捉したカラムを同じコレクションチューブに戻す。

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 $\times$ g で 30 秒間、遠心分離する。通過液を廃棄し、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 $\times$ g で 2 分間、遠心分離する。

精製後の 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 $\times$ g で 1 分間遠心し、精製 RNA を溶出する。



Agilent Technologies

トラブルシューティング

現象	解決策
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。 • ライセートをより完全にホモジナイズする。 • 出発試料の量を減らす。 • Prefiltration の前にライセートを遠心分離する。
RNA 収量が低い	• 破壊およびホモジナイゼーションを宵に行う。組織サンプルを宵に完全に磨砕する。 • ライセートを調製したら、素早く RNA を精製する。凍結ライセートを使用する場合、使用前に 37 °C で 15～20 分、解凍する。 • 試料に問題がないかどうかを調べる。組織は、有機体から取り出したらすぐに液体窒素で冷凍することを徹底する。 • カラム（prefiltration および isolation）がサンプルを収容できることを確認する。 • 陽 RNA 収量は、種および組織の種類によって大きく異なるため、開始試料の量を増やす。
RNA が分解している	• 機器のクリーニングにおいて、「RNase フリーの実蛭」に忠実に従う。 • 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。 • ライセートを調製したら、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、TE pH 8.0 などの緩衝液を使用することで得られる。

