

TRIZOL[®] Reagent

Cat. 15596-018
室温保存

Size: 200 ml

警告：有毒です。皮膚への接触、飲み込みのない様ご注意ください。接触によりやけどを起こすことがあります。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。フェノール(108-95-2)および他の成分(NJTSRN 80100437-5000p)。

室温で保存してください。室温で保存した場合、本製品は約12ヶ月間安定です。

概要：

TRIZOL[®] 試薬(米国特許番号5346994)は、細胞や組織からの total RNA 分離用試薬です。Chomczynski および Sacchi によって開発されたフェノールとグアニジンイソチオシアネートを含んだ溶液によるシングルステップ RNA 単離法の改良版です。最初にサンプルへ TRIZOL[®] 試薬を加え、ホモジナイズします。この間 RNA を分解から防ぐことができます。クロロホルム添加後、遠心し、溶液を水相とフェノール-クロロホルム相に分離します。RNA は、水相の方に含まれているので、水相を取り出し、イソプロピルアルコールによる沈殿により RNA を回収することができます。水相の除去の後、残りの DNA およびタンパク質は、順次沈殿させることによって回収可能です(2)。DNA は中間相からエタノール沈殿により回収できます。タンパク質はフェノール-クロロホルム相からイソプロピルアルコール沈殿により回収できます(2)。DNA の同時抽出はサンプル間の RNA 収率の補正としても使用することができます。

TRIZOL[®] 試薬は、少量のヒト、動物、植物または細菌の細胞(5 × 10⁶)または組織(50-100 mg)だけでなく、多量の細胞 (>10⁷)、組織 (≥1g) についても使用できます。TRIZOL[®] 試薬は、多くのサンプルを同時処理でき大変便利です。プロトコールは、1時間です。回収された RNA には、タンパク質および DNA の混入がありません。このためノーザンブロット分析、ドットブロット/ハイブリダイゼーション、poly A 選択、インビトロ翻訳、RNase プロテクション法およびクロニングに使用することができます。PCR 反応*での使用については、2 つのプライマーが単一のエキソン内に在る場合は増幅グレード DNase I (Cat. No. 18068) による RNA の処理を推奨いたします。

TRIZOL[®] 試薬は、大きき異なる様々な RNA の抽出が可能です。ラット肝臓から抽出した RNA をアガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色すると、7kb から 15kb の高分子 RNA が確認できます。また、5kb(28S)と2kb(18S)に 2 本の rRNA のバンドが見られ、0.1kb から 0.3kb に低分子 RNA が確認できます。純度として、TE に溶解後の RNA の A_{260/280} の比は、1.8 以上になります。

RNase 混入の予防

RNase の混入は、RNA 抽出時によく見られます。RNase 活性は非常に安定なため、混入を防ぐことが重要です。そのため RNA を扱う時には、以下の点にご注意ください。

- 常に使い捨ての手袋を着用してください。皮膚はバクテリアやカビなどで汚染されていますので、RNase の混入の原因になります。
- 実験器具からの RNase の混入に注意してください。RNA 用に滅菌した使い捨てのプラスチック器具や電動ピペットをご使用ください。例として、RNA プローブを使用している研究室では RNase A や RNase T1 を使用していますので、使用している器具からの RNase 混入の危険があります。
- TRIZOL[®] 溶液中では、RNase による RNA の分解を防ぐことができますが、その後の操作では、RNase free のガラス器具やプラスチック器具が必要になります。ガラス器具は、150°C で 4 時間加熱し、プラスチック製品は 0.5M NaOH 溶液で 10 分間浸漬し、水で完全に洗浄後、オートクレーブしてください。

その他の注意点：

- 2ml 未満の TRIZOL[®] 試薬で作業する場合は、ポリプロピレン製の使い捨て器具を使用してください。
- 多量の TRIZOL[®] 試薬を使用する場合は、ガラス(Corex)またはポリプロピレンチューブを使用してください。またチューブは 12,000g の遠心に使用できる強度が必要です。チューブのひび割れにもご注意ください。
- 遠心の前にはチューブの重量を慎重に釣り合わせてください。
- ガラス管はアルミホイルとパラフィルムで覆い、ポリプロピレンチューブは遠心の前にキャップをしてください。

