

研究用

Takara

**Yeast Processing Reagent
(for total RNA preparation)**

説明書

Yeast Processing Reagent (for total RNA preparation) は、NucleoSpin RNA または RNAiso Plus を用いて酵母から高純度の total RNA を抽出する際に併用する前処理試薬です。本製品を用いた酵母菌体の前処理操作は、遠心による酵母菌体の洗浄と回収、Yeast Processing Enzyme Solution (細胞壁分解酵素) と Yeast Processing Buffer による酵母細胞壁の分解からなります。本製品では細胞壁分解酵素を利用して前処理を行うため、ガラスビーズや液体窒素を利用した煩雑な操作は必要ありません。また、NucleoSpin RNA と組み合わせて使用すれば有機溶剤も不要です。

本製品で前処理を行うことで、主な酵母 (*Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* 等) から、RNA 関連の一般的な各種遺伝子工学実験 (RT-PCR 等) に使用できる高純度の total RNA を調製できます。標準的な実験例の場合、 $2 \sim 5 \times 10^7$ の対数増殖期の新鮮な *Saccharomyces cerevisiae* 酵母菌体から $10 \sim 20 \mu\text{g}$ の高純度 total RNA が得られます。本製品は長時間培養した酵母菌体や、凍結酵母菌体からの total RNA 調製にも利用可能です。また、対数増殖期にある新鮮な酵母菌体からは、通常より反応時間を短縮して total RNA を調製することができます。

RNA 抽出試薬について

本製品は、NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250) または RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) と組み合わせてご使用ください。

他の RNA 抽出試薬との組み合わせについては、適合性を確認していません。

I. 内容 (20 回用)

1. Yeast Processing Buffer	1.6 ml
2. Yeast Processing Enzyme Solution *1	160 μl
3. RNase-free DNase I *2	120 μl
4. $10 \times$ DNase I Buffer *2	80 μl

* 1 : Yeast Processing Enzyme Solution 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 : RNAiso Plus での total RNA 調製時に必要に応じて使用します。

II. 保存

− 20℃

III. キット以外に必要な試薬、器具

- NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250) または RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)
- 遠心分離機
- 特級エタノール (> 99%)
- 氷冷滅菌精製水
- 各種チューブ
- 恒温槽 (30℃、37℃ インキュベート用)
- RNase-free 水
- 1 M DTT 溶液または 2-メルカプトエタノール (2-ME) *1
(2-ME は毒物ですので、取扱い・廃棄には注意してください。)
- クロロホルム *2
- イソプロパノール *2
- 96 ~ 100% エタノール *1
- 70% エタノール [RNase-free 水を用いて調製] *1
- 75% エタノール [RNase-free 水を用いて調製] *2

* 1 : NucleoSpin RNA での total RNA 調製時に使用します。

* 2 : RNAiso Plus での total RNA 調製時に使用します。

IV. 操作方法

- (1) $2 \sim 5 \times 10^7$ (1 倍体 *Saccharomyces cerevisiae* の場合) の酵母菌体*1 を含む培養液を遠心チューブに分注し、10,000 rpm、4℃で 2 分間遠心する。
 - * 1 : 対数増殖期にある新鮮な酵母菌体を使用してください。
 - * 1 : 長時間培養した酵母菌体や凍結保存酵母菌体ペレットからも RNA 調製は可能ですが、収量は低下する場合があります。また、培養状態や凍結状態、保存期間により得られる RNA の純度や質の低下が生じる場合があります。凍結状態での長期保存は推奨できません。
 - * 1 : 凍結酵母菌体ペレットを用いる場合は、凍結ペレットを氷上に取り出し、素早く下記操作(5)から行ってください。
- (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) 菌体沈殿に氷冷滅菌水を 1 ml 加え、ピペッティングにより懸濁した後、10,000 rpm、4℃で 2 分間遠心する。
- (4) 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。
- (5) Yeast Processing Buffer を 80 μ l 加え、ピペッティングにより穏やかに混合する。
- (6) Yeast Processing Enzyme Solution を 8 μ l 加え、ピペッティングにより穏やかに混合する。
- (7) 30℃で 30 分～1 時間*2、10～20 分毎に指で軽く弾いて(タッピング)混合しながらインキュベートする。
 - * 2 : 対数増殖期の新鮮な培養酵母菌体を用いた場合、37℃で 10 分間のインキュベートでも RNA 調製は可能です。しかし、RNA 収量は低下する場合があります。
 - * 2 : 酵母(属)や培養条件、菌体数によって最適な反応時間が異なる場合があります。その場合は予め処理時間の最適化をお勧めします。
 - * 2 : 凍結酵母菌体ペレットを用いる場合、反応条件は 30℃、10～30 分間としてください。
- (8) (7) で得られた酵母菌体反応液より NucleoSpin RNA または RNAiso Plus を用いて total RNA を調製する。

