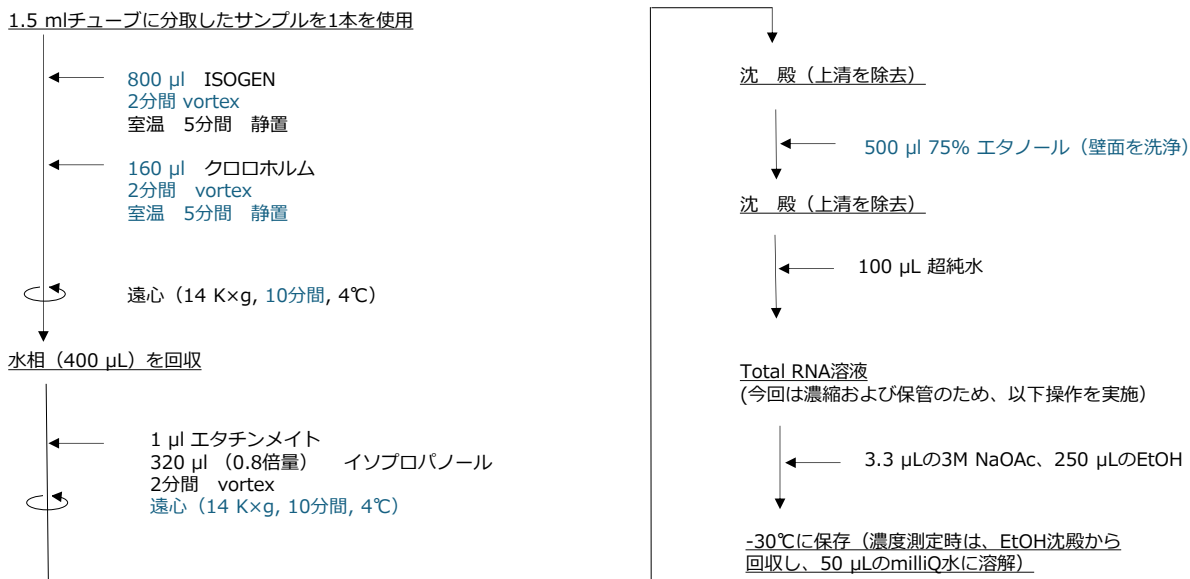


「酵母からのRNA抽出を検討しました」 ～各キットを使用したRNA抽出方法～

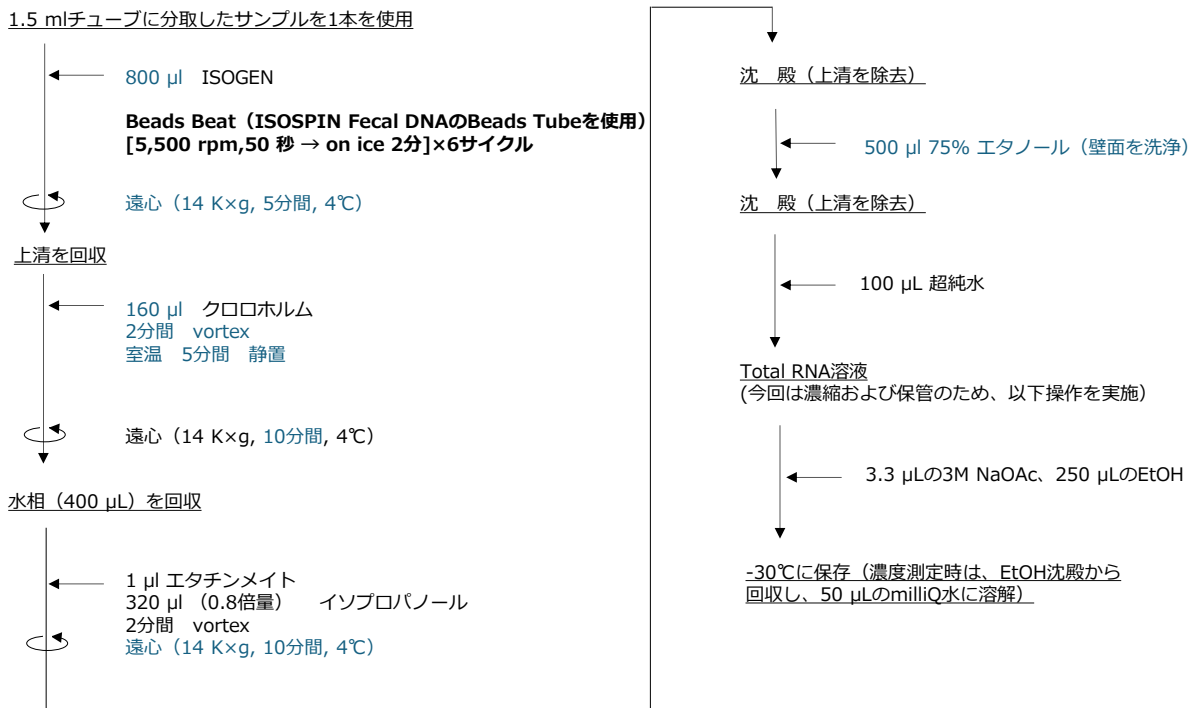
(1) ISOGEN

※青字はISOGEN, ISOGEN-LS簡易マニュアル（第2版）1608-1807と異なる点



(2) ISOGEN+Beads Beat

