

## じっけんレシピ

## DNA・RNA 目次

よく使う溶液の調製方法.....	2
トリスバッファー(トリス塩酸バッファー、TRIS-HCLバッファー)の調製.....	2
PBS (-)の調製.....	3
5N 水酸化ナトリウム溶液.....	4
EDTA溶液の調製.....	4
TEバッファー (pH 8.0) の調製.....	4
中性飽和フェノール(トリス-フェノール)溶液の調製.....	5
酸性飽和フェノール(水飽和-フェノール)溶液の調製.....	5
フェノールクロロホルムの調製.....	6
RNASE溶液の調製.....	7
70% エタノールの調製.....	7
3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 調製.....	8
TAEバッファー(トリス-酢酸-EDTAバッファー)の調製.....	8
TBEバッファー(トリス-ホウ酸-EDTAバッファー)の調製.....	8
エチジウムブロマイド溶液の調製.....	9
アガロースゲル作製(核酸電気泳動用).....	9
ローディングバッファーの調製(DNAの電気泳動用).....	10
DEPC処理水の調製.....	11
プロトコール.....	12
大腸菌プラスミドの抽出 アルカリ-SDS法(アルカリミニプレップ).....	12
★大腸菌プラスミド精製キットの紹介★.....	15
フェノール抽出.....	16
フェノールクロロホルム抽出.....	16
アガロースゲルからのDNA回収法.....	17
DNAの濃縮.....	17
エタノール沈殿(エタ沈).....	17
イソプロパノール沈殿(イソプロピルアルコール沈殿).....	18
ポリエチレングリコール沈殿(PEG沈殿).....	19
RNAの濃縮 エタノール沈殿.....	19
核酸の検出 吸光度による検出・定量.....	20
核酸の検出 エチジウムブロマイドによる染色・検出.....	20

お問い合わせ先:

製品の技術的なご質問 [sialjpts@sial.com](mailto:sialjpts@sial.com)  
 価格・在庫のご質問 [sialjpcs@sial.com](mailto:sialjpcs@sial.com)

## よく使う溶液の調製方法

### トリスバッファー(トリス塩酸バッファー、Tris-HClバッファー)の調製

トリス(Tris; tris(hydroxymethyl)-aminomethane)は様々な生物学的システムにバッファー(pH 7~9)として用いられます。Trizma はトリスの商標名です。

トリス塩基(Tris base; Trizma Base)と塩酸を用いて目的とする pH のトリスバッファーを調製することができます。トリスバッファーはオートクレーブ可能です。

#### 一般的な調製方法

使用する物質	使用量(1M, 100 mL 用)	製品番号
トリス塩基 (Trizma base)	12.1 g	<a href="#">T6791</a>
塩酸	10 mL 程度	<a href="#">H1758</a> など

- 12.1 g の Trizma Base(トリス塩基)を約 80 mL の純水に溶かします。
- スターラーで攪拌しながら塩酸を加え、目的の pH に調製します。
  - 塩酸を加えると発熱が起こるため、pH に変化が生じます。しばらくおいて室温になってから pH を再度測定し、塩酸で調製すると正しい pH のバッファーが得られやすくなります。
  - トリスの中和には塩酸を大量に使用するの、希塩酸ではなく希釈していない塩酸が適しています。
- pH の調製が終わったら、純水で 100 mL にメスアップします。溶液は室温で保存可能です(オートクレーブ可能)。

#### 簡易的な調製方法

簡易的に pH を調製したい場合は、塩基性を示す Trizma Base と酸性を示すトリス塩酸塩(Trizma HCl)を組み合わせることで、トリスバッファーを調製することもできます。

使用する物質	製品番号
トリス塩酸塩 (Trizma HCl)	<a href="#">T5941</a>
トリス塩基 (Trizma base)	<a href="#">T6791</a>

Trizma Base は純水に溶解すると塩基性(pH 約 10.4)を示し、Trizma HCl は塩酸塩を含み、溶解すると酸性(pH 約 4.7)を示します。

最終濃度	pH	調製方法
0.05 M	7.6	6.06 g の Trizma HCl と 1.39 g の Trizma Base を純水に溶かし、1L にメスアップ
0.05 M	7.8	5.32 g の Trizma HCl と 1.97 g の Trizma Base を純水に溶かし、1L にメスアップ
0.05 M	8.0	4.44 g の Trizma HCl と 2.65 g の Trizma Base を純水に溶かし、1L にメスアップ

