

製品コード 9082

研究用

Takara

Gen とるくん™ (酵母用)
High Recovery

説明書

v201510Da

Gen とるくん (酵母用) High Recovery は、細胞壁分解酵素による酵母菌体処理と塩析による DNA 精製の組み合わせにより、効率良く酵母ゲノム DNA を抽出・精製するためのキットです。本キットを用いた酵母ゲノム DNA 調製操作は、遠心による酵母菌体の回収、GenTLE Yeast Solution A (細胞壁分解酵素 Zymolyase-100T を含む) による酵母細胞壁の分解、GenTLE Yeast Solution B 添加による細胞の溶解、GenTLE Yeast Solution C 添加と遠心分離による夾雑タンパク質の塩析除去、イソプロパノール沈殿による遠心上清からの DNA 回収からなります。

本キットを用いて、下表 A、B に記載の多様な酵母 (属) から、サザンブロッティング、PCR、制限酵素処理など一般的な遺伝子工学実験に利用可能なゲノム DNA を調製することができます。標準的な実験例の場合、 $1 \sim 2 \times 10^8$ の酵母菌体から $4 \sim 10 \mu\text{g}$ の高分子ゲノム DNA (35 ~ 200 kb) が得られます。

表. 本キットを用いて DNA 調製可能な酵母 (属)

A	DNA 調製可能な酵母 (属)	<i>Ashbya, Candida, Debaryomyces, Endomyces, Eremothecium, Hanseniaspora, Hansenula, Klueckera, Kluyveromyces, Lipomyces, Metschnikowia, Pullularia, Saccharomyces, Saccharomycopsis, Saccharomycodes, Schizosaccharomyces, Selenozyma, Trigonopsis, Wickerhamia</i>
B	Strain (株) によって DNA 調製が困難な酵母 (属)	<i>Bretanomyces, Cryptococcus, Nadsonia, Pichia, Rodosporidium, Schwanniomyces, Stephanoascus, Torulopsis</i>
C	DNA 調製が困難な酵母 (属)	<i>Bullera, Pityrosporum, Rhosotorula, Sporidiobolus, Sporobolomyces, Stetigmatomyces, Trichosporon</i>

I. キットの内容 (30 回用)

- | | |
|---|-------|
| 1. GenTLE Yeast Solution A * ^{1,2} | 15 ml |
| 2. GenTLE Yeast Solution B * ³ | 3 ml |
| 3. GenTLE Yeast Solution C | 6 ml |
| 4. TE Buffer | 6 ml |

* 1 : GenTLE Yeast Solution A は酵素を含みます。過剰な攪拌など酵素が失活するような操作を加えないでください。

* 2 : GenTLE Yeast Solution A に酵母細胞壁分解酵素として含まれる Zymolyase-100T には、菌類由来の微量 DNA の混入が報告されています*。使用目的によってはご注意ください。

* : 日本医真菌学会雑誌, (2009), **50**, No. 4, 259-262

* 3 : GenTLE Yeast Solution B に沈殿が生じていた場合は、37°C で加温し、沈殿を完全に溶解した後で使用ください。

II. キット以外に必要な試薬、器具

- ・遠心分離機
- ・イソプロパノール
- ・70%エタノール
- ・各種チューブ
- ・恒温槽 (37°Cインキュベート用)
- ・ヒートブロック (70°C加熱用)

III. 保存

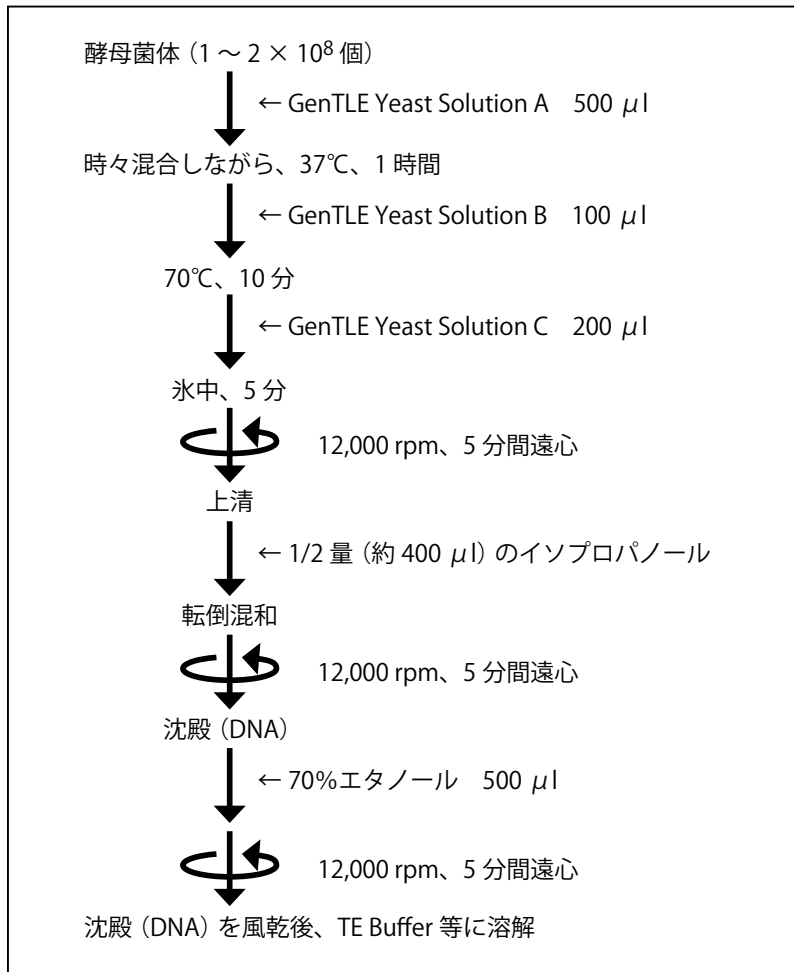
4°C

GenTLE Yeast Solution Bのみ室温で保存できます。低温で保存した場合、沈殿が析出する場合があります。沈殿が生じた場合は、37°Cで加温し、沈殿を完全に溶解した後ご使用ください。

