

分裂酵母からの RNA の抽出には、ホットフェノール法 (A) もしくは ISOGEN 法 (B) を使用する。また、ホットフェノール法を用いた場合の集菌方法として、一般的な遠心法他にフィルター法も紹介する。フィルター法は遠心による細胞へのストレスや夾雑物を除きたい場合に有効と思われる。

RNA を扱う際には手袋を着用し、チューブ、チップ、水、その他必要な試薬類等は、RNA 専用としたものを用意すること。なるべくチリ、ホコリがないところで実験すること。

#### A. RNA 抽出方法 1 (ホットフェノール法)

##### 集菌方法 1 (遠心法)

###### ◆ プロトコール ◆

1. 20~30 ml の YES あるいは適切な合成培地中、 $5\sim 8 \times 10^6$  cells/ml まで細胞を培養する。
2. 50ml のコニカルチューブに移す。
3. 3,000 rpm、2 分間遠心し、ペレットを液体窒素により凍結する (ただちに使用しない場合は  $-80^\circ\text{C}$  以下の冷凍庫で保存)。
4. RNA 抽出方法 (ホットフェノール法) のステップ 1 へ進む。

##### 集菌方法 2 (フィルター法)

###### ◆ 必要な物品 ◆

フィルターユニット (NALGENE/524-0020, 0.2 $\mu\text{m}$ )  
ディスクフィルター (ミリポア/GSWP047XX, 0.22 $\mu\text{m}$ )  
ピンセット (オートクレーブ済み)  
ディスクポスティック (アズワン/1-4633-13)

###### ◆ プロトコール ◆

1. 20~30 ml の YES あるいは適切な合成培地中、 $5\sim 8 \times 10^6$  cells/ml まで細胞を培養する。
2. フィルターユニットのフィルターの中央部にピンセットで直径 2~3cm の穴をあける。
3. ディスクフィルターをのせる。
4. ディスクフィルターに 1~2ml の培地を垂らして染み込ませる。
5. アスピレーターに接続し、バキューム。フィルターを密着させる。
6. バキュームの状態で 20~30ml の培養液をフィルターの中央部にガラスピペットで垂らしていく。この時、フィルターの外側に培養液が溢れないように注意する。
7. 実験台にサランラップを敷き、その上にディスクフィルターを移す。(サランラップの代わりにフィルターユニットの蓋の内側を使用してもよい)
8. ディスクポスティックでディスクフィルター上の細胞をかき取り、1.5ml のマイクロチューブに入れる (集菌時の細胞のロスは 1~2 割)。
9. 液体窒素で凍結する (ただちに使用しない場合は  $-80^\circ\text{C}$  以下の冷凍庫で保存)。
10. RNA 抽出方法 (ホットフェノール法) のステップ 3 に進む。

## RNA 抽出方法 (ホットフェノール法)

### ◆ 必要な試薬類 ◆ \*RNA 専用としたものを用いる

Acidic phenol-chloroform (pH 5.2)

Chloroform\*

3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) \*

### ◆ 調整する試薬 ◆

TES

10mM Tris pH7.5; 10mM EDTA pH8.0; 0.5% SDS

フィルター滅菌

### ◆ 必要な物品 ◆

phase-lock tube (QIAGEN/Maxtract™ High Density, 2ml/129056)

