

核酸結合 (NAB) ナノセップ遠心ろ過デバイスを用いた酵母 (*Saccharomyces Cerevisiae*) からゲノムDNAとRNAの柔軟かつ高品質に精製する方法

Sarat Bimanadham and Nadia Kadi

ポールコーポレーション, マサチューセッツ州ウェストボロー

はじめに

酵母は菌類に属するものの、植物や動物などの多細胞真核生物と共通の細胞構造や基本的な生活環を有しています。酵母は相互組み換え率を有し、染色体外のDNAの要素が多数存在するため安定的に形質転換された酵母細胞を得ることができます¹。

出芽酵母 *S. cerevisiae* は、真核生物の遺伝学の多用途かつ安定したモデルシステムとして登場しました。1996年に発表された出芽酵母 *S. cerevisiae* のゲノム配列は、真核生物から初めて完全に解読されたゲノムでした。短い遺伝子間領域かつ、そのコンパクトなサイズで少ないイントロンによる遺伝的冗長性の低さから遺伝子機能研究の解析において理想的なモデルです¹。このような理想的なモデルである酵母のポテンシャルを研究に最大限に活用するためには、さらなる研究の出発点として、酵母の高品質なDNAとRNAを抽出・精製する必要があります。

ポールのNABナノセップ遠心ろ過デバイスは、適切なバッファーを使用することで様々なソースからゲノムDNA (gDNA) やRNA、プラスミドDNA (pDNA) などの様々なタイプの核酸を結合することが可能です。

本アプリケーションノートでは、NABナノセップ遠心ろ過デバイスを用いて、*S. cerevisiae* のgDNAとRNAの品質と収量について他社ブランドの製品と比較しながら解析を行ないました。他社ブランド製品は、DNAとRNAの両方を抽出するためのバッファーと試薬が別々にセットされています。そのため、ポールのNABナノセップ遠心ろ過デバイスを用いて試験する場合は、他社ブランドのバッファーを使用して、gDNAとRNAを精製しました。本研究で得られた核酸抽出のデータは、各ブランドの遠心ろ過デバイスの10個 (n=10) を比較した結果です。サンプルのばらつきを抑えるために同じ培地で並行して処理しました。本研究では、ポールのNABナノセップで抽出・精製されたgDNAとRNAの品質と収量は、他社ブランドと同等であることが示されました。

実験方法

使用機材

本研究で使用した機材類は、ポールのNABナノセップ遠心ろ過デバイス、他社ブランドのDNA及びRNA抽出キット (ブランドAと表記) です。このブランドAのDNA及びRNA抽出キットには、遠心ろ過デバイスの他にバッファーと試薬が付属しています。gDNAとRNAの抽出には、ブランドAのDNA抽出キット (キットAD) またはRNA抽出キット (キットAR) のバッファーをNABナノセップに使用しました。

キット以外の使用した培地やバッファー、試薬はすべて以下のように調整しました。YPDブロス: 脱イオン水で50 g/Lになるように調整し、120°C、15分間オートクレーブ滅菌しました。バッファーY1: 1 Mソルビトール、0.1 M EDTA、pH 7.4 – 8.0に調製し、使用直前に2 M DTTを20 µL添加しました。Zymolase溶液 (VWR:20U): 2 mgの粉末をバッファーY1 1 mLで溶解して調整しました。

酵母培養

使用した酵母は、*S. cerevisiae* (ATCC7754) です。酵母は、無菌環境でYPDブロスを用い、30°C、200 rpmで振とうさせながら培養しました。RNA及びDNAの抽出は、OD₆₀₀値がそれぞれ2.9、11.3の時に進んだ。OD₆₀₀値が1の時のコロニー形成単位CFUは10⁷個/mLでした。

酵母溶解とスフェロプラストの生成

S. cerevisiae の細胞は多糖類を多く含む細胞壁に覆われているため、この細胞壁を溶解する必要があります。この作業は、Zymolase を用いる酵素処理で実行でき、その結果として、スフェロプラストを生成します。

同じ培地から細胞を溶解し、NABナノセップ遠心ろ過デバイスとブランドAの遠心ろ過デバイスへ添加しました。5000 x gで5分間遠心し、細胞のペレットを生成しました。各デバイスに500 μ LのZymolaseを含むバッファーY1を入れ、サーモミキサーで300 rpmで一定に振とうしながら35°Cで30分間インキュベーションし、スフェロプラストを形成しました。最後に5000xgで5分間遠心し、ペレットにスフェロプラストを得ました。