NucleoSpin RNA および RNAiso Plus は、各説明書のプロトコールを一部変更してご使用ください。変更部分は、本説明書の V. 操作フロー中の下線部分です。基本的なプロトコールの詳細は各説明書の下記の対象項も参照してください。

 - NucleoSpin RNA : 5 Protocols、section 5.1 の step 2-9
 - ※ DNase 処理には、NucleoSpin RNA に含まれる Reaction Buffer for rDNase と rDNase, RNase-free (lyophilized) をご使用ください。
 - RNAiso Plus : VI. 実験例および VII. RNA 抽出のフローチャート
 - ※ DNase I 処理が必要な場合、本製品に含まれる RNase -free DNase I と 10 \times DNase I Buffer をご使用ください。

RNA 抽出試薬について

本製品は、NucleoSpin RNA または RNAiso Plus と組み合わせてご使用ください。他の RNA 抽出試薬との組み合わせについては、適合性を確認していません。

V. 操作フロー

NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250) と組み合わせた場合

NucleoSpin RNA 取扱説明書：5 Protocols, section 5.1 の step 2-9 もご参照ください。
プロトコールの変更部分は下線で示しています。

前処理済み酵母菌体反応液

↓ ← Buffer RA1 (1 M DTT または 2-ME 添加済み*1) : 350 μ l
* 1 : 使用前に、必要量の Buffer RA1 を分注し、1 ml あたり、2-メルカプトエタノール (原液) 10 μ l または 1 M DTT を 20 μ l 添加。

2 ~ 3 分間ボルテックスし、ライセートを Collection Tube (2 ml) にセットした NucleoSpin Filter (violet ring) へ添加

↻ 11,000 \times g、1 分間遠心

ライセートを新しい 1.5 ml の遠心チューブに回収

↓ ← 70% エタノール : 350 μ l
ボルテックス (15 秒以上)、軽くスピンドウン (数秒)

ライセート完成

↓
数回ピペティングして Collection Tube (2 ml) にセットした NucleoSpin RNA Column (light blue ring) へ全量添加

注：ライセートが 750 μ l を超える場合は、2 回に分けて遠心操作を行ってください。各遠心操作で生じたろ液は廃棄します。(ライセート中に凝集物が生じた場合は、凝集物ごとカラムへ添加)

↻ 11,000 \times g、30 秒間遠心

↓
Collection Tube (2 ml) を交換

← MDB : 350 μ l

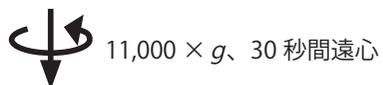
↻ 11,000 \times g、1 分間遠心

← 下記組成の DNase 溶液 95 μ l をカラムのメンブレンの中心へ添加 (NucleoSpin RNA 添付の rDNase にて必ず DNase 処理を実施)
Reaction Buffer for rDNase (90 μ l)
Reconstituted rDNase*2 (10 μ l)
* 2 : NucleoSpin RNA の取扱説明書に従って調製してください。

↓
室温で 15 分間、インキュベーション

↓ ← [1 st wash] Buffer RAW2 : 200 μ l
(次のページへ続く)

(前のページより)



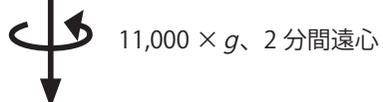
Collection Tube (2 ml) を交換

← [2 nd wash] Buffer RA3 (エタノール添加済) : 600 μl



flow-through を破棄

← [3 rd wash] Buffer RA3 (エタノール添加済) : 250 μl 添加



カラムを nuclease-free Collection Tube (1.5 ml) にセット

← RNase-free H₂O : 60 μl

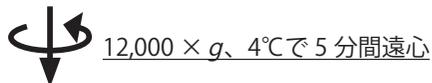


total RNA 回収

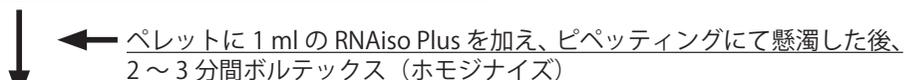
RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) と組み合わせた場合

