

DNA の簡易抽出方法 (PCR 用)

田畑哲之
かずさ DNA 研究所
tabata@kazusa.or.jp

ミヤコグサの各種組織から、サザン分析、PCR などおおよその用途に問題なく使用できる純度の DNA を簡便に抽出することができる。

〔準備するもの〕

キット・試薬

Nucleon PhytoPure, plant and fungal DNA extraction kits (GE ヘルスケアバイオサイエンス株式会社)

RPN8510 (for 0.1 g x 50 samples) 17000 円

RPN8511 (for 1.0 g x 50 samples) 32000 円

Isopropanol, 80% EtOH

TE

器具等

2 ml microtube (アシスト)

3 mm, 6 mm アルミナビーズ (メーカーは問わない・1Kg 2000 円程度のものでよい)

TOMY microtube mixer [MT-360]

TOMY micro centrifuge [MX-300]

TAITEC ミキサー

〔方法〕

(1) 組織の破砕法

サンプルの数が少ない場合は、液体窒素で凍結した状態で破砕する。多い場合は、アルミナビーズを使用する。後者の場合、攪拌の時間が長いと DNA が数 kb 程度に壊れるが、PCR の鋳型としては問題ない。

A. サンプル数が少ない場合

1. 2 ml の microtube (アシスト) に、Nucleon PhytoPure DNA prep kit (GE ヘルスケア) I 液に最終濃度 100 μ g/ml RNaseA を加えたものを 750 μ l 入れる。
2. 100 ~ 150 mg のサンプルを液体窒素中で乳鉢で破砕する。
3. 破砕したサンプルを 1 のチューブにいれて攪拌する

B. サンプル数が多い場合

1. 2 ml の microtube (アシスト) に径 3 mm のアルミナビーズ 0.7 g (10 個) と径 6 mm のアルミナビーズ 2 個を入れる。(3 mm のビーズが底にくるように先に入れる)
2. Nucleon PhytoPure DNA prep kit (GE ヘルスケア) I 液に最終濃度 100 μ g/ml RNaseA を加えたものを 750 μ l 入れる
3. 植物体 100 ~ 150 mg をハサミで 0.5 mm 程度にきざんで、2 のチューブにいれる(なるべく若くて柔らかい葉を使う)
4. TOMY mixer 最高回転で 15-20 分間振とうする(途中で、均一に攪拌、破壊されているか確認)

(2) DNA の抽出

5. II 液を 250 μ l 加え混合した後、65 $^{\circ}$ C、10 分間 incubation (たまに攪拌する)
6. ラックごと -20 $^{\circ}$ C に入れ (フタなし)、20 分間 静置
7. -20 $^{\circ}$ C に冷やした Chloroform を 400 μ l 加える
8. Nucleon PhytoPure resin を 35 μ l 加える
9. TAITEC ミキサー、140rpm 室温で 10 分間振とうする
10. 1300 x g、25 $^{\circ}$ C、10 分間遠心する (TOMY micro centrifuge で 5,000 rpm)
11. 遠心の際に、2 ml の microtube に isopropanol を 0.9 ml 入れておく
12. ピペットマンを 1 ml に合わせ、水層最大 1 ml を 11 のチューブに移し、よく振盪後 4 $^{\circ}$ C、30 分間以上静置
13. TOMY micro centrifuge で 15,000 rpm 15 分間遠心する
14. 80% Ethanol 500 μ l を加えかるく振とうした後、15,000 rpm 5 分間遠心する
15. Ethanol を完全に除いた後、風乾 10 分
16. TE を 50 μ l 入れかるく振とうした後、4 $^{\circ}$ C 1 時間以上放置
17. かるく振盪し完全に溶けていることを確認後、15,000 rpm 5 分間遠心する
18. 水層を保存用チューブに移し、1 μ l を電気泳動