NABナノセップ遠心ろ過デバイスとブランドAのキットADを用いるgDNAの抽出

この試験では、ポールのNABナノセップ遠心ろ過デバイスとブランドAのキットADのDNA抽出バッファーを使用しました。gDNAの抽出は、キットADの遠心ろ過デバイスとバッファー/試薬を用いて実施しました。スフェロプラストのペレットをAD社のバッファーに懸濁し、金属ビーズとStar-Beater mixer mill (VWR) で15分間、30 Hzでホモジナイズし、その後、60秒間ガラスビーズ (100 mg/サンプル) をパルスボルテックスしました。各サンプルに20 μ LのプロテイナーゼKを加え、サーモミキサーで56°C、300 rpmで振とうしインキュベーションしました。サンプルはRNAを消化処理するために4 μ LのRNase溶液を加え、5分間インキュベーションしました。このサンプルに200 μ Lの溶解バッファーを添加し、70°Cで10分間インキュベーションした後、200 μ Lの70%エタノールを加え、15秒間パルスボルテックスしました。最終混合物 (約600 μ L) をNABナノセップ遠心ろ過デバイスとキットADの遠心ろ過デバイスに300 μ Lずつ移し、12,000 x gで1分間遠心分離しました。その後のステップは、両ブランドの製造元の説明書に従いました。gDNA溶出は、12,000 x gで遠心分離する前に、100 μ Lのヌクレアーゼフリー水を添加し、室温で5分間インキュベーションしました。

gDNA濃度は、サンプルを10 mM Trisバッファー (pH 7.0) で希釈後、260 nmの吸光度 (A_{260}) を測定し、①の式を用いて算出しました。

$$\text{DNA濃度 } (\mu\text{g/mL}) = 50 \times A_{260} \times \text{希釈倍率} \dots\dots\dots \text{①}$$

280 nmの吸光度 (A_{280}) を記録し、 A_{260}/A_{280} 比を算出し、抽出したDNAの純度を評価しました。gDNAの収量 (μ g) は②の式を用いて算出しました。

$$\text{DNA収量 } (\mu\text{g}) = \text{DNA濃度 } (\mu\text{g/mL}) \times \text{最終サンプル量 (mL)} \dots\dots\dots \text{②}$$

NABナノセップ遠心ろ過デバイスとブランドAのキットARを用いるRNAの抽出

RNA抽出は、NABナノセップ遠心ろ過デバイスとキットARの遠心ろ過デバイスとバッファーを使用しました。スフェロプラストのペレットは、20 μ Lの2 M DTTを含む350 μ Lのバッファーに懸濁し、ガラスビーズ (100 mg/サンプル) を用いて60秒間パルスボルテックスし、ホモジナイズしました。その後、1サンプル当たり350 μ Lの70%エタノールを添加しました。サンプルをピペティングで混合し、350 μ LずつNABナノセップ遠心ろ過デバイスとキットARの遠心ろ過デバイスに分注しました。サンプルを入れた遠心ろ過デバイスを12,000 x gで1分間遠心分離し、ろ液を廃棄しました。その後のステップは、両ブランドの製造元の説明書に従いました。RNA溶出は、12,000 x gで2分間遠心分離する前に、100 μ Lのヌクレアーゼフリー水を添加し、室温で1分間インキュベーションしました。

RNA濃度は、RNAサンプルを10 mM Trisバッファー (pH 7.0) で希釈し、260 nmの吸光度 (A_{260}) を測定し、③の式を用いて算出しました。

$$\text{RNA濃度 } (\mu\text{g/mL}) = 44 \times A_{260} \times \text{希釈倍率} \dots\dots\dots \text{③}$$

280 nmの吸光度 (A_{280}) を記録し、 A_{260}/A_{280} 比を算出し、抽出したRNAの純度を評価しました。RNAの収量 (μ g) は④の式を用いて算出しました。

$$\text{RNA収量 } (\mu\text{g}) = \text{RNA濃度 } (\mu\text{g/mL}) \times \text{最終サンプル量 (mL)} \dots\dots\dots \text{④}$$

結果と考察

S. cerevisiae からのgDNA抽出

Fig. 1 に示すように、ポールのNABナノセップ遠心ろ過デバイスとブランドAのDNA抽出キットADの遠心ろ過デバイスは、各ブランドごとに試験した10個すべての遠心ろ過デバイスで同程度のgDNA収量を示しました。gDNAの純度は、 A_{260}/A_{280} を評価することによって決定しました。ポール及びブランドAの遠心ろ過デバイスともに1.7であり、許容範囲内であることが示されました (Table 1)。