RNAiso Plus 取扱説明書：V. 実験例および VI. RNA 抽出のフローチャートもご参照ください。
プロトコールの変更部分は下線で示しています。

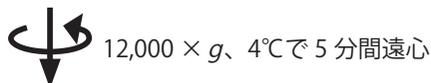
前処理済み酵母菌体反応液



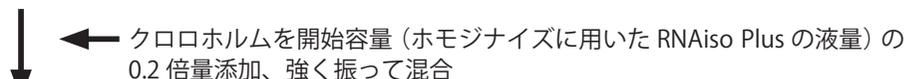
上清をマイクロピペット等で丁寧にできるだけ除去



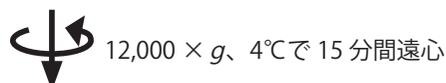
室温で5分間静置



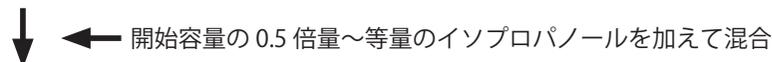
上清を新しい遠心チューブに回収



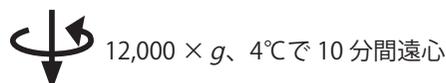
室温で5分間静置



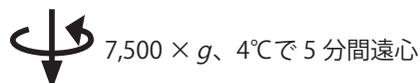
上層の水層を新しい遠心チューブに回収



室温で10分間静置



沈殿を残して上清を除き、75%エタノールを開始容量と等量加えて洗浄



沈殿を残して上清を除去



50 μl の RNase-free 水へ溶解

※ DNase I 処理が必要な場合は、本製品に含まれる RNase-free DNase I と 10 × DNase I Buffer を用いて DNase I 処理を行うことが可能です。操作方法は、VII. Appendix をご参照ください。

VI. 実験例

実験例 1

Saccharomyces cerevisiae (AH109 株) からの total RNA 調製 (NucleoSpin RNA を使用)

[方法]

S. cerevisiae (AH109 株) の一晩培養液 (YPD 培地、1 ml) よりキットプロトコールに従い total RNA を調製した。

[結果]

吸光度 260/280 nm の値が 2.0 を超える total RNA が効率良く調製できました (表 1、図 1)。

表 1. *S. cerevisiae* から調製した total RNA の収量と純度

使用キット	酵母菌体数	収量 (μg)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
NucleoSpin RNA	3.6×10^7	32.7	2.2



図 1. *S. cerevisiae* (AH109 株) からの total RNA 調製結果
0.5 μg を電気泳動 (レーン 1)
M : λ -*Hind* III digest 100 ng

実験例 2

S. cerevisiae (AH109 株) からの total RNA 調製 (RNAiso Plus を使用)

[方法]

S. cerevisiae (AH109 株) の一晚培養液 (YPD 培地、1 ml) よりキットプロトコールに従い total RNA を調製した。

[結果]

吸光度 260/280 nm の値が 2.0 を超える total RNA が効率良く調製できました (表 2、図 2)。

表 2. *S. cerevisiae* から調製した total RNA の収量と純度

使用キット	酵母菌体数	収量 (μg)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
RNAiso Plus	4.8×10^7 個	57.4	2.2



図 2. *S. cerevisiae* (AH109 株) からの total RNA 調製結果
0.5 μg を電気泳動 (レーン 1)
M : λ -EcoT14I digest 100 ng

VII. Appendix

DNase I 処理によるゲノム DNA の除去

RNAiso Plus で調製した total RNA は、必要に応じて下記の方法で DNase I 処理を行ってください。

操作手順

1. 以下の反応液を調製する。

試薬	使用量
total RNA	20 ~ 50 μ g
10 × DNase I Buffer*1	5 μ l
RNase-free DNase I*1	2 μ l
RNase Inhibitor*2	20 U
RNase-free 水	50 μ l に fill up

* 1：本製品に添付されている試薬がそのまま使用できます。Recombinant DNase I (RNase-free) (製品コード 2270A) も使用できます。

