

酵母からのRNA抽出を検討しました ～Zymolyaseの反応時間の検討～

[目的]

Zymolyase™-20T (from *Arthrobacter luteus*)で前処理することで酵母から簡単にRNAを抽出できるか検討した。

[材料]

- Zymolyase buffer (0.9M Sorbitol, 0.1M EDTA, 50mM DTT(pH7.5)) を調製した。
調製後は0.2μmフィルター濾過による滅菌を実施した。
- 酵素 (Zymolyase) 溶液：Zymolyase bufferを用いて、10 mg / mL, 20mg / mL, 40 mg / mLの酵素溶液を調製した。
調整後は0.2 μmフィルター濾過による滅菌を実施した。

[方法]

1.5 mLチューブ5本分のドライイースト[*Saccharomyces cerevisiae*]にmilliQ水を加え、全量で3.2mLとした後に1.5 mLチューブ16本に均等分取し、遠心 (13,000 * g, 4℃, 5min.) し上清を除去した。
0 mg / mL, 10 mg / mL, 20 mg / mL, 40 mg / mLの酵素溶液を4本ずつ各100 μL添加しピペティングにて溶解した。
37℃のインキュベータに10min., 30min., 1hour., 2hours. 静置した。
*インキュベート中は時々タッピングした。

ISOSPIN Plant RNA を使用して、500 μLのExtraction bufferを添加してよく混ぜた後に-80℃に保存した。
以降はISOSPIN Plant RNAの標準プロトコールでRNA抽出を実施した。

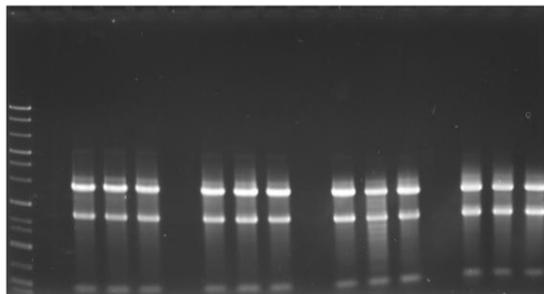
[結果]

吸光度測定 50 μLのmilliQ水に溶解したRNAサンプルを用いて、吸光度測定を実施した。

反応時間	酵素量	RNA濃度	A260/A280	A260/A230
10分	0 mg/ml	0.2 ng/μL	-0.73	0.46
	10 mg/ml	800.0 ng/μL	2.26	2.42
	20 mg/ml	977.7 ng/μL	2.25	2.40
	40 mg/ml	707.0 ng/μL	2.27	2.46
30分	0 mg/ml	0.6 ng/μL	1.01	0.57
	10 mg/ml	999.6 ng/μL	2.27	2.38
	20 mg/ml	1021.1 ng/μL	2.28	2.41
	40 mg/ml	1057.4 ng/μL	2.26	2.41

反応時間	酵素量	RNA濃度	A260/A280	A260/A230
1時間	0 mg/ml	0.5 ng/μL	0.43	0.36
	10 mg/ml	1179.5 ng/μL	2.27	2.35
	20 mg/ml	1146.3 ng/μL	2.27	2.40
	40 mg/ml	1153.6 ng/μL	2.27	2.35
2時間	0 mg/ml	0.5 ng/μL	0.51	0.44
	10 mg/ml	1257.5 ng/μL	2.28	2.29
	20 mg/ml	1050.1 ng/μL	2.29	2.38
	40 mg/ml	981.1 ng/μL	2.31	2.43

電気泳動結果 酵素量が0 mg/mLのサンプルは10 μLをアプライした。それ以外は、各500 ng分をアプライした。



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

No	反応時間	酵素量	No	反応時間	酵素量
1	10分	0 mg/ml	9	1時間	0 mg/ml
2		10 mg/ml	10		10 mg/ml
3		20 mg/ml	11		20 mg/ml
4		40 mg/ml	12		40 mg/ml
5	30分	0 mg/ml	13	2時間	0 mg/ml
6		10 mg/ml	14		10 mg/ml
7		20 mg/ml	15		20 mg/ml
8		40 mg/ml	16		40 mg/ml

M : Gene Ladder Wide 1 (0.1-20 kbp) 3 μL
0.8% Agarose S/TAE buffer

[結論]

Zymolyaseを併用することで、キット単品よりも効率よくドライイースト[*Saccharomyces cerevisiae*]からRNA抽出ができた。

酵母からのRNA抽出を検討しました ～Zymolyaseの添加量の検討～

[目的]

Zymolyase™-20T (from *Arthrobacter luteus*)で前処理することで酵母から簡便にRNAを抽出できるか検討した。

[材料]

○Zymolyase buffer (0.9M Sorbitol, 0.1M EDTA, 50mM DTT(pH7.5)) を調製した。

調製後は0.2uMフィルター濾過による滅菌を実施した。

○酵素 (Zymolyase) 溶液 : Zymolyase bufferを用いて、10 mg / mL, 20mg / mL, 40 mg / mLの酵素溶液を調製した。

調整後は0.2uMフィルター濾過による滅菌を実施した。

[方法]

1.5 mLチューブ1本分のyeastにmilliQ水を加え、全量で800 μ Lとした後に1.5 mLチューブ4本に均等分取し、遠心 (13,000 * g, 4°C, 5min.) して上清を除去した。

*1/3本分でも十分量のRNAが得られていたため、今回は1/4本分とした。

10 μ g / mL, 100 μ g / mL, 1 mg / mL, 10 mg / mLの酵素溶液を各100 μ L添加しピペティングにて溶解し、37°Cのインキュベータに10min. 静置した。

[結果]

吸光度測定 50 μ LのmilliQ水に溶解したRNAサンプルを用いて、吸光度測定を実施した。

反応時間	酵素量	RNA濃度	A260/A280	A260/A230
10分	10 μ g/ml	1.0 ng/ μ L	2.14	0.30
	100 μ g/ml	1.7 ng/ μ L	2.22	0.72
	1 mg/ml	16.5 ng/ μ L	2.16	2.19
	10 mg/ml	508.6 ng/ μ L	2.36	2.62

[結論]

10 mg/mlのZymolyaseを併用することで、キット単品よりも効率よくドライイースト [*Saccharomyces cerevisiae*]からRNA抽出ができた。