RNA の抽出方法

注意：TRIZOL[®] 試薬を扱う時は、手袋および目の保護具(シールド、安全ゴーグル)を使用してください。皮膚や衣類への接触を避けてください。クリーンベンチで使用し、蒸気の吸入を避けてください。

特に明記しない限り、手順は 15~30°C で実施し、試薬も 15~30°C にしてください。

必要な試薬：

- クロロホルム
- イソプロピルアルコール
- 75% エタノール(DEPC 処理水)

RNase free の水または 0.5% SDS 溶液[RNase free 水を調整するには、RNase free のガラス瓶に水を入れ、0.01%(v/v) になるようにジエチルピロカーボネート(DEPC)を加えてください。一晩静置後、オートクレーブしてください。SDS 溶液の調整には、DEPC 処理後オートクレーブした水を使用して下さい。]

1. サンプルのホモジナイズ

a. 組織

ガラステフロンあるいはホモジナイザー(ポリロン、または Tekmar の TISSUMIZER など)を使用して、50~100mg の組織あたり 1ml の TRIZOL[®] 試薬を用いてホモジナイズしてください。サンプルボリュームは、TRIZOL[®] 試薬の 10% 以内になるようにします。

b. 接着細胞

3.5cm dish に TRIZOL[®] 試薬を加え、ピペッティングで直接細胞を溶解します。加える TRIZOL[®] 試薬の量は、細胞数ではなく、培養面積に応じて決定してください(10cm²あたり 1ml)。TRIZOL[®] 試薬の量が不十分な場合、DNA がコンタミネーションする可能性がありますのでご注意ください。

c. 浮遊細胞

遠心により細胞を回収し、TRIZOL[®] 試薬を細胞に加え、ピペッティングにより溶解します。動物細胞、植物細胞、酵母の場合、5~10 × 10⁶ 個、細菌の場合、1 × 10⁶ 個の細胞に対して 1ml の TRIZOL[®] 試薬を加えてください。TRIZOL[®] 試薬添加前の細胞洗浄は、mRNA が分解される可能性があるのを避けてください。一部の酵母および細菌の破砕には、ホモジナイザーが必要な場合があります。

オプショナル：筋肉、脂肪組織および植物の塊茎部のような、タンパク質、脂肪、多糖類または細胞外物質を大量に含むサンプルは、さらに分離ステップが必要な場合があります。この場合、ホモジナイズ後、遠心分離(12000g、10分、2°C から 8°C)により不溶性画分を除去してください。細胞外膜、多糖類および高分子量の DNA は沈殿し、RNA は上清に含まれています。脂肪組織からの検体は、上層に脂肪成分がみられることがありますので除去してください。得られた RNA 溶液は、新しい RNase free のチューブに移し、クロロホルムを添加し、以下のプロトコールへ進んでください。

2. 2相分離

タンパク質を分離するため、15°C から 30°C で 5 分間インキュベートしてください。TRIZOL[®] 試薬 1ml あたりクロロホルム 0.2 ml を加えて、静かにチューブに蓋をしてください。チューブを 15 秒間激しく振り混合した後、15~30°C で 2~3 分間インキュベートしてください。インキュベート後、2~8°C で 15 分間、12,000g で遠心してください。遠心後、溶液は暗赤色のフェノール-クロロホルム相、中間相および無色の上部水相に分離します。RNA は水相に溶解しています。得られる水相のボリュームは、使用した TRIZOL[®] 試薬の約 60% になります。

3. RNA の沈殿

水相を新しいチューブに移してください。DNA またはタンパク質の抽出も行う場合はフェノール-クロロホルム相を保存してください。RNA は水相にイソプロピルアルコールを混合することによって沈殿させることができます。使用した TRIZOL[®] 試薬 1ml あたりイソプロピルアルコール 0.5 ml を加えてください。添加後、サンプルを 15~30°C で 10 分間インキュベートした後、2~8°C で 10 分間、12,000g で遠心してください。RNA の沈殿物は、チューブの側面および底部にゲル状ペレットとして確認できます。