その他の pH の場合はカタログまたはウェブサイトでもご覧頂けます(Trizma の項目参照)。

Trizma HCl および Trizma Base は吸湿性があるため、吸湿していると実際の予想される濃度・pH と異なる場合があります。

#### さらに簡単な調製

製品名	製品番号	水に溶解後の pH
Trizma Pre-set crystals	<a href="#">T7693</a>	pH 7.4

また、さらに簡単に目的の濃度・pH の Tris バッファーを調製するには、Trizma Pre-set crystals を使用することもできます。Trizma Pre-set crystals は Trizma Base と Trizma HCl が配合され、純水に溶かすだけでそれぞれの製品に示された pH・濃度のトリスバッファーが作製できます。

## PBS(-)の調製

PBS (Phosphate Buffered Saline; リン酸緩衝食塩水) は生物学の研究に一般的に使用される緩衝液で、カルシウムおよびマグネシウムを含まない PBS は PBS(-)と表記されます。PBS はダルベッコ PBS (Dulbecco's PBS; D-PBS) と呼ばれることもあります。

PBS(-) 溶液はオートクレーブ可能で、室温で保存可能です。

カルシウム・マグネシウムを含む PBS は PBS(+)と表記され、細胞接着を強める場合などに用いられます。

### 一般的な調製方法

PBS	1x, 1 L 用	10x, 1 L 用	製品番号
リン酸二水素カリウム	0.2 g	2 g	<a href="#">P5655</a>
塩化カリウム	0.2 g	2 g	<a href="#">P9333</a>
リン酸水素二ナトリウム	1.15 g	11.5 g	<a href="#">S7907</a>
またはリン酸水素二ナトリウム 12 水和物	2.90 g	29.0 g	<a href="#">28-3720</a>
塩化ナトリウム	8 g	80 g	<a href="#">S7653</a>
【PBS (+) のみ使用】 塩化カルシウム二水和物	(0.133 g)	(1.33 g)	<a href="#">C5080</a>
【PBS (+) のみ使用】 塩化マグネシウム六水和物	(0.1 g)	(1 g)	<a href="#">M2393</a>

#### 1xPBS(-), 1L用

上表 1x用に記載された量の塩化ナトリウム (NaCl)、リン酸水素二ナトリウム (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、塩化カリウム (KCl)、リン酸二水素カリウム (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) を約 800 mL の純水に溶かし、純水で 1L にメスアップすると pH 約 7.4 の 1xPBS が調製できます。

補足) 1.15 g のリン酸水素二ナトリウムの代わりに、2.90 g のリン酸水素二ナトリウム 12 水和物(製品番号 28-3720 など)を使うこともできます。

#### 10xPBS(-), 1L用

上表 10x用に記載された量の塩化ナトリウム (NaCl)、リン酸水素二ナトリウム (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、塩化カリウム (KCl)、リン酸二水素カリウム (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) を純水に溶かして 1L にメスアップすると pH 約 7.4 の 10xPBS が調製できます。

補足) 11.5 g のリン酸水素二ナトリウムの代わりに、29.0 g のリン酸水素二ナトリウム 12 水和物(製品番号 28-3720 など)を使うこともできます。

10xPBS の希釈方法: 100 mL の 10xPBS に 900 mL の純水を加えて混ぜます。

PBS(+)を作成する場合は、0.133 g の塩化カルシウム・二水和物(CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O)および 0.1 g の塩化マグネシウム・六水和物(MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O)を追加します。

カルシウム、マグネシウムを含んでいるとオートクレーブできません。

PBS(+)をフィルター滅菌するか、オートクレーブした PBS(-)にフィルター滅菌した塩化カルシウム溶液と塩化マグネシウム溶液を添加します。

もっと手軽に使いたい

	製品番号		製品番号
PBS (-) 溶液	<a href="#">D8537</a>	PBS (-) 10 x 溶液	<a href="#">D1408</a>
PBS (+) 溶液	<a href="#">D8662</a>	PBS (+) 10 x 溶液	D1283

## 5N 水酸化ナトリウム溶液

各バッファの pH 調製によく利用されます。

### 100 mL用

- 約 70 mL の蒸留水をビーカーに入れ、水酸化ナトリウム 20.0 g を加えて、スターラーなどを用いて完全に溶かします。
- 100 mL になるように蒸留水でメスアップします。

