

최적의 RNA 추출을 위한 RNAiso Plus

■ 최적의 RNA 추출을 위한 RNAiso Plus

RNAiso Plus (TaKaRa Code 9108/9109)는 total RNA 추출법으로서 널리 알려진 AGPC (Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform)법을 기본으로 하여 배양 세포, 동·식물조직 등 다양한 시료 (표 1)로부터 간편하게 고순도의 total RNA 추출이 가능하다 (그림 1,2). RNAiso Plus는 유기용매 층을 식별하기 쉽게 적색으로 개선되어 경계면 구분이 쉽고, RNA를 포함한 수층의 회수가 간단해졌다 (그림 3). 게다가 간단한 protocol로 쉽게 시료량을 늘릴 수 있어 대량샘플로부터 한 번에 다량의 total RNA 추출이 필요한 경우 등에 최적의 방법이다.

아래에서는 RNAiso Plus와 FastPure® RNA Kit (TaKaRa code 9190)를 조합하여 실시하는 고순도 total RNA 추출법에 대해 소개한다. 또한, 이러한 추출 제품과 신제품 Fruit-mate™ for RNA Purification (TaKaRa code 9192), 또는 High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (TaKaRa code 9193)을 함께 사용하여, RNA 추출 kit만으로는 고순도 total RNA 추출이 어려운 식물 시료로부터의 회수량과 순도가 현저하게 개선된 추출 예도 소개한다.

■ 전처리 시약 Fruit-mate™ for RNA Purification

다당류를 많이 포함한 식물로부터 total RNA를 추출하기 위한 전처리 시약이다. 파쇄한 식물 조직에 본 시약을 첨가한 후, 원심분리하여 침전물을 제거하고 total RNA를 추출할 경우 추출효율이 높아진다. 여러 가지 식물을 본 시약으로 전처리 한 다음, RNAiso Plus 및 FastPure® RNA Kit를 이용하여 total RNA를 추출한 결과를 나타내었다.

【방법】

액체질소를 첨가하여 파쇄한 식물 조직 (50 mg)에 Fruit-mate™ for RNA Purification 500 µl를 첨가한 후, 원심분리 (12,000×g, 5분, 4℃) 하였다. 상층액을 RNAiso Plus 또는 FastPure® RNA Kit의 protocol에 따라서 total RNA를 추출하여 전 처리를 실시하지 않았던 경우와 추출 효율을 비교하였다.

표 1. 시료량과 total RNA 추출량의 기준

조직 재료	시료량	total RNA 추출량
간	1 g	약 5,000 µg
신장	1 g	약 3,000 µg
골격근	1 g	약 1,500 µg
뇌	1 g	약 1,500 µg
HL-60 배양 세포	1 × 10 ⁷ 개	약 100 µg
담배잎	1 g	약 1,000 µg
백혈구 세포	1 × 10 ⁷ 개	약 100 µg
전혈*	1 ml	15~20 µg

*전혈 100µl에 대해 1 ml의 RNAiso Plus를 사용하였다.

【결과】

본 제품을 전 처리하는 것이 지금까지의 여러 가지 식물 total RNA 추출 방법에 비해 식물 total RNA 추출효율을 크게 개선시켰다. 본 실험에서는 total RNA 추출에 이용한 RNAiso Plus와 FastPure® RNA Kit에서 거의 동등한 전 처리효과를 얻었다 (그림 4).



그림 1. RNAiso Plus의 protocol의 개략

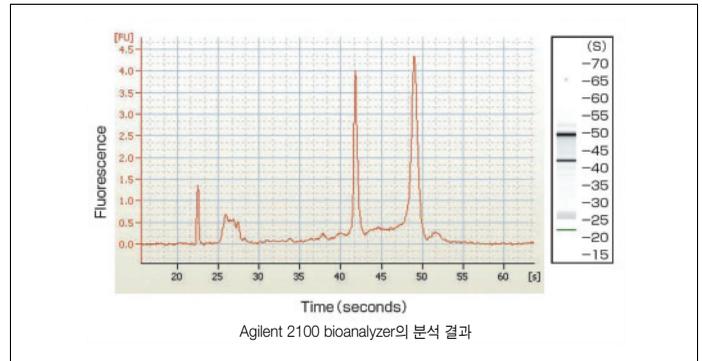


그림 2. HeLa 세포 1.5 × 10⁶ 개로부터의 회수 예
회수량 : 37.3 µg, A₂₆₀/A₂₈₀ = 1.96



그림 3. RNAiso Plus의 적색을 나타내는 유기용매층

최적의 RNA 추출을 위한 RNAiso Plus

Continued...