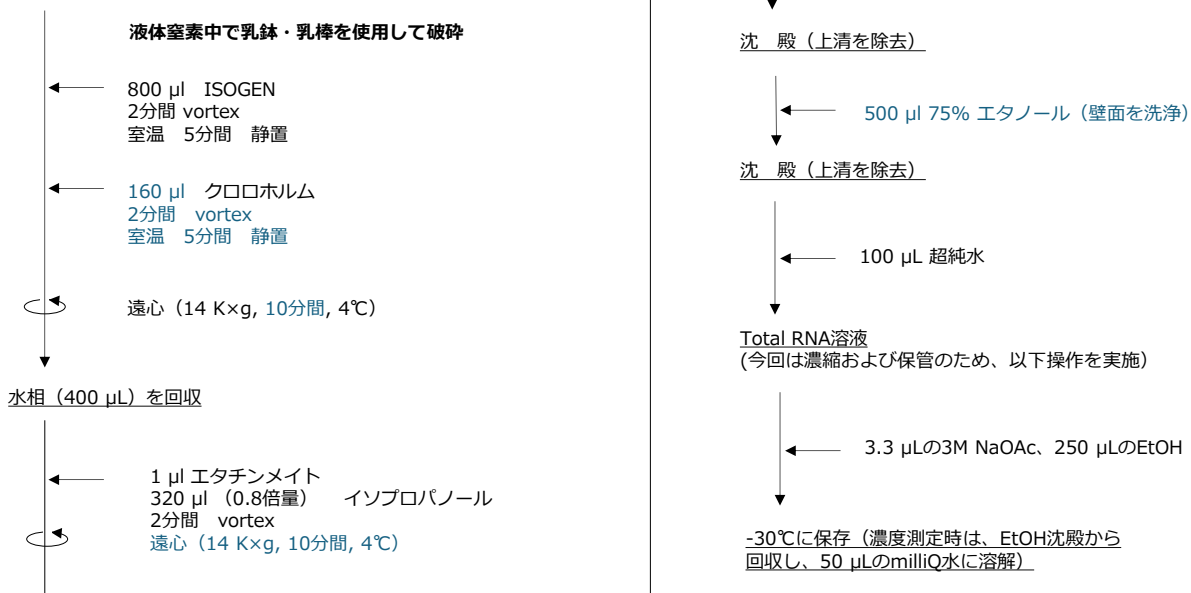
※青字はISOGEN, ISOGEN-LS簡易マニュアル（第2版）1608-1807と異なる点



(3) ISOGEN+液体窒素

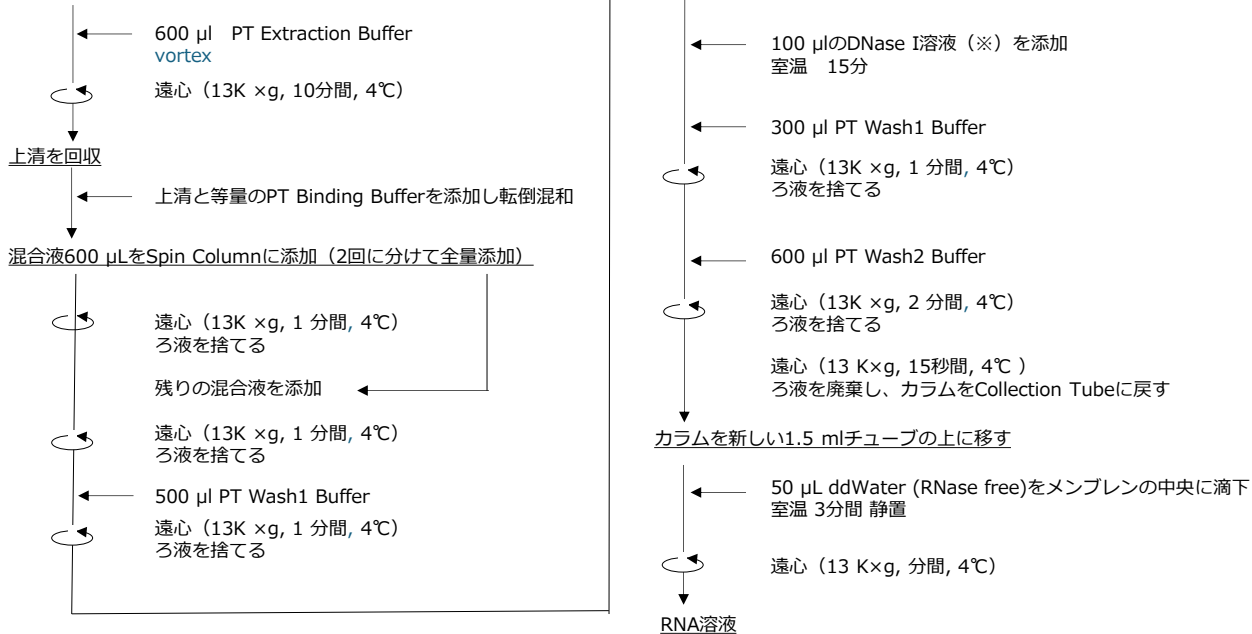
※青字はISOGEN, ISOGEN-LS簡易マニュアル（第2版）1608-1807と異なる点

