

商品名 : DynaMarker® RNA High for Easy Electrophoresis

商品コード : DM170

この製品は研究用です。

コンポーネント:

Code No.	コンポーネント	組成	容量
DM171	DynaMarker® RNA High AGN 保存条件: -80 °C	構成する RNA は in vitro transcription により作製。 ※分子量レンジ: 200-8,000 bases	25 ug, 0.9mg/ml およそ 25 回分
DM172	RNA loading buffer AG+ 保存条件: -80 °C	3-N-morpholino propansulfonic acid, sodium acetate, ethidium bromide, glycerol, formamide, EDTA sodium salt, bromphenol blue.	1 ml

† 製品中にホルムアルデヒドは含まれておりません。

特徴 :

本キットを使うことにより、非変性アガロースゲルを用いて RNA を電気泳動することができ、さらに付属の分子量マーカーでサンプル RNA のサイズを推測できます。

本キットの使用法は、付属の RNA loading buffer AG+にホルムアルデヒドを添加(本キットにはホルムアルデヒドは付属しておりません)し、DynaMarker® RNA High AGN およびお手持ちの RNA サンプルと混合・加熱処理するだけです。

・RNA loading buffer AG+は変性アガロースゲルだけでなく、非変性アガロースゲルで RNA を電気泳動するためのローディングバッファです。本バッファを用いて電気泳動することにより、泳動後エチジウムブロマイドで染色しなくても UV トランスイルミネーター上で RNA バンドを確認することができます。

・DynaMarker® RNA High AGN は 200~8,000 bases の 9 本の RNA バンドから構成されており、バンドあたり 0.1 ug/ul となるように調製されています。

保存条件 :

-80 °C 保存

繰り返しの凍結融解は避けてください。

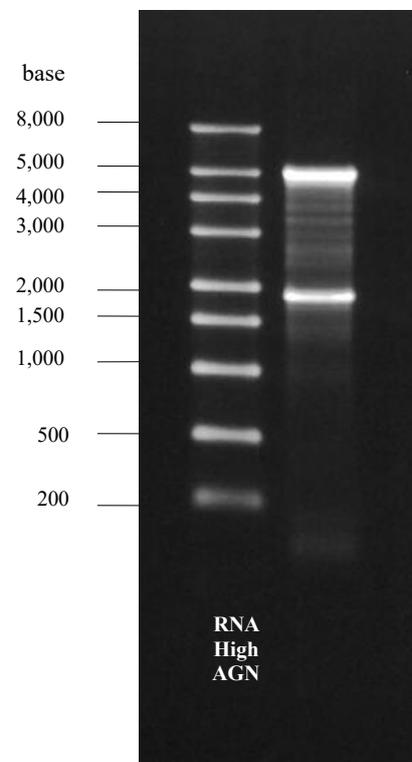
品質検定 :

DynaMarker® RNA High AGN :

37°Cで 18 時間インキュベート後のホルムアルデヒド変性 1%アガロースゲル電気泳動において分解は認められません。

注意 :

RNA はヌクレアーゼによる分解に対して大変センシティブです。ヌクレアーゼのコンタミを防ぐため、作業に



DynaMarker® RNA High AGN の電気泳動象

(ホルムアルデヒド変性 1%アガロースゲル)

左レーン : DynaMarker® RNA High AGN (0.45 µg)

右レーン : Human Total RNA (0.4 µg)

は最大限注意してください。実験用手袋を着用し、清潔な器具を使用してください。ガラス器具はあらかじめ DEPC 処理してください。もしくはヌクレアーゼフリーの使い捨てプラスチック器具のご使用をお勧めします。

RNA 試料およびマーカーを調製するための試薬はヌクレアーゼフリーで高グレードのものをご使用ください。
DynaMarker® RNA High AGN は氷上で解凍してください。また DynaMarker® RNA High AGN と RNA loading buffer AG+ を使用中は氷上に置いてください。