* 2：別途、Recombinant RNase Inhibitor (製品コード 2313A) が必要です。

2. 37℃ で 20 ~ 30 分間反応する。
3. 以下のいずれかの方法で DNase I を失活させる。
 - A. 熱処理
 - (1) 2.5 μ l の 0.5M EDTA を加えて、80℃ で 2 分間インキュベートする。
 - (2) RNase-free 水で 100 μ l に fill up する。
 - B. フェノール/クロロホルム抽出
 - (1) 50 μ l の RNase-free 水と 100 μ l のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加えて混合する。
 - (2) 室温、12,000 rpm で 5 分間遠心し、上層を新しいチューブに移す。
 - (3) 等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を加えて混合する。
 - (4) 室温、12,000 rpm で 5 分間遠心し、上層を新しいチューブに移す。
4. 10 μ l の 3 M 酢酸ナトリウムと 250 μ l の冷エタノールを加えて -80℃ で 20 分間静置する。
5. 4℃、12,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を捨てる。
6. 70% エタノールで沈殿を洗浄し、4℃、12,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨てる。
7. 沈殿を乾燥する。
8. 適当量の RNase-free 水に溶解後、電気泳動によりゲノム DNA が除去できたことを確認し、濃度を測定する。(ゲノム DNA が完全に除去できていない場合は、DNase I の量を増やすか、反応時間を延ばして再度行う。)

VIII. トラブルシューティング

1. 調製した total RNA 量が少ない。

- 使用した酵母菌体量が多い。
2 ~ 5 × 10⁷ (*Saccharomyces cerevisiae* の場合) より多い酵母菌体を使用した場合、Yeast Processing Enzyme Solution に含まれる酵素による細胞壁分解が不十分となり、total RNA 調製量が低下する場合があります。処理可能な酵母菌体量を使用してください。酵母 (属) によって処理可能な最適菌体数が異なる場合があります。その場合は予め処理菌体数の最適化を行ってください。
- 使用した酵母菌体量が少ない。
2 ~ 5 × 10⁷ (*Saccharomyces cerevisiae* の場合) より著しく少ない酵母菌体から total RNA を調製した場合、total RNA の収量や純度が低下します。安定した回収率で total RNA を回収するためには記載の酵母菌体量付近から total RNA 調製を行ってください。酵母 (属) によって処理可能な最適菌体数が異なる場合があります。その場合は予め処理菌体数の最適化を行ってください。
- 本製品に適さない酵母から total RNA 調製を行った。
本製品では、Yeast Processing Enzyme Solution に含まれる酵素により、酵母細胞壁を分解します。従って、本酵素で細胞壁を十分分解できない酵母を処理した場合、著しく total RNA 調製量が低下する場合があります。
- total RNA の溶解が不十分。
RNAiso Plus で total RNA を調製する場合、75%エタノールによる洗浄後、乾燥させすぎると溶解が困難になります。加熱乾燥したり、乾燥時間が長過ぎたりしないよう注意してください。溶解が困難な場合、60℃で5分間加熱した後、氷上に数時間おくことで溶解する場合があります。

2. 調製した total RNA に分解傾向が確認された。

- 酵母 (属) や培養条件、使用するサンプルの状態 (対数増殖期にある新鮮な酵母菌体、長時間培養酵母菌体、凍結保存酵母菌体ペレット等) によって前処理の最適時間が異なる場合があります。その場合は予め処理時間の最適化を行ってください。
- 特に凍結酵母菌体ペレットをサンプルとして使用する場合、凍結状態や保存期間によって total RNA の質や純度に影響が出る可能性が高くなります。その場合は、対数増殖期にある新鮮な酵母菌体を準備してください。凍結状態での長期保存は推奨できません。

3. 調製した total RNA にゲノム DNA が混入していた。

NucleoSpin RNA にて total RNA を調製する場合、必ず NucleoSpin RNA に添付されている Reaction Buffer for rDNase および Reconstituted rDNase* を用いてカラム上で DNase I 処理を行ってください。(* NucleoSpin RNA の取扱説明書に従って調製してください。) ただし、カラム上で DNase I 処理を行った場合でも、酵母 (属) や培養条件、処理可能な酵母菌体数以上を処理した場合には、ゲノム DNA の混入が多くなる場合があります。また、RNAiso Plus で total RNA を調製する場合、水層の回収具合によってはゲノム DNA が混入する場合があります。これらの場合は、必要に応じて DNase I 処理を行ってください。操作方法については、VII. Appendix をご参照ください。

4. その他、NucleoSpin RNA または RNAiso Plus の取扱説明書内のトラブルシューティングもご参照ください。

IX. 関連製品

NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250)
RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)
Oligotex-dT30<Super> mRNA Purification Kit (From Total RNA) (製品コード 9086)
Gen とるくん™ (酵母用) High Recovery (製品コード 9082)
Recombinant DNase I (RNase-free) (製品コード 2270A/B)
Recombinant RNase Inhibitor (製品コード 2313A/B)

X. 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
テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995
ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社