4. RNA の洗浄

上清を除去してください。RNA ペレットを 75% エタノールで 1 回洗浄し、使用された TRIZOL[®] 試薬 1ml につき 75% エタノールを 1ml 以上加えてください。ポルテックス処理し、サンプルを混合した後、2~8°C で 5 分間、7500g で遠心してください。

5. RNA の懸濁

RNA ペレットを乾燥させてください(5-10 分間、風乾または真空乾燥してください)。真空乾燥時は遠心しないでください。RNA のペレットは、完全に乾燥させると溶解度が極端に低下するため、完全に乾燥する前に溶解してください。RNA に RNase free の水または 0.5% SDS 溶液を加え、ピペッティングで混合し、55°C から 60°C で 10 分間インキュベートします(回収した RNA を、その後の実験で酵素反応に使用する場合は、SDS 溶液を用いしないでください)。A_{260/280} 比 < 1.6 の場合は、RNA が完全に溶解していない可能性があります。RNA は 100% ホルムアミドに溶解し、-70°C に保存することも可能です(5)。

RNA 抽出時の注意点：

- 少量の組織(1~10 mg)または細胞(10²~10⁴ 個) サンプルからの RNA の抽出：組織または細胞に TRIZOL[®] 試薬 800 μl を加えてください。粘性がある場合は、ゲノム DNA をクロロホルム添加前に 26 ゲージ針を 2 回通し切断してください。サンプルを溶解後はステップ 2 のクロロホルム添加による 2 相分離を行ってください。回収した水相へ 5-10 μg の RNase free のグリコーゲン(Cat.No.10814) をキャリアとして加えてください。グリコーゲンは水相へ局在し、RNA と共沈します。グリコーゲンは最高 4mg/ml の濃度まで加えても、1 本鎖 cDNA 合成や PCR 反応を阻害しません。
- TRIZOL[®] 試薬によるホモジナイズ後のサンプルは(クロロホルム添加前)、-60~-70°C で 1ヶ月間は保存可能です。RNA の沈殿物(ステップ 4、RNA 洗浄)は、2~8°C で 1 週間、-5~-20°C では 1 年間、75% エタノール中で保存可能です。
- 卓上遠心機を本プロトコールに使用する場合は、最大 2600g の遠心機を用いて遠心時間をステップ 2 および 3 において 30~60 分延長してください。

DNA の抽出方法：

RNA 抽出法に記載されているように水相の除去後、中間相およびフェノール-クロロホルム相より DNA を抽出することができます。沈殿および洗浄後に、DNA を 8mM NaOH 溶液で可溶化します。ゲノム DNA を RNA と同時に抽出し、DNA 含量を定量することによって、total RNA 量や組織量をゲノム DNA 量で標準化することができます(2)。サンプルによって、DNA はさらに精製(フェノール抽出など)が必要となる場合があります。

必要な試薬：

- エタノール
- 0.1 M クエン酸ナトリウム/10% エタノール溶液
- 75% エタノール
- 8 mM NaOH 溶液

特に明記がない限り、手順は15~30℃で行ってください。

1. DNAの沈殿

中間相の上に残っている水相を除去し、DNAを中間相およびフェノール-クロロホルム相からエタノールで沈殿させます。使用した TRIZOL[®] 試薬1mlにつき100%エタノール0.3mlを加え、転倒混和にてサンプルを混合してください。次にサンプルを15~30℃で2~3分間インキュベートし、2~8℃で5分間、2000gで遠心し、DNAを沈殿させてください。
水相を注意深く除去することが、DNAの精製度に重要です。

