



## TRIsure（フェノール抽出試薬）

カタログ番号： BIO-38032 100 ml

本資料は、取扱説明書ではなく、補足資料です。本製品を使用になられる際には、製品に添付される最新バージョンのマニュアル（英語版）を必ずご確認ください。本補足資料と製品に添付されるマニュアル（英語版）の内容に相違のある場合、製品に添付されるマニュアル（英語版）の内容が優先されます。

**注記：本製品はフェノール 30~60%を含有する医薬用外劇物ですので取り扱いには十分ご注意ください。事前に SDS を必ずご確認ください。「フェノールは皮膚に触れるとやけどします。取り扱いの際には、手袋、ゴーグルを使用してください。万が一、皮膚へ接触した場合は直ちに十分な洗浄剤および水で洗い流してください。気分が悪い場合は医師の助言を求めてください。また、本製品は毒性や腐食性があるため、流しに流さず、必ず決まった容器に回収して施設ごとに決まった後処理を行ってください。**

### TRIsure による RNA 抽出のプロトコール（フローは6ページに記載されています）

別途必要な試薬（製品には含まれません）

- クロロホルム
- イソプロパノール(冷蔵)
- 75%エタノール（DEPC 処理水使用）
- DEPC 処理水または PCR water

#### ① ホモジナイズ

##### 組織：

50-100 mg の組織に対して 1 ml の TRIsure を使って、組織サンプルをホモジナイズしてください。少量の組織（1-10 mg）には TRIsure を 800  $\mu$ l 加えてください。脂肪組織の場合には、上部に脂質がたまる可能性があるため、これを取り除いてください。

##### 植物組織：

ホモジナイズ後、4°C、10 分、12000  $\times$ g で遠心して、上清のホモジナイズされた溶液を新しいチューブに移し、不溶性物質を取り除いてください。

##### 接着細胞：

培養エリア 10 cm<sup>2</sup> に対して 1 ml の TRIsure を培養ディッシュやフラスコに添加し、細胞を直接溶解してください。そして細胞溶解液を数回ピペティングしてください。

##### 浮遊細胞：

室温、200  $\times$ g で 5 分遠心して細胞をペレット状にします。5 $\times$ 10<sup>6</sup> 個の細胞に対して 1 ml の TRIsure で細胞を溶解し、ピペットチップを用いて数回ピペティングしてください。

少量の細胞（10<sup>2</sup>-10<sup>6</sup> 個）には TRIsure を 800  $\mu$ l 加えてください。

**注記：この段階で、サンプルは-80°C で少なくとも 1 カ月間保存できます。**

## ② 液相分離

サンプルを室温で 5 分間インキュベートしてください。TRIsure の使用量 1 ml あたり 0.2 ml のクロロホルムを加えてください。チューブのキャップをしっかりと閉め、手で勢いよく 15 秒間振ってください。

**注記：本製品はフェノール 30~60%を含有する医薬用外劇物ですので取り扱いには十分ご注意ください。フェノールは皮膚に触れるとやけどします。取り扱いの際には、手袋、ゴーグルを使用してください。万が一、皮膚へ接触した場合は直ちに十分な洗浄剤および水で洗い流してください。**

サンプルを室温で 3 分間インキュベートしてください。12000 ×g、4°C で 15 分間（または 2600 ×g では 30 分間）遠心分離してください。サンプルは淡緑色をした有機相、中間相、RNA を含む透明な水相（最上部）に分かれます。

## ③ RNA の沈殿

水相を注意深く別のチューブに移してください。冷やしたイソプロパノールと一緒に混ぜて RNA を沈殿させてください。TRIsure の使用量 1 ml あたり、0.5 ml のイソプロパノールを使用してください。サンプルを室温で 10 分間インキュベートし、12000 ×g、4°C で 10 分間（または 2600 ×g で 30 分間）遠心分離してください。

