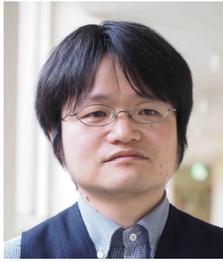


# 野生種イチゴサンプルからの RNA 抽出



栽培イチゴ ( $2n = 56$ ) のゲノムは、祖先種である野生種イチゴ ( $2n = 14$ ) から受け継いだ複数のサブゲノムで構成されている。自然選択によって無作為な選抜が行われている野生種イチゴは、人為選択の末に作られた栽培イチゴよりもゲノム構造がシンプルなおよびに遺伝的多様性が豊富なため、育種に有利な表現型の創出につながる遺伝子の単離や遺伝子マーカーの開発に適した材料といえる。我々は、日本各地から採取した野生種イチゴのコレクションを基に、オミクスデータを統合的に解析し、病害虫の感染や環境ストレスに対する応答機構、または生理障害の詳細を明らかにすることで育種において有益な洞察を得たいと考えている。当プロジェクトの活動を通して、遺伝子マーカーやオミクスデータのプラットフォームを構築・形成し、将来は植物や育種研究の拠点となることを目指している。

宇都宮大学 イチゴプロジェクト 黒倉 健先生

ここが難しい!



休眠状態 (左) と栄養成長状態 (右) の *F. iinumae*

**ポリフェノール類や多糖類を豊富に含む野生種イチゴ (*Fragaria iinumae*, および *F. vesca*) からの核酸抽出はカラムベースでのキットやマニュアル法では核酸の抽出効率と多用途に使用可能な純度・抽出に要する時間のすべてをバランスよく満たすことができない。作業員やサンプルの部位、休眠や病原体の感染などの状態に依らず一定以上の品質の total RNA を大量のサンプルから短時間で抽出できる手法が望ましい。**

## ポリフェノール類や多糖類を豊富に含む野生種イチゴから核酸を抽出するポイント

- サンプル重量は成葉・根の場合 100mg を限度とする。量が多いと吸光度比 (260/230) の値が悪化する。
- サンプルは破砕し buffer を加えるまで融解してはならない。途中で融解すると吸光度比 (260/230) の値が悪化する。ビーズ式破砕機を用いる場合は短時間・複数回掛け、その間も適宜液体窒素を使用することでサンプルを融解させずに確実に破砕する。
- 傷害を受けた葉や休眠芽などサンプルに含まれるポリフェノール類や多糖類が通常より多いと予想される場合は前処理用の CTAB buffer 中の 2-mercaptoethanol、NaCl および PVP の量を増量する。2-mercaptoethanol は抽出作業直前に buffer に加える。

## ラボプロトコール

使用キット：Maxwell® RSC Plant RNA Kit (カタログ番号 AS1500)

### 1 サンプリング

小葉 1 枚あるいは 100mg のサンプルを 2ml チューブに移し、直ちに液体窒素で凍結する。

### 2 サンプル破砕

凍結状態を保ちつつ、ビーズ破砕機または乳鉢 / 乳棒でパウダー状になるまで破砕する。

### 3 RNA 抽出前処理

600 $\mu$ l の自作した CTAB buffer (2% hexadecyltrimethylammonium bromide, 2% PVP K-30, 100mM Tris-HCl pH8.0, 25mM EDTA, 2.0M NaCl, 0.5g/L spermidine, 2% 2-mercaptoethanol) を加え、65 $^{\circ}$ C のヒートブロックでサンプルが溶解するまで加熱する。600 $\mu$ l のクロロホルム : イソamilアルコール (24:1) を加え激しく攪拌し、遠心機 (4 $^{\circ}$ C, 20,000 xg) で 5 分間遠心分離する。分離した上相を新しい 1.5ml チューブに移す。これを 2 回繰り返す。200 $\mu$ l の Lysis Buffer を加え、ピペティングで混合する。

### 4 RNA 抽出

工程 3 のライセートから 600 $\mu$ l を Maxwell® Kit のカートリッジに加え、Maxwell® RSC miRNA Plasma and Serum Kit (カタログ番号 AS1680) のメソッドで RNA 抽出を実行する。Elution Tube に加える Nuclease-Free Water は 40 $\mu$ l とする。

### 5 品質チェック

NanoDrop で測定する。リアルタイム PCR、RNA-seq での解析に使用する。

栄養成長状態の茎頂・休眠状態の茎頂・根・展開葉から 100 ng/ $\mu$ l 以上の高品質 RNA を抽出することができた。これらの RNA はクローニング、リアルタイム PCR および RNA-seq 解析に問題なく使用できることを確認している。

表 1. 野生種イチゴ *F. iinumae* および *F. vesca* の各部位からの RNA 収量と純度

<i>F. iinumae</i>								
栄養成長茎頂			休眠茎頂					
濃度	260/280	260/230	濃度	260/280	260/230			
188.6	2.12	2.08	289.0	2.17	2.14			
<i>F. vesca</i>								
茎頂			根			葉		
濃度	260/280	260/230	濃度	260/280	260/230	濃度	260/280	260/230
186.6	2.16	2.18	241.0	2.16	2.08	282.0	2.11	2.00

茎頂：未展開葉を含むすべての葉を取り除いた茎頂の先端部を切除。  
根：培養土を流水で洗い流し、切除。葉：100mg 程度の展開葉を使用

マニュアル法と Maxwell® RSC を併用することで、部位に依らず高純度な RNA 抽出が可能となった。従来、マニュアル法のみでは約 1.5 日を要していた工程が、Maxwell® RSC の導入により 2 時間以内に短縮され、精製作業のハンズフリー化によって研究効率が大きく向上した。さらに、作業員の手技レベルに左右されず安定した結果が得られる点は、複数人で進めるプロジェクトにおいて有用であり、学生や技術補佐員でも短期間で運用が可能である。加えて、長期間未使用後もメンテナンス不要で再稼働できる点も大きな利点である。

日本語 Web site : [www.promega.co.jp](http://www.promega.co.jp)

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 • E-Mail : [prometec@jp.promega.com](mailto:prometec@jp.promega.com)

# プロメガ株式会社

本社 〒103-0001  
東京都中央区日本橋小伝馬町1-5 PMO日本橋江戸通  
Tel. 03-3669-7981

大阪事務所 〒541-0051  
大阪市中央区備後町4-1-3 御堂筋三井ビルディング  
Tel. 06-6202-4581

※製品の仕様、価格については 2026 年 2 月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店