本製品は非変性アガロースゲルを用いて電気泳動できるよう調製されておりますが、厳密な実験を行う場合には変性アガロースゲル電気泳動についてもご検討ください。

✦ホルムアミドには目や皮膚に対して有害性が指摘されています。エチジウムブロマイドは変異原性物質であり、毒性が疑われます。ホルムアミドや臭化エチジウムを含む溶液をご使用の際には適切な保護具を着用してください。また保管時にはしっかりと蓋を閉めて保管してください。

✦ホルムアルデヒドは発がん性物質です。蒸気を吸い込まないでください。また取り扱いには適切な保護具をご使用ください。ホルムアルデヒドを含むゲルの取扱いは局所排気フード内で行ってください。

推奨使用方法：

DynaMarker® RNA High for Easy Electrophoresis を使用することで、変性アガロースゲルだけでなく、非変性アガロースゲル(1×TAE、0.5×TBE)でも電気泳動が可能です。RNA サイズを厳密に決めるには、変性アガロースゲルでの電気泳動が必要な場合があります。

< 非変性アガロースゲルでの電気泳動 >

1. 非変性アガロースゲルの調製

フラスコに 100ml の 1×TAE バッファーおよび 1.3g のアガロースを加え、電子レンジにて融解させます。よく攪拌させた後、素早くアガロースゲル作製用トレイに流し込みコームをセットします。

2. 次の通りホルムアルデヒド添加 RNA loading buffer AG+を調製します。

RNA loading buffer AG+	95 μl
37 % formaldehyde solution	5 μl
ホルムアルデヒド添加 RNA loading buffer AG+*	100 μl

*ホルムアルデヒドを加えた後のローディングバッファーは不安定のため調製後 6 時間以内にご使用ください。濃ホルムアルデヒドは 37~40 % W/V (12.3M)濃度で、安定剤として 10~15%のメタノールが含まれています。RNA loading buffer AG+およびホルムアルデヒド変性アガロースゲル作製には 37%濃度のホルムアルデヒドをご使用ください。例えばシグマアルドリッチ社から分子生物学用として 36.5~38%濃度のホルムアルデヒドが提供されています。

3. RNA の変性処理

下記のようにマイクロチューブ中で DynaMarker® RNA High AGN と分析する RNA サンプルを調製します。

DynaMarker® RNA High AGN もしくは RNA サンプル	0.5-2 μl *
formaldehyde-added RNA loading buffer AG+**	3 μl***
ddH ₂ O	to 5 μl
	5 μl **

混合後、75°C、3 分間加熱し、すぐにチューブを氷上に移してください。

* RNA 必要量は実験により異なります。ノーザンハイブリダイゼーションには 15μg 以上の RNA が必要です。DynaMarker® RNA High AGN をエチジウムブロマイド染色にて UV 照射下で検出するためには 0.5~4 μl が必要です。ホルムアルデヒド添加 RNA loading buffer AG+処理により、UV 照射下でゲル中の 0.05 μg 以上の RNA バンド

を検出できます。

**ホルムアルデヒド添加 RNA loading buffer AG+および RNA サンプルの混合溶液は不安定です。速やかにご使用ください。

***特に RNA 量を概算する場合には電気泳動するすべての RNA サンプルに同量の RNA loading buffer を加えることが大切です。ホルムアルデヒド添加 RNA loading buffer は 1×～2×組成です。サンプル RNA 溶液と同容量もしくはそれ以上添加してください。

4. ローディングおよび電気泳動

作製したアガロースゲルを 1×TAE バッファーを満たしたサブマリン型電気泳動装置にセットします。DNA を電気泳動する場合と同様に、上記の変性させた RNA 溶液をウエルに流し込みすぐに電気泳動をスタートさせます。色素がゲルの適切な位置に到達したら電気泳動をストップし、UV トランスイルミネーター上で観察します。

< 変性アガロースゲルでの電気泳動 >

1. 変性アガロースゲルの調製

フラスコに精製水 85ml とアガロース 1g を入れ、電子レンジでアガロースを溶解します。次に 10×MOPS バッファーを 10 ml 加えます。フラスコ内の溶液が 55°C まで冷えたら、局所排気フード内にて 37%ホルムアルデヒド溶液を 5.4 ml 加え、よく混ぜます。そして素早くアガロースゲル作製プレートに流し込みコームをセットします。ゲルが固まったら使用するまで 1×MOPS バッファーで表面を覆ってください。