*注記：少量の組織、細胞の場合、RNA をより効率的に沈殿させるため、水相へのイソプロパノール添加前に RNase-free Co-precipitant Pink(別売: BIO-37075)を加えることをお勧めします。(TRIsure 800 μl あたり 5-10 μg を添加します。)*

## ④ RNA の洗浄

上清を取り除き、ペレットを 75%のエタノールで一回洗浄してください。最低でも TRIsure の使用量 1 ml に対してエタノール 1 ml を加えてください。サンプルをボルテックスしてください。7500 ×g、4°C で 5 分間遠心分離してください。

*注記：この段階で、サンプルは 4°C で 1 週間、-20°C で 12 ヶ月間保存できます。*

## ⑤ RNA の再溶解

ペレットを 5-10 分間風乾させてください。PCR water または DEPC 処理水(別売: BIO-38030)を添加し、数回ピペティングして再溶解した後 60°C で 10 分間インキュベートしてください。RNA は -80°C で保存してください。

## TRIsure による DNA 抽出のプロトコール (フローは 7 ページに記載されています)

別途必要な試薬 (製品には含まれません)

- 100%エタノール
- 0.1 M クエン酸ナトリウム溶液 (10%エタノール含有)
- 75%エタノール
- 8 mM NaOH 溶液
- DEPC 処理水または PCR water

ホモジナイズし、液相を分離後、RNA 抽出用に水相を移し、中間相と有機相から DNA とタンパク質を単離します

注記: 中間相と有機相は 4°C でオーバーナイト(12 時間程度)保存できます。

### ① DNA の沈殿

中間相を覆っている水相の残りを取り除いてください。

(RNA 抽出のプロトコール③)

TRIsure の使用量 1 ml あたり 0.3 ml の 100%エタノールを加え、サンプルを反転混合してください。室温で 3 分間サンプルをインキュベート後、2000 ×g、4°C で 5 分間遠心分離します。

注記: この段階でサンプルは 4°C で少なくとも 1 ヶ月間保存できます。

### ② DNA の洗浄

上清を取り除いてください (注: タンパク質を抽出する場合は上清を別のチューブに保存しておいてください)。DNA ペレットを洗浄するために、TRIsure の使用量 1 ml あたり 0.1 M クエン酸ナトリウム溶液 1 ml (10%エタノール含有) を加え、時々混ぜながら室温で 30 分間インキュベートしてください。4°C、2000 ×g で 5 分間遠心分離してください。通常は 2 回の洗浄で充分ですが、200 µg 以上の大量の DNA などでは、さらに追加洗浄が必要になる場合があります。

洗浄の際に、TRIsure の使用量 1 ml あたり 1.5-2 ml の 75%エタノールを加えてペレットを懸濁してください。時々混ぜながら室温で 20 分間インキュベートした後、サンプルを 4°C、2000 ×g で 5 分間遠心分離してください。

### ③ DNA の再溶解

ペレットを 15 分間風乾してください。8 mM NaOH 溶液でペレットを溶解してください。12000 ×g で 10 分間遠心分離して不溶性の物質を取り除いた後、上清を別のチューブに移してください。

注記: 8 mM NaOH 溶液で溶解したサンプルは 4°C でオーバーナイト(12 時間程度)保存できません。長期間の保存の際には pH 値を 7.5、EDTA 濃度を 1 mM に調整して -20°C で保存してください。

## TRIsureによるタンパク質抽出のプロトコール（フローは8ページに記載されています）

別途必要な試薬（製品には含まれません）

- イソプロパノール
- 0.3 M 塩酸グアニジン溶液（95%エタノール含有）
- エタノール
- 1%SDS 溶液

### ① タンパク質沈殿

チューブに保存した上清に(DNA 抽出の Step2)、TRIsure の使用量 1 ml に対して 1.5 ml のイソプロパノールを加えてください。室温で 10 分間インキュベートし、4°C、12000 ×g で 10 分間遠心分離してください。