2. DNAの洗浄

フェノール、エタノール含有の上清を除去します。タンパク質を抽出する場合は、この上清は保存してください。10%エタノールに0.1Mクエン酸ナトリウムを加えた溶液でDNAベレットを2回洗浄します。使用したTRIZOL[®] 試薬1mlあたり1mlの溶液で洗浄してください。各洗浄ステップでは、DNAベレットを15~30℃で30分間洗浄液でインキュベートし(時々攪拌してください)、2~8℃で5分間、2000gで遠心してください。2回洗浄した後、DNAベレットを75%エタノール(1mlのTRIZOL[®] 試薬あたり75%エタノール1.5-2ml)で懸濁し、15~30℃で10~20分間インキュベートし(時々攪拌してください)、2~8℃で5分間2000gで遠心してください。
200µg以上のDNAまたは大量のDNA以外の産物を含むサンプルを処理する場合は、0.1Mクエン酸ナトリウム/10%エタノール溶液での洗浄ステップをさらに追加してください。

3. DNAの再溶解

チューブの蓋を開け、5~15分間風燥させてください。(遠心分離下では乾燥させないでください。溶解がより困難になる場合があります。)、DNA濃度が0.2-0.3µg/µlになるように、DNAを8mM NaOH溶液に溶解してください。通常、10⁶個の細胞、または50~70mgの組織から抽出したDNAに300~600µlの8mM NaOH溶液を加えます。単離されたDNAは、水あるいはTrisバッファーでは再懸濁が難しいため、弱アルカリ性のバッファーで再懸濁することを推奨します。8mM NaOH溶液のpHは9以下のため、DNA溶解後は、TEバッファーまたはHEPESで容易に調節することができます。この段階では、DNA溶液(特に組織からの溶液)は不溶性のゲル状物質(膜の断片等)を含むことがあります。この場合、12000g以上で10分間遠心し、不溶性物質を除去してください。遠心後、新しいチューブにDNAを含む上清を移してください。8mM NaOH溶液で可溶化したDNAは、4℃で一晩保存可能です。長期保存については、サンプルがpH 7-8(表参照)になるまでHEPESで調節し、1mM EDTAを加えてください。pH調節後は、DNAは4℃または-20℃で保存可能です。

DNAの定量および予想される収量

8mM NaOH溶液に溶解したDNA溶液を一定量取り、水と混合した後、A₂₆₀の吸光度を測定してください。2本鎖DNAについては、A₂₆₀値を使用してDNA含量を計算してください。A₂₆₀の1ユニットは2本鎖DNA50µg/mlに相当します。ヒト、ラット、マウス由来の2倍体細胞1×10⁶個あたりのDNA量はそれぞれ7.1µg、6.5µg、5.8µgになります(3)。サンプルに使用した細胞数は、この値を基に算出してください。

アプリケーション:

PCRによるDNAの増幅:

DNAを8mM NaOH溶液に溶解後、0.1M HEPESでpHを8.4に調整してください(表参照)。DNAサンプル0.1~1.0µgをPCR反応に加え、通常のPCRプロトコルを行ってください。

制限酵素反応:

DNA溶液のpHをHEPESを使用し、目的の値に調整してください(表参照)。または1mM EDTA(pH 7~pH8.0) 溶液中でサンプルを透析することも可能です。1.0µgのDNAあたり3~5ユニットの酵素を使用してください。それぞれの酵素についてメーカーが推奨する条件で3~24時間反応させてください。通常の反応で、DNAの80~90%が消化されます。

8mM NaOH溶液で溶解したDNAサンプルのpH調整

1mlの8mM NaOH溶液について、以下の量の0.1Mあるいは1MのHEPESを使用します。

Final pH	0.1 M HEPES (µl)	Final pH	1 M HEPES (µl)
8.4	86	7.2	23
8.2	93	7.0	32
8.0	101		
7.8	117		
7.5	159		

DNA抽出の注意点:

- フェノール-クロロホルム相、中間相は、2~8℃で一晩保存可能です。
- 75%エタノールに溶解したサンプルは、2~8℃で数ヶ月間保存可能です。
- 8mM NaOH溶液に溶解したサンプルは、2~8℃で一晩保存可能です。長期保存については、pHを7~8に調整し、EDTAの濃度を1mMに調整してください。

