

脳 RNA取りプロトコル

97/8/22 Written by Akiya WATAKABE

05/8/22 Revised

◎一般的注意

1) ホモジェナイズするまでのサンプルは、ウイルスに汚染されていることを仮定して注意深く取り扱う。操作はドラフトの中。手袋着用。70%エタノール消毒励行。汚染物(チューブ・葉包紙など)はオートクレープバッグに入れて後で殺菌する。

2) RNaseをコンタミさせないように注意する。手袋着用。作業場所は頻繁に拭く。チューブのふたの上はできるだけ通過しない。などなど。

◎試薬類の準備。

GTC solution

Guanidinium thiocyanate	250 g
MiliQ water	297.4 ml
1M Na-citrate (pH7)	13.2 ml
10% sarcosyl	26.4 ml

500mlのボトルに以上の中身を入れて65度で溶かす。室温保存。

Sol D

GTC solution に beta-mercaptoethanol を足す。(360 μ l of 2-ME/50 ml GTC)

DEPC-treated water

ミリQ水に0.1%(v/v) DEPC を加え室温 o/n。ふたをゆるめて40分オートクレープする。毎回作りなおした方が無難。

Phenol

DEPC 水(大体300ml)を500gのフェノールに加える。0.5gの8-Quinolol を加える。65度でフェノールを完全に解かしたらよく混ぜて4度保存。

2M NaOAc (pH4)

68.04gのNaOAc.3H₂Oをひたひた(約50mL)のミリQ水に溶かしpHを酢酸で4.0に合わせる。酢酸は200mL近く要るので注意。250mlに合わせてオートクレープ。

その他。

クロロホルム。エタノール。イソプロパノール。70%エタノール(毎回作りなおした方がいい)。

◎プロトコル（注釈に注意）。

- 1: Homogenize in Sol D 10 ml
- 2: Add NaOAc (pH 4) 1 ml
Phenol (D3W saturated) 10 ml
- 3: mix & keep RT 5 min
- 4: Add Chloroform 4 ml
- 5: mix & keep on ice 15 min
- 6: 3000 rpm x 30 min (Decel lowest)
- 7: Take sup
- 8: Add Phenol (D3W saturated) 10 ml
- 9: mix
- 10: Add Chloroform 4 ml
- 11: mix & keep on ice 10 min
- 12: 3000 rpm x 30 min (Decel lowest)
- Op1: Sup + Chloroform 2 ml in 15 ml tube
- Op2: 2000 rpm x 1 min
- 13: Sup + 10 ml Isopropanol
- 14: -20C 2 hr to overnight

- 15: 3000 rpm x 30 min 4C
- 16: Remove sup by decanting
- 17: Dry the pellet, tube inverted for 5 min
- 18: Resus in 75 % ethanol (2 times with 500 ul each)
- 19: spin 10 min
- 20: Remove sup (remove the residual liquid by additional spin)
- 21: Dissolve in 500 ul Sol D (by pipetting)
- 22: Shake for 10 min to completely dissolve the pellet
- 23: Add NaOAc (pH 4) 50 ul
Phenol (D3W saturated) 500 ul
- 24: Make sure there is no lump
- 25: Add Chloroform 200 ul
- 26: Sup+500 ul isopropanol
- 27: -20C 20 min, cfg 15 min
- 28: Remove sup, 70 % ethanol rinse
- 29: Dissolve in 400 ul D3W, ethanol ppt with 3M NaOAc
- 30: repeat ethanol ppt, 70 % ethanol rinse, dry for 10 min

OP はオプション。

2005年8月22日追記

<GTC法の簡略化バージョン>

GTC-phenolを必要量作る。

GTC solution	100 ml
2-mercaptoethanol	720 μ l
water-saturated phenol	100 ml
2M NaOAc (pH4)	10 ml

Phenol-Chloroform(PC)を必要量作る。

water-saturated phenol	100 ml
Chloroform	100 ml

1. Homogenize frozen tissue block in 12 ml GTC-phenol (over 10 times vol)
2. RT for a while
3. Add 2.5 ml Chloroform (Chl)
4. on ice 10 min
5. spin @ 3000 rpm for 30 min
6. Save the upper layer carefully
7. Add 7 ml PC
8. RT for 5 min
9. spin @ 3000 rpm for 20 min
10. Save the upper layer carefully
11. Add 6ml Isopropanol
12. -20 °C 2hours to overnight
13. spin @ 3000 rpm for 20 min
14. suspend the pellet in 1 ml of 70 % ethanol and move to a microtube
15. spin @ top speed for 2 min
16. Dissolve in DEPC-treated water

この方法だと組織（動物種）によっては、ゲノム DNA が混入する。

ゲノム DNA の混入、および RNA の integrity は 1% アガロースゲル電気泳動で確認。

<RNA 再精製>

Differential Display 法、定量的な RT-PCR 法など定量性が求められる場合には、ゲノム DNA の混入が大きな問題になるので、上記の方法で精製した RNA は small scale で再精製することを勧める。

試薬の準備

GTC-phenol

Mix 500 μ l of GTC solution, 500 μ l of water-saturated phenol, 50 μ l of 2M NaOAc per sample.

1. Set up the following DNase reaction.

Total RNA	20 μ g
10xRQ1 buffer	5 μ l
DEPC-water	
RQ1 (RNase-free DNaseI)	3 μ l
RNasin	1 μ l
Up to	50 μ l

2. 37°C 20 min
3. Add 1 ml of GTC-phenol and mix well
4. Add 200 μ l of Chloroform and mix well
5. Keep on ice for 5 min
6. Spin @ 14000 rpm for 5 min
7. Save the upper layer and add 500 μ l Chloroform
8. Spin @ 14000 rpm for 5 min
9. Save the upper layer and add 500 μ l isopropanol
10. Keep @-20°C for 15 min and spin @ 14000 rpm for 15 min
11. Dissolve the pellet in 100 μ l DEPC water
12. Add 3 M NaOAc 10 μ l, ethanol 250 μ l and mix well
13. Keep @-20°C for 15 min and spin @ 14000 rpm for 15 min
14. Rinse the pellet with 70 % ethanol
15. Dry for 5 min
16. Dissolve the pellet in 10 μ l DEPC water

Tips:

多糖、プロテオグリカンの豊富な組織（肝臓など）から RNA を抽出した場合、以下の方法である程度多糖類を除去できる。ただし 5S RNA は一緒に除去される。

High-salt solution

1.2M NaCl, 0.8M Na-citrate

NaCl	7 g
Na3-citrate.2H2O	23.5 g
MiliQ water	up to 100 ml

40分オートクレーブ。pH調節不要。

The following protocol is for ~20 μ g of RNA in ~100 μ l of water

1. Add 1 ml of GTC-phenol and mix well
2. Add 200 μ l of Chloroform and mix well
3. Keep on ice for 5 min
4. Spin @ 14000 rpm for 5 min
5. Save the upper layer and add 200 μ l High-salt sol and 200 μ l isopropanol
6. Mix and immediately spin @ 14000 rpm for 15 min
7. Dissolve the pellet in 100 μ l DEPC water
8. Add 3 M NaOAc 10 μ l, ethanol 250 μ l and mix well
9. Keep @-20°C for 15 min and spin @ 14000 rpm for 15 min
10. Rinse the pellet with 70 % ethanol
11. Dry for 5 min
12. Dissolve the pellet in 10 μ l DEPC water