### ② タンパク質の洗浄

上清を取り除き、タンパク質・ペレットを 2 回洗浄してください。タンパク質・ペレットを洗浄するには、TRIsure の使用量 1 ml あたり 0.3 M 塩酸グアニジン溶液 2 ml（95%エタノール）を加えてください。室温で 20 分間インキュベートし、4°C、7500 ×g で 5 分間遠心分離してください。

注記：この段階で、サンプルは 4°C で少なくとも 1 ヶ月間、-20°C で 12 ヶ月間保存できます。

最終洗浄としてエタノール 2 ml を加えてボルテックスしてください。室温で 20 分間インキュベートし、4°C、7500 ×g で 5 分間遠心分離してください。

注記：この段階で、サンプルは 4°C で 1 ヶ月、-20°C で 12 ヶ月間保存できます。

### ③ タンパク質の再溶解

タンパク質・ペレットを 5-10 分間デシケーターで吸引しながら乾燥させてください。1%SDS 溶液でピペティングにより溶解してください。溶解が困難なサンプルの場合、50°C でインキュベートしてください。不溶性物質を取り除くため 4°C、10000 ×g で 10 分間遠心分離し、上清のタンパク質溶液を別のチューブへ移してください。タンパク質は-20°C で保存してください。

### 参考文献：

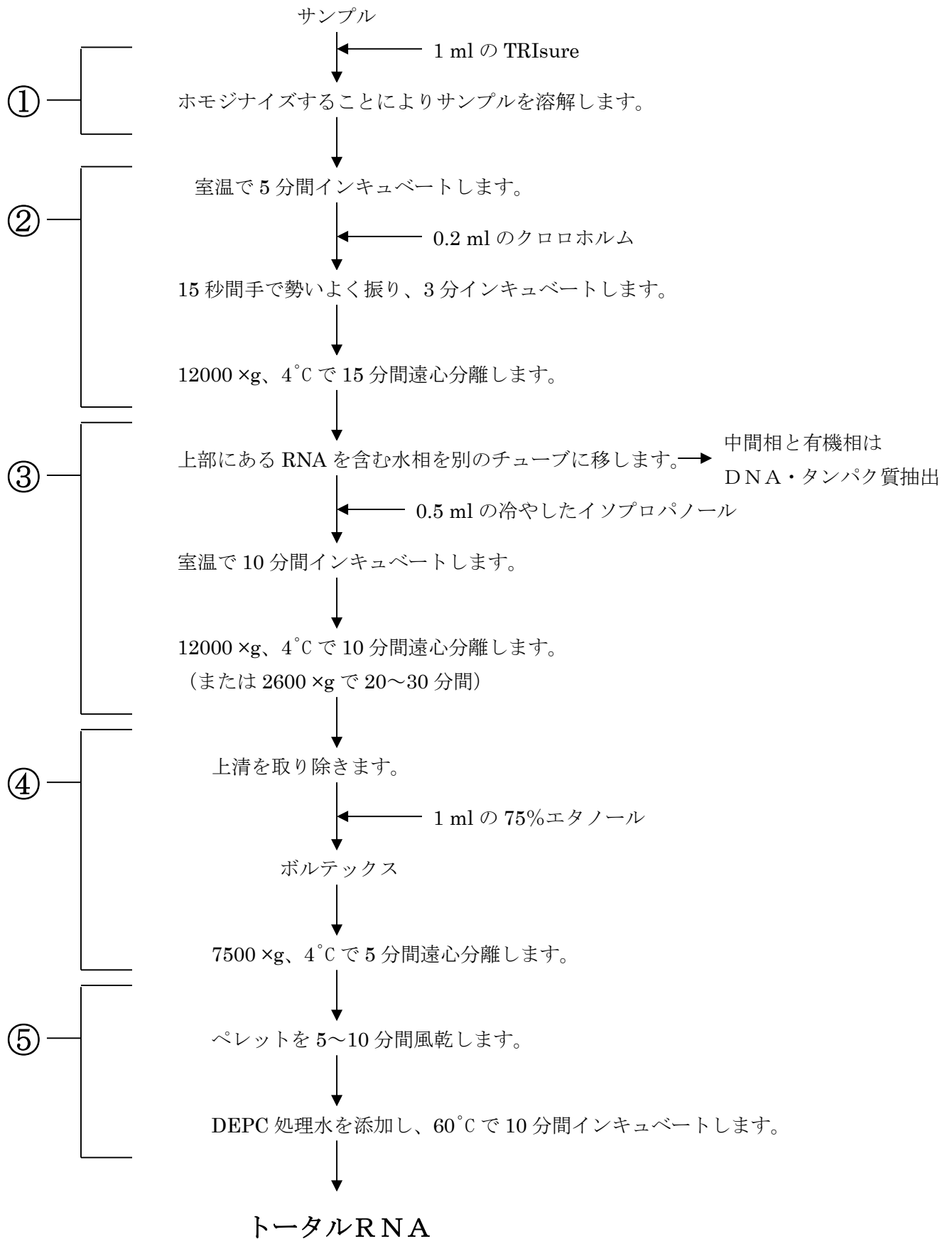
- 1 : Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156.
- 2 : Chomczynski, P. (1993) Biotechniques 15, 532.