タンパク質の分離方法:

タンパク質は、エタノールによるDNAの沈殿(DNAの沈殿、ステップ1)後に得られるフェノール、エタノール含有の上清から分離します。得られるサンプルは、ウエスタンブロット法による解析が可能です(2)。

必要な試薬:

- イソプロピルアルコール
- 0.3 M 塩酸 Guanidinium/95% エタノール
- エタノール
- 1% SDS溶液

1. タンパク質の沈殿

イソプロピルアルコールでフェノール、エタノール含有の上清よりタンパク質を沈殿させます(上清は使用したTRIZOL[®] 試薬1mlあたり約0.8mlの量になります)。使用したTRIZOL[®] 試薬1mlあたりイソプロピル1.5 mlを加えます。サンプルを15~30℃で10分間インキュベートし、2~8℃で10分間、12000gでタンパク質を沈殿させます。

2. タンパク質の洗浄

上清を除去し、0.3M塩酸 Guanidiniumを含む95%エタノール溶液でベレットを3回洗浄してください。使用したTRIZOL[®] 試薬1mlあたり洗浄液2mlを加えてください。各洗浄時、ベレットを15~30℃で20分間洗浄液でインキュベートし、2~8℃で5分間、7500gで遠心してください。3回目の洗浄後はベレットにエタノール2mlを加え、ボルテックスした後、5~30℃で20分間インキュベートしてください。インキュベート後、2~8℃で5分間、7500gで遠心してください1。

3. タンパク質の溶解

5~10分間ベレットを真空乾燥させます。1%SDS溶液を加え、ピペティングして溶解してください。ベレットが完全に溶解しない場合は、サンプルを50℃でインキュベートしてください。不溶性画分は2~8℃で10分間、10000gで遠心し沈殿させ、上清を新しいチューブに移してください。回収したサンプルはウエスタンブロット法に使用することができます。また、サンプルは5~-20℃で保存可能です。

タンパク質抽出の注意点:

- 0.3M塩酸 Guanidinium/95%エタノール溶液あるいはエタノールに溶解したタンパク質ベレットは、2~8℃で1ヶ月間、-5~-20℃で1年間は保存可能です。
- より効率的にタンパク質を回収したい場合は、こちらのプロトコルをお試しください。2~8℃の0.1%SDS溶液中で、フェノール、エタノール含有の上清を透析してください。透析のバッファーは3回取り替えてください。10分間、10000gで遠心し、上清を回収してください。
- SDS濃度が低濃度(0.1%以下)であれば、タンパク質はブラッドフォード法によって定量可能です。界面活性剤による干渉を受けず、A₂₆₀/A₂₈₀値に依存しない測定方法を使用してください(微量のフェノールは、タンパク質濃度の測定に影響する可能性があります)。

トランプルシューティングガイド:

RNAの分離

•1mgの組織または1×10⁶個の培養細胞からの予想RNA収量

- 肝臓と脾臓、6-10 µg
- 腎臓、3-4 µg
- 骨格筋および脳、1-1.5 µg
- 胎盤、1-4 µg
- 上皮細胞(1×10⁶個の培養細胞)、8-15 µg
- 線維芽細胞((1×10⁶個の培養細胞)、5-7 µg

•収率が低い

- サンプルが完全にホモジナイズされていない、もしくは溶解されていなかった。抽出後、RNAベレットが完全に再溶解されていなかった。
- A₂₆₀/A₂₈₀比が1.65以下
RNAサンプルを、TEバッファーではなく水で希釈した。低イオン強度およびpHが低い溶液は、280nmでの吸収率を増大させます(6、7)。ホモジナイズに使用したTRIZOL[®] 試薬1が少なすぎた。ホモジナイズ後、サンプルを室温で5分間インキュベートしなかった。水相がフェノール相とコンタミネーションしてしまつた。抽出後、RNAベレットが完全に再溶解されていなかった。