1.5 mlチューブに分取したサンプルを1本を使用

**(4) ISOSPIN Plant RNA**

※青字はISOSPIN Plant RNAマニュアル (WEB 版) と異なる点

1.5 mlチューブに分取したサンプルを1本を使用



※DNase I溶液 (用時調整) 全量 100 μl

- ddWater (RNase free)
- 10 × DNase I Buffer
- DNase I (RNase free)

(5) ISOSPIN Plant RNA + Beads Beat ※青字はISOSPIN Plant RNAマニュアル（WEB 版）と異なる点

1.5 mlチューブに分取したサンプルを1本を使用

← 600 μ l PT Extraction Buffer
Beads Beat (ISOSPIN Fecal DNAのBeads Tubeを使用)
[5,500 rpm, 50 秒 → on ice 2分] × 6サイクル
 遠心 (13K \times g, 10分間, RT)

上清を回収

← 上清と等量のPT Binding Bufferを添加し転倒混和

混合液600 μ LをSpin Columnに添加 (2回に分けて全量添加)

遠心 (13K \times g, 1 分間, 4 $^{\circ}$ C)
 ろ液を捨てる

← 残りの混合液を添加

遠心 (13K \times g, 1 分間, 4 $^{\circ}$ C)
 ろ液を捨てる

← 500 μ l PT Wash1 Buffer

遠心 (13K \times g, 1 分間, 4 $^{\circ}$ C)
 ろ液を捨てる

※DNase I溶液 (用時調整) 全量 100 μ l
 • ddWater (RNase free)
 • 10 \times DNase I Buffer
 • DNase I (RNase free)

← 100 μ lのDNase I溶液 (※) を添加
 室温 15分

← 300 μ l PT Wash1 Buffer

遠心 (13K \times g, 1 分間, 4 $^{\circ}$ C)
 ろ液を捨てる

← 600 μ l PT Wash2 Buffer

遠心 (13K \times g, 2 分間, 4 $^{\circ}$ C)
 ろ液を捨てる

遠心 (13 K \times g, 15秒間, 4 $^{\circ}$ C)
 ろ液を廃棄し、カラムをCollection Tubeに戻す

カラムを新しい1.5 mlチューブの上に移す

← 50 μ l ddWater (RNase free)をメンブレンの中央に滴下
 室温 3分間 静置

遠心 (13 K \times g, 分間, 4 $^{\circ}$ C)

RNA溶液

(6) ISOSPIN Plant RNA + 液体窒素 ※青字はISOSPIN Plant RNAマニュアル（WEB 版）と異なる点

1.5 mlチューブに分取したサンプルを1本を使用

液体窒素中で乳鉢・乳棒を使用して破砕

← 600 μ l PT Extraction Buffer
 vortex

遠心 (13K \times g, 10分間, 4 $^{\circ}$ C)

上清を回収

← 上清と等量のPT Binding Bufferを添加し転倒混和

混合液600 μ LをSpin Columnに添加 (2回に分けて全量添加)

遠心 (13K \times g, 1 分間, 4 $^{\circ}$ C)
 ろ液を捨てる

← 残りの混合液を添加

遠心 (13K \times g, 1 分間, 4 $^{\circ}$ C)
 ろ液を捨てる

← 500 μ l PT Wash1 Buffer

遠心 (13K \times g, 1 分間, 4 $^{\circ}$ C)
 ろ液を捨てる

※DNase I溶液 (用時調整) 全量 100 μ l
 • ddWater (RNase free)
 • 10 \times DNase I Buffer
 • DNase I (RNase free)