トラブルシューティング

問題	考えられる原因	提案
DNA または RNA のコンタミネーション	中間相/有機相が水相と混ざってしまった	相を分離した後に水相のみを注意深く取り除いてください
	有機相から水相の除去が不十分	DNA 沈殿の前に水相の残りを除去してください
	DNA ペレットの wash が不十分	ペレットを 0.1 M クエン酸ナトリウム溶液 1 ml (10%エタノール含有) で確実に洗浄してください
RNA の収量が低い	サンプルのホモジナイズと溶解が不十分	初発量を減らしてください。組織をより小さく刻み、TRIsure に完全に浸して十分に溶解してください
	RNA、DNA やタンパク質のペレットの可溶化が不十分	サンプルを何度かピペティングして可溶化部分を増やし、60°C でインキュベートしてください
	ペレットの紛失	初発サンプル量が少量の場合、ペレットが沈殿後に見えづらい可能性があるため、ペレットから上清を除去するときにはちゅういをしてくださいご注意ください。
DNA の分解 RNA とタンパク質の分解	サンプル回収後にすぐに処理や凍結を行わなかった	サンプルは回収後、すぐに処理や凍結を行ってください
	単離した RNA、DNA やタンパク質が適切な温度で保存されなかった	RNA サンプルは-80°C で保存してください。 DNA とタンパク質は-20°C で保存してください。
	RNase のコンタミネーション	プロトコールは DNA フリー、RNase フリーの環境下で慎重に行ってください。RNA サンプルの抽出時に RNase 阻害剤を添加すると、サンプルの分解を防ぐのに役に立ちます。
RNA の A <sub>260/280</sub> が低い	TRIsure の量が不十分だった	10 cm <sup>2</sup> 面積または 10 <sup>6</sup> 細胞あたり、1 ml の TRIsure が使用されていることを確認してください。問題が解決しない場合、TRIsure の量を 1.5 倍量に増やします。
	RNA 含有の水相に有機相がコンタミネーションした	注意深く水相をピペットで取り除きます。RNA サンプル中に白い中間相が移されないことが重要です。そのために、水相の下部はそのままにしておくことをお勧めします
DNA の A <sub>260/280</sub> が低い	DNA 抽出からフェノールが十分に除去されなかった	DNA ペレットを 0.1 M クエン酸ナトリウム溶液 1 ml (10%エタノール含有) で再度 wash してください。