•RNAの分解

- 動物より取り出された組織を直ちに処理または冷凍しなかった。サンプルまたは抽出されたRNAを-5~-20℃で保存していた。サンプルは-60~-70℃で保存してください。細胞の回収時、トリプシンを使用し回収した。バッファーまたはチューブがRNase freeではなかった。アガロースゲル電気泳動に使用するホルムアルデヒドのpHが3.5より低かった。

•DNAの混入

- ホモジナイズに使用したTRIZOL[®] 試薬1が少なすぎた。サンプルが、有機溶媒(エタノール、DMSO等)、または強いアルカリ性溶液を含有していた。
- プロテオグリカンおよび多糖の混入
プロテオグリカンや多糖が混入してくる場合、RNA抽出プロトコルのステップ3を以下の様に変更してください。水相に0.25 mlのイソプロパノールを加え、さらに使用したTRIZOL[®] 試薬1mlあたり、0.25 mlの高塩濃度溶液(0.8M クエン酸ナトリウム/1.2M塩化ナトリウム溶液)を加えてください。その後のステップは、プロトコルに従ってください。またRNA抽出時の遠心ステップの追加(1ページ、RNAの分離方法、サンプルのホモジナイズ-オプション参照)と本プロトコルを組合せることにより、より高純度のRNAを抽出することができます。

DNAの分離

•1mgの組織または1×10⁶個の培養細胞からの予想DNA収量

- 肝臓および腎臓、3-4 µg
- 骨格筋、脳および胎盤、2-3 µg
- 培養ヒト、ラットおよびマウス細胞(1×10⁶個)、5-7 µg
- 線維芽細胞、5-7 µg

•収率が低い

- サンプルが完全にホモジナイズされていない、もしくは溶解されていなかった。抽出後、DNAベレットが完全に再溶解されていなかった。
- A₂₆₀/A₂₈₀比が1.70以下
DNAサンプルを、TEバッファーではなく水で希釈した。フェノールが十分除去されていなかった。DNAベレットを0.1Mクエン酸ナトリウム/10%エタノール溶液でもう1度洗浄してください。

DNAの分解

- 動物より取り出された組織を直ちに処理または冷凍しなかった。サンプル、または抽出されたDNAを-5~-20℃で保存していた。サンプルは-60~-70℃で保存してください。サンプルが、ポリロンまたは他の高速度ホモジナイザーでホモジナイズされた。

RNAの混入

- 水相の除去が十分でなかった。0.1Mクエン酸ナトリウム/10%エタノール溶液による洗浄が不十分だった。
- 他のアプリケーション
PCR反応を行う前に、pHを8.4に調整してください。制限酵素によるDNAの切断は、pHを調整し、1µgのDNAあたり3~5ユニットの酵素を用い、最適な条件下で3~24時間反応させてください。通常、DNAの80-90%が消化されます。

タンパク質の分離

•収率が低い

- サンプルが完全にホモジナイズされていない、もしくは溶解されていなかった。抽出後、タンパク質ベレットが完全に再溶解されていなかった。
- タンパク質の分解
動物より取り出された組織を直ちに処理または冷凍しなかった。
- SDS-PAGEにおけるバンドパターンノイズ
タンパク質ベレットの洗浄が不十分だった。

References:

- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* 162, 156.
- Chomczynski, P. (1993) *Biotechniques* 15, 532.
- Ausubel, F.M., et al. eds. (1990) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol.2, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, New York, p.A.1.5.
- Simms, D., Cizdziel, P.E., Chomczynski, P. (1993) *FOCUS*[®] 15, 99.
- Bracete, A.M., Fox, D.K., and Simms, D. (1998) *Focus* 20, 82).
- Wilfinger, W., Mackey, K. and Chomczynski, P. (1997) *BioTechniques* 22, 474.
- Fox, D.K. (1998) *Focus* 20, 37.

Teflon[®] is a registered trademark of E. I. Du Pont de Nemours & Co. TISSUMIZER[®] is a registered trademark of Tekmar Co. TRIZOL[®] is a registered trademark of Molecular Research Center, Inc. *PCR is covered by a patent held by Hoffman LaRoche Corporation.