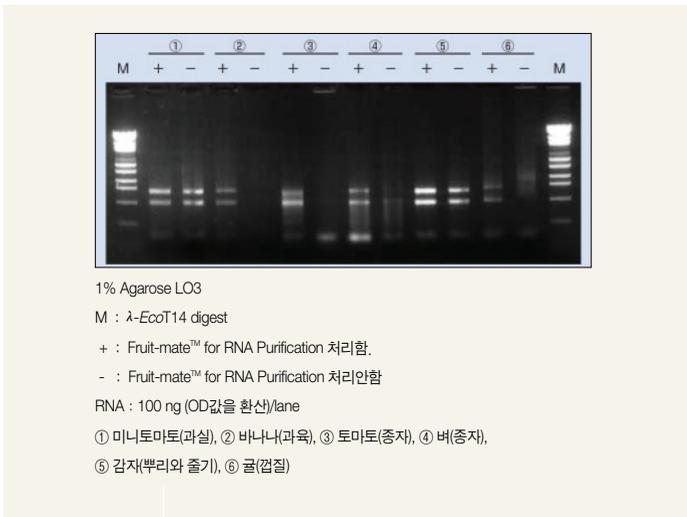


그림 4. Fruit-mate™ for RNA Purification 처리(+)/무처리(-) 후 RNAiso Plus로 추출한 total RNA의 전기영동 결과

여기에서는 데이터를 나타내지 않았지만, 알로에 (잎), 망고 (과실), 애기장대 (종자), 솔잎 등에서도 같은 효과를 볼 수 있었다. 또한, 다당류나 폴리페놀류를 소량 포함하고 있는 새싹이나 어린 잎 등의 경우는 Fruit-mate™를 사용하면 반대로 수율이 떨어지기 때문에 RNAiso Plus 또는 FastPure® RNA Kit 단독 추출을 권장한다.

■ High-Salt Solution for Precipitation (Plant)의 효과

RNA 용액에 잔존하는 다당류를 제거하기 위한 보조시약으로, RNA 추출 조작의 정제 step인 isopropanol 침전 처리시에 본 시약을 첨가하는 것만으로 고순도 total RNA의 추출이 가능하며, 매우 간단하게 순도의 높은 샘플을 조제할 수 있다.

조성 : 1.2 M NaCl, 0.8 M Sodium Citrate

(고온고압멸균 처리함, DNase 및 RNase free)

주의 : 저분자 RNA는 회수율이 낮기 때문에, 사용 목적에 따라 이용하십시오.

【방법】

RNA 시료 1에 본 제품 과 isopropanol을 각각 0.5 비율로 첨가 후, 원심분리 하여 얻은 total RNA pellet을 75% ethanol로 세정하고 원심분리 하여 RNA를 회수한다. A_{260}/A_{230} 가 1.5 이하의 담배 배양 세포 (BY-2) RNA용액 세 시료의 다당류제거 효과를 조사하기 위해 본 시약으로 처리한 후 추출한 RNA의 A_{260} , A_{280} , A_{230} 를 측정하였다.

【결과】

모든 시료가 A_{260}/A_{230} 가 2.0 이상이 되어 확실한 다당류 제거 효과를 확인할 수 있었다 (그림 5).

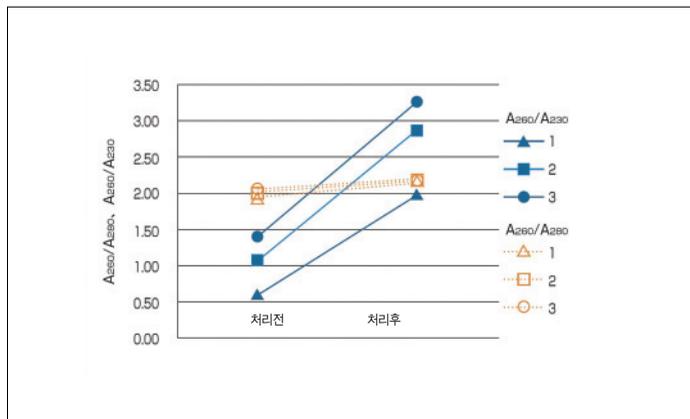


그림 5. A_{260}/A_{230} , A_{260}/A_{280} 의 비교에 의한 다당류 등의 제거 효과

■ 관련 제품

제 품 명	용 량	TaKaRa Code
FastPure® RNA Kit	50회	9109
RNAiso Plus	100 ml	9108
	200 ml	9109
FastPure® DNA Kit	50회	9191
Fruit-mate for RNA Purification	100 ml	9192
High-Salt Solution for Precipitation (Plant)	50 ml	9193
Thermal Cycler Dice® Real Time System	1대	TP800
One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit (Perfect Real Time)	100 회	RR066A
	500 회	RR066B (A×5)
One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit II (Perfect Real Time)	100 회	RR086A
	500 회	RR086B (A×5)
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase	250 U	R010A
	1,000 U	R010B (A×5)
DNase I (RNase-free)	5,000 U	2215A
	10,000 U	2215B (A×2)

* License Notice : [2, 3, 4, 19]