# TRIsure RNA 抽出

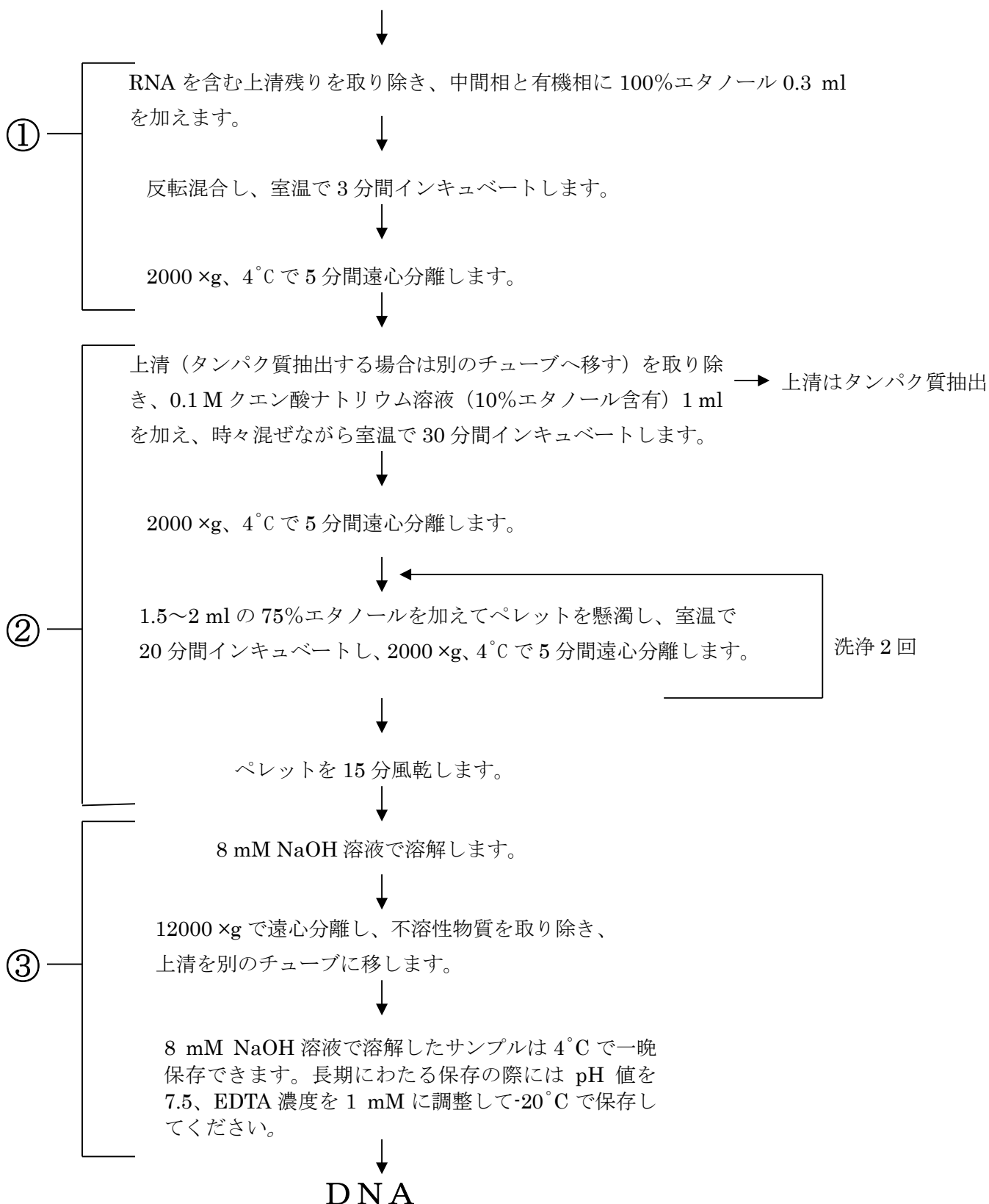
組織サンプル 50~100 mg 細胞  $5 \times 10^6$  個 での使用例



# TRIstore DNA 抽出

組織サンプル 50~100 mg 細胞  $5 \times 10^6$  個 での使用例

## 「TRIstore RNA 抽出ステップより (続き)」



# TRIstore タンパク質抽出

組織サンプル 50~100 mg 細胞  $5 \times 10^6$  個 での使用例

## 「TRIstore DNA 抽出ステップより (続き)」