*濃ホルムアルデヒドは 37～40 % W/V (12.3M)濃度で、安定剤として 10～15%のメタノールが含まれています。

**ホルムアルデヒド添加 RNA loading buffer AG+の調製には 37%ホルムアルデヒドを使用します。

2. 次の通りホルムアルデヒド添加 RNA loading buffer AG+を調製します。

RNA loading buffer AG+	95 μl
37 % formaldehyde solution	5 μl
ホルムアルデヒド添加 RNA loading buffer AG+*	100 μl

*ホルムアルデヒドを加えた後のローディングバッファーは不安定のため調製後 6 時間以内にご使用ください。

3. RNA の変性処理

下記のようにマイクロチューブ中で DynaMarker® RNA High AGN と分析する RNA サンプルを調製します。

DynaMarker® RNA High AGN もしくは RNA サンプル	0.5-2 μl *
formaldehyde-added RNA loading buffer AG+**	3 μl***
ddH ₂ O	to 5 μl
	5 μl **

混合後、75°C、3 分間加熱し、すぐにチューブを氷上に移してください。

* RNA 必要量は実験により異なります。ノーザンハイブリダイゼーションには 15μg 以上の RNA が必要です。DynaMarker® RNA High AGN をエチジウムブロマイド染色にて UV 照射下で検出するためには 0.5～4 μl が必要です。ホルムアルデヒド添加 RNA loading buffer AG+処理により、UV 照射下で 0.05 μg 以上の RNA バンドを検出できます。

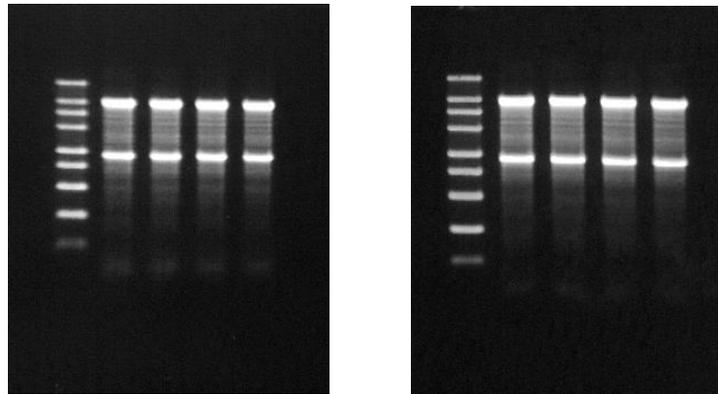
**ホルムアルデヒド添加 RNA loading buffer AG+および RNA サンプルの混合溶液は不安定です。速やかにご使用ください。

***特に RNA 量を概算する場合には電気泳動するすべての RNA サンプルに同量の RNA loading buffer を加えることが大切です。ホルムアルデヒド添加 RNA loading buffer は 1×～2×組成です。サンプル RNA 溶液と同容量もしくはそれ以上添加してください。

4. ローディングおよび電気泳動

作製したアガロースゲルを 1×MOPS バッファーを満したサブマリン型電気泳動装置にセットします。上記の変性させた RNA 溶液をウエルに流し込みすぐに電気泳動をスタートさせます。色素がゲルの適切な位置に到達したら電気泳動をストップします。RNA バンドを UV トランスイルミネーター上で観察します。

電気泳動象



変性アガロースゲル

非変性アガロースゲル

RNA は変性ゲルと非変性ゲルで同様に泳動された。

DynaMarker® RNA High AGN (0.45 µg/well), Human Total RNA (0.4 µg/ well)

(左) 変性アガロースゲル電気泳動

(右) 非変性アガロースゲル電気泳動

DynaMarker® RNA High AGN もしくは Human Total RNA は上記のホルムアルデヒド含有 RNA loading buffer AG+を混合し処理した。

文献:

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

関連製品

DM260	DynaMarker® Prestain Marker for RNA High 200~8000 bases の RNA 用プレステイン分子量マーカー
DM152	DynaMarker® RNA Low II 20~500 bases の天然 RNA で構成されている RNA 分子量マーカー