

# 【RNA抽出法 (Torizol法)】 1ページ目

## 必要試薬

- ・ クロロホルム (先生の部屋)
- ・ イソプロパノール (先生の部屋)
- ・ 75%エタノール (事前に準備しておく)
- ・ nuclease free water
- ・ TURBO DNA-free kit (-20°Cの窓側冷凍庫)

## 注意事項

- ・ RNA抽出は専用の実験台で行うこと
- ・ 実験に使用する器具、実験台、手袋などはRNase awayで処理した後に実験に使用すること。また、実験後にも同様の処理をすること。
- ・ クロロホルムは劇物であるため、手袋を装着して実験を行うこと
- ・ 実験に使用したチップや廃液は専用のゴミ箱に捨てること

## 実験手順

各サンプルをホモジナイズする



各チューブにクロロホルムを200 $\mu$ L加え、よく振る



室温で3分間、静置する



遠心分離する (11,500 $\times$ g 4°C 15分間)

※遠心分離機は事前に電源をONにし、温度調節をしておく



上澄みを新しい別のチューブに移す

※この時、移した上澄みの量を覚えておく



移した上澄みの量と1:1になるようにクロロホルムを加え、よく振る



遠心分離する (11,500 $\times$ g 4°C 3分間)



上澄みを新しい別のチューブに移す



イソプロパノールを各チューブに500 $\mu$ L加え、よく振る



室温で15分間静置する



遠心分離する (11,500 $\times$ g 4°C 10分間)



上澄みを捨てる (白い沈殿物がRNA)



2ページ目に続く

## 【RNA抽出法（Torizol法）】2ページ目

1ページ目の続き



よく冷えた75%エタノールを各1,000 $\mu$ L加え、ボルテックスでよく混ぜる  
※エタノールは - 20°Cで冷やしたものを使用する



遠心分離する ( 11,500 $\times$ g 4°C 5分間 )



上澄みを捨て、スピンドウンし、残りの上澄みをピペットで吸い取る



チューブを逆さまにして約5分間乾燥させる



nuclease free waterを加え、タッピングする  
※サンプルが Kidneyの場合... 44 $\mu$ L  
Spleenの場合... 30 $\mu$ L



1~2分間、55°Cでインキュベートする



氷上へ移す



TURBO DNA-free kitで処理する

|   |                          |                        |
|---|--------------------------|------------------------|
| ┌ | 10 $\times$ DNase buffer | kidneyの場合... 5 $\mu$ L |
|   |                          | spleenの場合... 3 $\mu$ L |
| └ | DNase 1 $\mu$ L          |                        |

※事前にDNase bufferとDNaseのmixtureを作り、  
それを各チューブに加える

※mixtureはサンプル1つ分程度多めに作っておく

※DNaseは使用する直前に冷凍庫から出し、実験に使用する。  
使用後は直ちに冷凍庫へ！！



次ページに続く

## 【RNA抽出法 (Torizol法)】 3ページ目

続き