Fig. 1

S. cerevisiaeを溶解して抽出したDNA収量の比較 (ポールのNABナノセップとブランドAのキットADの遠心ろ過デバイス)

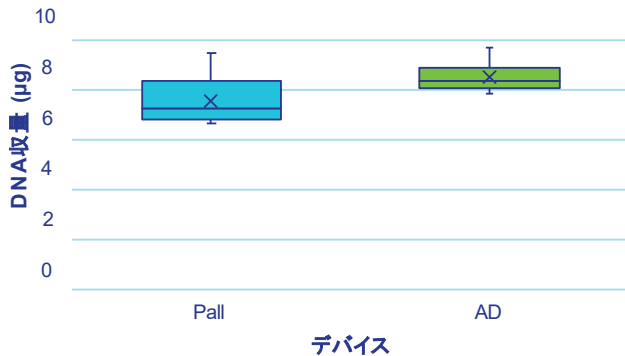


Table 1

ポールのNABナノセップ遠心ろ過デバイスとブランドAのキットADの遠心ろ過デバイスを用いたS. cerevisiaeからのgDNA収量の平均値

OD ₆₀₀	培養量/ サンプル (mL)	細胞/サンプル	ポール・NABナノセップ遠心ろ過デバイス		キットAD・遠心ろ過デバイス	
			gDNA (µg)	A_{260}/A_{280}	gDNA (µg)	A_{260}/A_{280}
11.3	3	3×10^8	7.6 ± 0.9	1.7 ± 0.1	8.5 ± 0.6	1.7 ± 0.1

S. cerevisiae からのRNA抽出

Fig. 2 に示すように、ポールのNABナノセップ遠心ろ過デバイスとブランドAのRNA抽出キットARの遠心ろ過デバイスは、各ブランドごとに試験した10個すべての遠心ろ過デバイスで同程度のRNA収量を示しました。RNAの純度は、 A_{260}/A_{280} を評価することによって決定しました。ポール及びブランドAの遠心ろ過デバイスともに2.2であり、高純度のRNAであることが示されました (Table 2)。

Fig. 2

S. cerevisiaeを溶解して抽出したRNA収量の比較 (ポールのNABナノセップとブランドAのキットADの遠心ろ過デバイス)

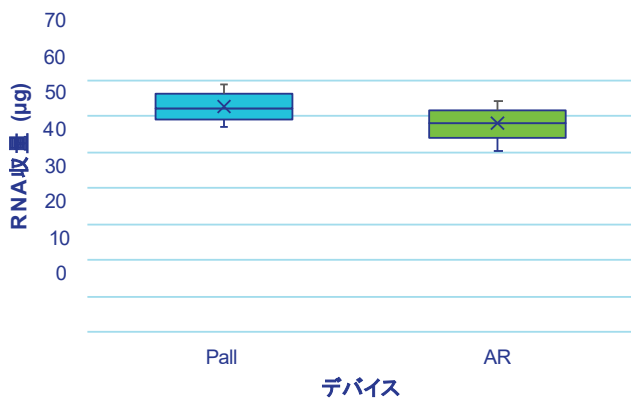


Table 2

ポールのNABナノセップ遠心ろ過デバイスとブランドAのキットARの遠心ろ過デバイスを用いた*S. cerevisiae*からのRNA収量の平均値

OD ₆₀₀	培養量/ サンプル (mL)	細胞/サンプル	ポール・NABナノセップ 遠心ろ過デバイス		キットAD・遠心ろ過デバイス	
			RNA (μg)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	RNA (μg)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
2.9	1.5	4.5 x 10 ⁷	62.7 ± 4.0	2.2 ± 0.0	57.9 ± 4.6	2.2 ± 0.0

結論

ポールのNABナノセップ遠心ろ過デバイスは、*S. cerevisiae*のgDNAとRNAの両方の精製に利用できることを示しました。さらにNABナノセップ遠心ろ過デバイスは、主な核酸抽出キットメーカーと比較して、同程度の収量を示し、再現性の高い結果が得られました。


参考文献

- Burgess, S.M., Powers, T. and Mell, J.C. (2017). Budding Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* as a Model Genetic Organism. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000821.pub2>
- Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen (ATCC 7754) product sheet: https://www.atcc.org/en/Products/Quality_Control_Strains/By_Identifier/7754.aspx#documentation



ラボラトリー事業部
〒163-1325 東京都新宿区西新宿6-5-1
TEL. 03 (6386) 0993
FAX. 03 (6386) 0994

ポールのWebサイトはこちらから: <https://www.pall.com/jp/ja/laboratory.html>
お問い合わせは、<https://www.pall.com/jp/ja/laboratory.html>
サイトの下にある「問い合わせ」をクリックしてください。

© Copyright 2022, Pall Corporation. Pall, , Nanosep は、Pall Corporationの商標です。® は米国で登録された商標を示します。2022/01