### ◆ プロトコール ◆

1. 細胞を氷上に置き、あらかじめ氷冷しておいた 1ml の滅菌水に懸濁後、1.5ml のマイクロチューブに移す。
2. 5,000 rpm、4°Cで 10 秒間遠心し、上清をのぞく。
3. 細胞を氷上に置き、520  $\mu$ l の TES に懸濁する。
4. 等量 (520  $\mu$ l) の acidic phenol-chloroform を加えて激しく振り混ぜ、ただちに 65°Cでインキュベートする (10 分置きに振り混ぜながら 1 時間インキュベート)。
5. 氷上にて 1 分間放置後、再び激しく振り混ぜたのち、14,000 rpm、4°Cで 15 分間遠心する。
6. あらかじめスピンドウン (14,000 rpm、10 秒間) して 500  $\mu$ l の acidic phenol-chloroform を入れておいた phase-lock tube に、水層 500  $\mu$ l をうつす。
7. 激しく振り混ぜたのち (ゲルは混ざらない)、14,000 rpm、4°Cで 5 分間遠心する。
8. 6 と同様にスピンドウンした phase-lock tube に水層 500  $\mu$ l を移し、後から 500  $\mu$ l の chloroform (分注して氷冷しておく) を入れる。
9. 激しく振り混ぜたのち、14,000 rpm、4°Cで 5 分間遠心する。
10. 新しい 2ml のマイクロチューブに 50  $\mu$ l の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)、1.5 ml の 100% EtOH (あらかじめ-30°Cで冷却しておく) を入れる。
11. 10 で用意した 2ml のチューブに 9 の水層 500  $\mu$ l を加えて混合し、-80°Cで一時間以上放置する (この時、純度検定用に一部 (100~200 $\mu$ l 程度) を 1.5ml のチューブに分注しておく) と良い。
12. 14,000 rpm、4°Cで 10 分間遠心後、沈澱を 500  $\mu$ l の 70% EtOH で洗浄する (14,000 rpm、4°Cにて 1 分間遠心)。
13. 上清をできるだけ除き、沈澱に 100  $\mu$ l の H<sub>2</sub>O を加え 10 分間放置する。
14. ピペッティングにより沈澱をよく溶解させる。

ステップ 4 で acidic phenol-chloroform を加えるまでは、とにかく手早く行う。

ステップ 6 で phase-lock tube にあらかじめ chloroform を入れておくことは避ける。ゲルが chloroform に弱く、時間が経つと溶けてくるため。

ステップ 11 で-80°Cで二か月程度保存出来るが、長く保存した場合は使用前に純度検定した方が良い。

このプロトコールで、 $1 \times 10^8$  細胞から 0.3mg 程度の total RNA が得られる (YES 培地の場合)。また、得られた RNA の  $OD_{260}/OD_{280}$  は、1.9 以上となる。

## B. RNA 抽出方法 2 (ISOGEN 法)

### ◆ 必要な試薬類 ◆ \*RNA 専用としたものを用いる

ISOGEN (ニッポンジーン)

Zymolyase-100T

2-propanol\*

Chloroform\*

3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) \*

### ◆ 調整する試薬 ◆

BufferA

1M sorbitol; 100mM EDTA

オートクレーブし、使用前に 2-mercaptoethanol を x1000 で加える

Zymolyase-100T solution

10ng/ml になるように BufferA に懸濁

Suspension の状態で使用

### ◆ プロトコール ◆

1. 50ml の YES あるいは適切な合成培地中、 $5 \sim 8 \times 10^6$  cells/ml まで細胞を培養する。
2. 3,000 rpm、5 分間遠心し、ペレットを 1ml の TE に懸濁、1.5ml マイクロチューブに移す。
3. 3,000rpm、5 分間遠心し、ペレットを 1ml の 200 $\mu$ l の BufferA に懸濁する。
4. Zymolyase-100T solution を 20 $\mu$ l 加え、30 $^{\circ}$ C で 30 分間回転させながらインキュベートする。
5. 3000rpm、4 $^{\circ}$ C で 3 分間遠心し、ペレットを 1ml の ISOGEN に懸濁する。
6. 室温にて 5 分間インキュベートする。(この状態で -80 $^{\circ}$ C で一ヶ月間保存可能)
7. 200 $\mu$ l の Chloroform を加え、15 秒間激しく振り混ぜる。
8. 室温にて 3 分間インキュベートする。
9. 12,000 xg、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心する。
10. 水層を新しいチューブにとり (約 500 $\mu$ l)、500 $\mu$ l の 2-propanol を加える。
11. 室温にて 5~10 分間インキュベート後、12,000 xg、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心する。
12. 沈殿に 1ml の 70%Ethanol を加え、7500xg、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心する。
13. 沈殿を 100 $\mu$ l の DW または TE に溶解する。

得られた RNA の  $OD_{260}/OD_{280}$  は、1.9 以上となる。