

純度の高い DNA の抽出法

機器・機材

- ホモジナイザー装置：PRO Scientific, PR0200
- ホモジナイザー：PRO Scientific, MULTI-GEN7
- サーマシェーカー：サーモニクス
- パスツールピペット：岩城硝子
- アスピレーター：TOP
- 遠心分離器：KUBOTA, KN-70
- 先端をカットしたチップ (1ml)：岩城硝子
- チューブ (8ml アシストチューブ)：アシスト
- チューブ (15ml)：FALCON

準備する試薬

- 10×PBS：組成表を参照
- 10%SDS：組成表を参照
- RNase A (10mg/ml)：SIGMA 組成表を参照
- Protease K (20mg/ml)：和光純薬
- 中性フェノール (pH7.8)：別紙プロトコール参照
- クロロホルム：ナカライテスク
- エタノール：ナカライテスク
- 3M 酢酸ナトリウム：組成表を参照
- TE：組成表を参照

(1日目)

1. 10×PBS (細胞の分離のため) を 1/10 (1×) に希釈し、氷上にて冷却しておく。脾臓も氷上にて保存しておく。
2. 1×PBS を 8ml アシストチューブに 5ml 加える。
3. 約 3mm 角(約 20mg)に切った脾臓を 8ml アシストチューブに入れ、ホモジナイザーで組織片が見えなくなるまで、約 2 分間ホモジナイズ (砕く・均質化) する。

4. ピペットを用い、アシストチューブから溶液を 15ml チューブへ移す。
5. 遠心分離 (3000rpm, 2min) して、上清と沈殿物に分ける。
6. 沈殿物を吸い込まないように上清だけを、パスツールピペットを装着したアスピレーターによって吸い出す。
7. 沈殿物の残った 15ml チューブに TE を 5 ml 加え、ボルテックス(Scientific Industrels , VORTEX-2) を用いて沈殿物がバラバラになるまで、懸濁する。なかなか、懸濁できない場合はチューブを手で激しく振って懸濁する。
8. RNase A (RNA の除去のため) を 10 μ l 加えて、5 ~ 6 回ゆっくり転倒混和する。(final 20 μ g/ml)
9. 10% SDS (細胞壁の破壊のため) を 50 μ l 加えて、5 ~ 6 回ゆっくり転倒混和する。(final 0.1%)
10. 37 °C に設定したインキュベーター (KAMO , 101 型) で 2 時間保温。
11. 2 時間後、ProtenaseK (タンパク質の除去) を 25 μ l 加え、50 °C に設定したインキュベーター (NAKAGAWA , B-1) でオーバーナイトのインキュベーター (約 16 時間) 。

(2 日目)

1. オーバーナイトでインキュベートしたサンプルに中性フェノールを等量 (5ml) 加え、サーモシェーカーで 15 分の振倒 (速度はゆっくり) 。
2. 遠心分離 (3000rpm, 5min)
3. カットチップ (1ml) で上清を新しい 15 ml チューブに入れ替える。
(注 遠心分離後、上清部分が白濁していたり、中間層が多かったりする場合は、上清が透明になり、タンパク質が除去出来るまで 1. ~ 3. を行う)
4. フェノールクロロホルム(フェノール: クロロホルム = 1:1) を 5ml 加え、サーモシェーカーで 15 分の振倒 (速度はゆっくり) 。
5. 遠心分離 (3000rpm, 5min)
6. カットチップ (1ml) で上清を新しい 15 ml チューブに入れ替える。
7. フェノールクロロホルムを 5ml 加え、サーモシェーカーで 15 分の振倒(速度はゆっくり) 。
8. 遠心分離 (3000rpm, 5min)
9. カットチップ (1ml) で上清を新しい 15 ml チューブに入れ替える。
10. 総量の 1 / 10 量 (500 μ l) の 3 M 酢酸ナトリウムを加える。

11. 総量の 2 倍 (10ml) の 100%エタノールを加え、転倒混和する。
12. 先端を塞いだパスツールピペットでチューブ内の DNA を回収する。なるべく先端部分に絡め取る。
13. 新しい 15 ml チューブに入れた 70%エタノールで DNA を洗浄する。(30 秒ぐらい)
14. パスツールピペット上でそのまま DNA が半透明になるまで風乾する (3 ~5 分)
15. TE を 2ml チューブに 500 μ l 入れておく (2ml チューブには系統名、遺伝子型、世代数、性別、個体識別、DNA 抽出日を記入しておく)
16. 半透明になるまで風乾した DNA を TE の入った 2ml チューブに溶かし入れる。
17. DNA の入った 2ml チューブを 50℃ でオーバーナイトのインキュベート。
18. 4℃ で保存する。

ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」

作成者：中西 聡

作成日：2003.4.14

試薬の調整法

10 × PBS

試薬	グレード	最終濃度	使用量
NaCl (ナカライテスク)	特級試薬	1.37M	40g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O (ナカライテスク)	特級試薬	81mM	14.5g
KCl (ナカライテスク)	特級試薬	26.8mM	1g
KH ₂ PO ₄ (ナカライテスク)	特級試薬	14.7mM	1g
超純水	滅菌不要		500 ml
計			約 500ml

方法

1. 試料をすべて計り取り、使用する試薬瓶に入れる。
2. 超純水を加えて、よく振りまぜる。
3. 必要ならオートクレーブ滅菌する。

10%SDS

試薬	グレード	使用量
SDS (ナカライテスク)	特級試薬	50g
超純水	滅菌不要	
計		500 ml
0.1N NaOH (pH 調整用)		適宜

方法

- ビーカーに超純水を入れる。
- SDS を加え、スターラーで溶かす。
- 泡が消えるまで待つ。
- 数滴の 0.1N NaOH で、pH7.2 に調整する。
- 最終液量までメスアップする。
- SDS は RNase や DNase の阻害剤のためオートクレーブ滅菌は必要ない。
- 室温で保存する。

10mg/ml RNase A (DNase free)

試薬	最終濃度	使用量
RNaseA (SIGMA)	10mg/ml	250mg
1M Tris-HCl (pH7.5)	10mM	0.25 ml
5M NaCl (pH7.5)	15mM	0.075 ml
計		約 25ml

方法

1. 1M Tris-HCl (pH7.5) 5M NaCl (pH7.5) を超純水で薄めて、ふたのできる容器にバッファーを用意する。
2. RNase の粉末を、全量バッファーに溶かす。
3. お鍋のような大きな容器に水道水を入れ、コンロにかけてお湯を沸かす。
4. 試験管立てなどに適当な物を用いてチューブをお湯につけ、100 で 15 分間加熱する。
5. コンロの火を消して、お湯につけたまま自然に冷めるのを待つ。
6. マイクロチューブに分注して -20 で保存する。

3M 酢酸ナトリウム (pH5.2)

試薬	グレード	使用量
NaOAc · 3H ₂ O (ナカライテスク)	特級試薬	408.1g
超純水	滅菌不要	
計		1 L
氷酢酸 (pH 調整用)	特級試薬	114 ml

方法

1. ビーカーに超純水を入れ、スターラーで混ぜながら NaOAc を少しずつ入れ溶かす。
2. pH メーターで計りながら氷酢酸を加えていき、pH を調整する。
3. 最終液量まで超純水をくわえ、メスアップする。
4. オートクレーブ滅菌をする。

1M Tris-HCl

試薬	グレード	使用量
Tris (ナカライテスク)	特級試薬	121.1g
超純水	滅菌不要	
計		1 L
HCl (約 35%, pH 調整用) 特級試薬 pH8.0 のとき、約 42ml		

方法

1. ビーカーなどの広口の容器に超純水を入れ、スターラーで混ぜながら Tris を加え、溶かす。
2. pH メーターで計りながら HCl を加えていき、pH を調整する。
3. 溶液が室温に戻るまで冷ます。
4. さらに HCl を加えて pH を調整し直す。
5. 最終液量まで超純水をくわえ、メスアップする。
6. オートクレーブ滅菌をする。

0.5M EDTA (pH8.0)

試薬	グレード	使用量
EDTA (ナカライテスク)	特級試薬	186.1g
超純水	滅菌不要	
計		1 L
5N NaOH (pH 調整用)	特級試薬	適宜

方法

19. ビーカーなどの広口の容器に超純水を入れ、スターラーで混ぜながら EDTA を入れる。
20. pH メーターで計りながら 5N NaOH を加え、pH を調整する。
21. 最終液量まで超純水をくわえ、メスアップする。
22. 必要ならオートクレーブ滅菌する。

TE

試薬	最終濃度	使用量
1M Tris-HCl (pH8.0)	10mM	2 ml
0.5M EDTA (pH8.0)	1mM	0.4 ml
超純水	滅菌不要	197.6 ml
計		200 ml

方法

1. それぞれの試薬を試薬瓶に計り入れ、そこに超純水を入れる。
2. オートクレーブ滅菌をする。

参考文献： バイオ実験イラストレイテッド（秀潤社）