← 100 μ lのDNase I溶液 (※) を添加
 室温 15分

← 300 μ l PT Wash1 Buffer

遠心 (13K \times g, 1 分間, 4 $^{\circ}$ C)
 ろ液を捨てる

← 600 μ l PT Wash2 Buffer

遠心 (13K \times g, 2 分間, 4 $^{\circ}$ C)
 ろ液を捨てる

遠心 (13 K \times g, 15秒間, 4 $^{\circ}$ C)
 ろ液を廃棄し、カラムをCollection Tubeに戻す

カラムを新しい1.5 mlチューブの上に移す

← 50 μ l ddWater (RNase free)をメンブレンの中央に滴下
 室温 3分間 静置

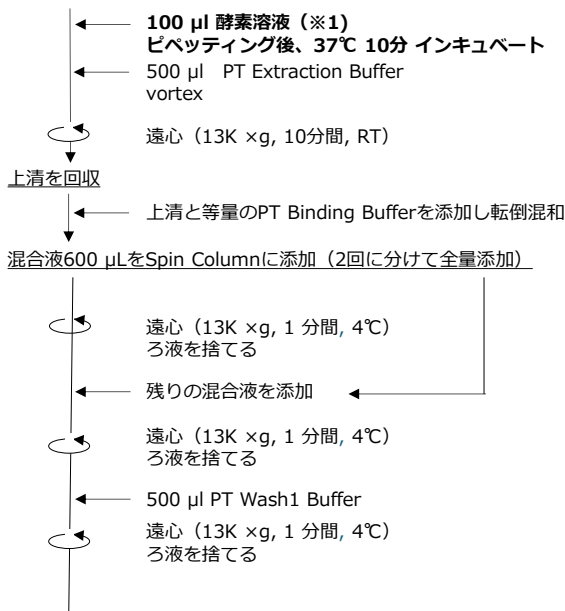
遠心 (13 K \times g, 分間, 4 $^{\circ}$ C)

RNA溶液

(7) ISOSPIN Plant RNA+酵素 (Zymolyase、反応時間 10分)

※青字はISOSPIN Plant RNAマニュアル (WEB 版) と異なる点

1.5 mlチューブに分取したサンプルを1本を
4分割もしくは3分割し使用

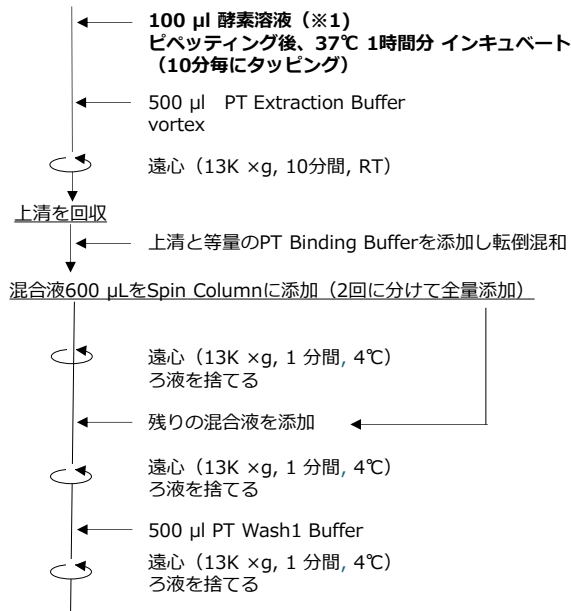


※1 酵素溶液 100 µl
Zymolyase buffer (0.9M Sorbitol, 0.1M EDTA, 50mM DTT(pH7.5)、調製後は0.2µMフィルター濾過) を用いて、Zymolyase™-20T (from *Arthrobacter luteus*)を10 mg / mLの濃度に調整

※2 DNase I溶液 (用時調整) 全量 100 µl
・ ddWater (RNase free)
・ 10 x DNase I Buffer
・ DNase I (RNase free)

(8) ISOSPIN Plant RNA+酵素 (Zymolyase、反応時間 1時間)

1.5 mlチューブに分取したサンプルを1本を
4分割もしくは3分割し使用



※1 酵素溶液 100 µl
Zymolyase buffer (0.9M Sorbitol, 0.1M EDTA, 50mM DTT(pH7.5)、調製後は0.2µMフィルター濾過) を用いて、Zymolyase™-20T (from *Arthrobacter luteus*)を10 mg / mLの濃度に調整

※2 DNase I溶液 (用時調整) 全量 100 µl
・ ddWater (RNase free)
・ 10 x DNase I Buffer
・ DNase I (RNase free)