IV. 操作方法

1. $1 \sim 2 \times 10^8$ 個の酵母菌体を含む培養液をマイクロチューブに分注し、12,000 rpmで1分間遠心する。
2. 上清をマイクロピペット等で丁寧にできるだけ取り除く。
3. 菌体沈殿に GenTLE Yeast Solution A を 500 μ l 加え、vortex により懸濁した後、37°Cで1時間、時々混合しながらインキュベートする。
4. GenTLE Yeast Solution B を 100 μ l 加え、vortex により穏やかに混合した後、70°Cで10分間加熱する。
5. GenTLE Yeast Solution C を 200 μ l 加え、vortex により穏やかに混合した後、氷中で5分間冷やす。
6. 4°Cで12,000 rpm、5分間遠心する。
7. 沈殿を吸わないよう、上清を注意深く新しいマイクロチューブに移し、回収した液量の1/2量(約400 μ l)のイソプロパノールを加え、転倒混和により十分に混合する。
8. 4°Cで12,000 rpm、5分間遠心し、上清を捨てる。
9. 500 μ lの70%冷エタノールによりDNAの沈殿を洗浄し、再度4°Cで12,000 rpm、5分間遠心する。
10. マイクロピペット等で上清を十分取り除き、DNAの沈殿を風乾する。
11. 適量のTE Bufferあるいは以降の実験に適した溶液に溶解する。

V. 操作フロー



VI. 実験例： *Saccharomyces cerevisiae* (Y187 株、AH109 株) からのゲノム DNA 調製

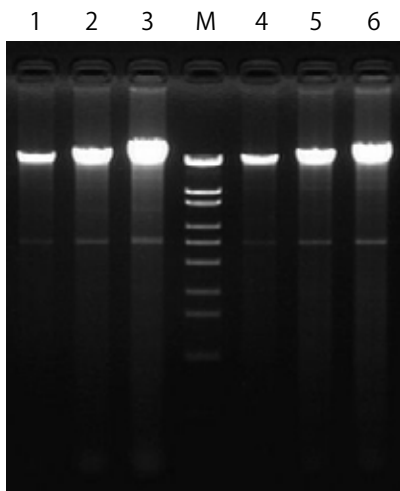
【方法】

S. cerevisiae (Y187、AH109) の培養液 (YPD 培地、 $OD_{600} \approx 3$) 1、2、3 ml より遠心により菌体沈殿を回収し*、キットプロトコールに従いゲノム DNA を調製した。

*：液量が 2、3 ml の場合は、複数回に分けて同一のマイクロチューブで遠心を行った。

【結果】

酵母菌体量依存的に OD_{260}/OD_{280} の値が 1.6 を超えるゲノム DNA が効率良く調製できました。



S. cerevisiae (Y187、AH109) からのゲノム DNA 抽出結果

回収量の 1/20 量を電気泳動

M： λ -EcoT14I digest 50 ng

lane 1, 2, 3：Y187 培養液 1、2、3 ml

lane 4, 5, 6：AH109 培養液 1、2、3 ml

VII. トラブルシューティング

1. DNA の収量が低い、DNA が得られない

- 使用した酵母菌体量が多い

1～2×10⁸ より多い酵母菌体を使用した場合、GenTLE Yeast Solution A による細胞壁分解が不十分となり、DNA 調製量が低下する場合があります。

1～2×10⁸ よりも多い酵母菌体を用いて一度に DNA 調製を行う必要がある場合は、菌体量を目安に「IV. 操作方法」記載の方法をスケールアップして DNA 調製を行ってください。

- 使用した酵母菌体量が少ない

1～2×10⁸ より著しく少ない酵母菌体から DNA を調製した場合、酵母菌体量当たりの DNA 回収率は低下します。安定した DNA 回収率で DNA を回収するためには記載の酵母菌体量付近から DNA 調製を行ってください。

- 本キットに適さない酵母から DNA 調製を行った

本キットでは、GenTLE Yeast Solution A に含まれる酵素により、酵母細胞壁を分解することで DNA を抽出します。従って、本酵素で細胞壁を十分に分解できない酵母から DNA 調製を行うと、著しく調製量が低下する場合があります。2 ページの表で、ご使用の酵母から本キットを用いて DNA 調製が可能か確認してください。

- DNA の溶解が不十分

イソプロパノール沈殿後、風乾した DNA が溶解し難い場合には、TE Buffer を添加した後、室温で一晩穏やかに振とうするか、あるいは、65℃で1時間加熱して溶解してください。

2. 調製した DNA に RNA が混入していた

通常、本キットの工程を行うことで、RNA は除去できますが、酵母の種類や培養条件によっては十分に除去できない場合もあります。その場合は、必要に応じて RNase 処理を行ってください。

VIII. 関連製品

NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250)

IX. 注意

- 本製品は、研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Gen とるくんはタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

TakaRa テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社