

TOMY Micro Smash MS-100 型デモ機使用報告
(魚類組織からの Total RNA 抽出)

鹿児島大学・水産学部
資源利用科学講座
山田 章二

【方法】

試験魚 : ナイルテラピア (体長 18cm, 体重 79g)

抽出組織 : 液体窒素で凍結保存しておいた組織 (10 種類) を使用。

肝臓 (157.6mg)、脳 (175.1mg)、心臓 (141.4mg)、腎臓 (78.9mg)、脾臓 (107.0mg)、
鰓 (95.4mg)、網膜 (132.6mg) 腸 (133.6mg)、筋肉 (147.9mg)、水晶体 (77.4mg)

破碎条件 : ステンレスビーズ (ϕ 5.5mm) 1 個+ガラスビーズ (ϕ 1.0mm) 100mg

室温、4100rpm、30 秒間、1 回または 2 回。

(2 回の場合は、1 回目の破碎後、氷中にて 2 分間の中間冷却を行った。)

抽出試薬 : TRIzol (Invitrogen 社製)

(手順)

各ピースはオートクレーブにて滅菌後、あらかじめ 2ml のアシストチューブ (Cat. No. 72.693S, γ 線滅菌) に分注しておいた。各チューブに凍結サンプルを入れ、脳については 1700 μ l、それ以外の組織については 1500 μ l の TRIzol 試薬を添加した。TOMY MicroSmash MS-100 型を用いて、上記の条件下で破碎を行った。目視により 1 回目の破碎処理では不十分と判断された 2 種類の組織 (腸、水晶体) については、冷却後さらに 2 回目の破碎処理を行った。Total RNA の抽出は、TRIzol のプロトコルに従った。RNA 回収量は、吸光度測定により求めた。アガロース電気泳動 (未変性ゲル) で RNA のチェックを行った。

【結果】

(1) 目視による破碎状態 :

1 回目 : 良好 = 肝臓、脳、心臓、腎臓、脾臓、鰓、網膜、筋肉

不十分 = 腸、水晶体

2 回目 : 良好 = 腸

不十分 = 水晶体

腸と水晶体を除く他組織においては、1 回目の処理で完全に破碎を行うことが可能であった。腸については、2 回目の破碎で良好であったが、水晶体は 2 回目でも完全には破碎されず残存した。

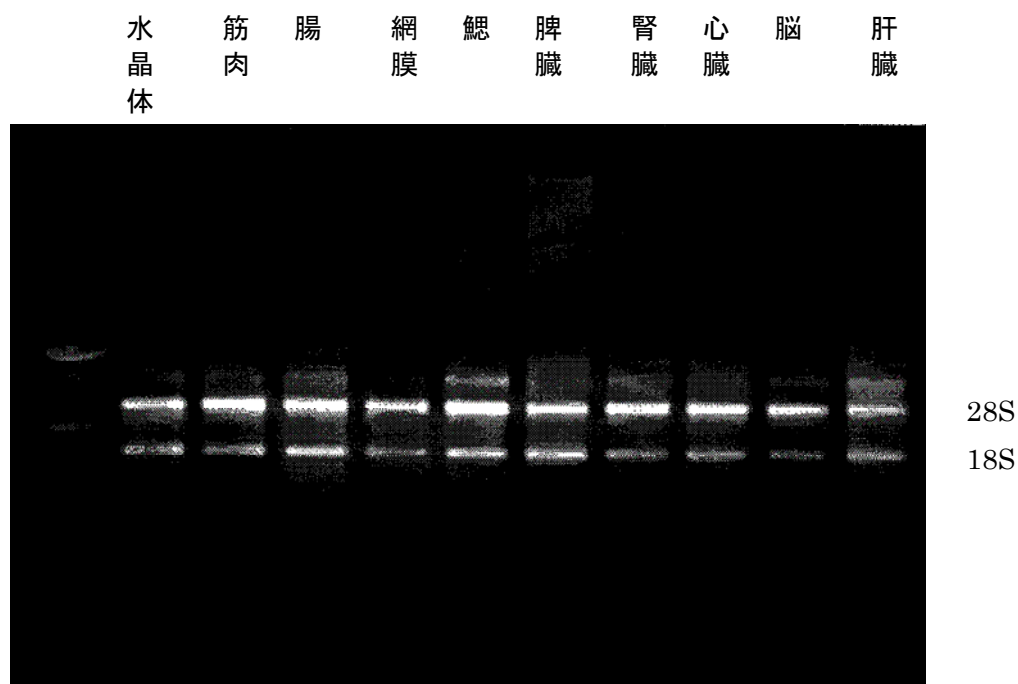
(2) Total RNA 回収量：

各組織からの Total RNA の回収量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) を下記に示した。

組織	：	肝臓	脳	心臓	腎臓	脾臓	鰓	網膜	腸	筋肉	水晶体
$\mu\text{g}/\text{mg}$	：	4.47	0.76	0.57	1.49	1.42	1.87	0.14	1.84	0.16	0.61

(3) 電気泳動

未変性アガロースゲル電気泳動により、各組織の Total RNA パターンをチェックした。結果は下図に示した。



すべての組織について良好なバンドパターン (28S rRNA/18S rRNA 比) が確認され、調整中に RNA の分解が少なく、良質の RNA が取れたと判断できた。

【使用後の感想】

今回は、魚類組織から Total RNA を抽出する目的で、デモ機による破碎実験を試みた。その結果、水晶体を除く 9 組織では、完全な破碎が可能であった。水晶体については、2 回目の破碎でも中心部分が未破碎の状態を確認されたが、その後の Total RNA の回収については、他組織と同様に良好な結果が得られた。(参考：ポリトロン等のシャフトドライブ型ホモジナイザーを使用しても、魚類水晶体の中心部分まで完全に破碎することは困難な場合が多い。) 以上の結果より、Total RNA 抽出の操作では、破碎時におけるホモジナイザーから起因するコンタミが心配されるが、個々のチューブ内で試料とビーズを高速で衝突させる Micro Smash MS-100 を採用することにより、魚類組織の多検体サンプルから効率よく簡単に抽出ができると考えられた。