溶液は室温で保存可能です(オートクレーブは必要ありません)。

水酸化ナトリウム溶液は強いアルカリ性になり、腐食性があるので十分に気をつけてお取り扱い下さい。

水酸化ナトリウム  
NaOH 分子量 40.00  
製品番号S8045

## EDTA溶液の調製

EDTA は金属プロテアーゼおよび金属によって活性化されるプロテアーゼの阻害剤で、1~10  $\mu$ M の濃度で作用します。

### 0.5 M溶液 pH 8.0、100 mL用

- 18.6 g の EDTA ニナトリウム二水和物(EDTA $\cdot$ 2Na $\cdot$ 2H $_2$ O)を 80 mL の純水に溶かします。
- 1 の溶液を攪拌しながら pH を測定し、水酸化ナトリウム(固体)を少しずつ加え、pH を 8.0 付近に近づけます。
- pH が 8.0 に近づいたら、5N 水酸化ナトリウム溶液を少しずつ加え、pH を 8.0 に合わせます。
- 純水で 100 mL にメスアップします。

溶液は 2-8°C で保存可能です。

EDTA ニナトリウム二水和物  
(EDTA $\cdot$ 2Na $\cdot$ 2H $_2$ O) 分子量 372.24  
製品番号E5134

## TEバッファ (pH 8.0) の調製

TE バッファ (Tris-EDTA Buffer; トリス-EDTA バッファ) は DNA の保存用溶媒として用いられます。

組成: 10 mM Tris, 1mM EDTA (pH 約 8.0)

TE バッファ	100 mL 用	製品番号
トリス塩酸バッファ, pH 8.0, 1 M	1 mL	<a href="#">T2694</a>
EDTA 溶液, 0.5 M	0.2 mL	前述レシピ参照

- 1 M Tris バッファ (pH 8.0) 1.0 mL と 0.5 M EDTA (pH 8.0) 0.2 mL を水で 100 mL にメスアップします。
- 121°C で 15 分間オートクレーブします。

溶液は 2-8°C または室温で保存可能です。

もっと手軽に使いたい

100x TEバッファ 製品番号T9285

組成 1 M Tris, 100 mM EDTA (pH 約 8.0)

## 中性飽和フェノール(トリス-フェノール)溶液の調製

フェノールは核酸の抽出においてタンパク質の分離に用いられます。フェノールは水に溶かすと弱酸性を示しますが、酸性条件で DNA はフェノール層に移ってしまうため、フェノールをトリスバッファー(pH 8.0)で飽和させることでフェノール溶液を中性に調製します。

RNA 分離用には水で飽和したフェノール(酸性飽和フェノール、水飽和フェノール)を用います。

使用する物質	使用量	製品番号
8-ヒドロキシキノリン	100 mg	<a href="#">H6878</a>
トリス塩酸バッファー	数 100 mL	<a href="#">T2694</a> (1 M) を純水で各濃度に希釈
フェノール(結晶)	100 g	<a href="#">P1037</a>

- 100 g のフェノール結晶をガラスのメディウムビンに移し、フタを閉めて 65°C のウォーターバスで溶かします。
- フェノールが溶けたら、8-ヒドロキシキノリンを 100 mg (最終濃度 0.1%) 加えます。  
8-ヒドロキシキノリンは酸化防止剤として作用します。8-ヒドロキシキノリンを添加しない場合もありますが、添加することでフェノール層が黄色に着色して見やすくなります。
- 100 mL フェノールと等量)の 0.5 M トリスバッファー(pH 8.0)を入れ、フタをよく閉めてから 15 分間程度激しくシェイクします。
- しばらく静置して、2 層に分かれたら上層(水層)を除去します。
- マイクロピペットなどを用いてフェノール層を少しサンプリングし、pH 試験紙で pH を確認します。
- pH が 7.8 以上になるまで手順 3~5 を繰り返します。
- 平衡化したフェノールを適量に分注し、それぞれ等量の 0.1 M トリスバッファー(pH 8.0)を加えて、2 層にした状態で保存します。平衡化したフェノールは遮光して 2-8°C で短期間、-20°C で長期間保存可能です。  
補足) フェノール層の上に 0.1 M トリスバッファーの層を重層させることでフェノールが空気と接触するのを避け、酸化防止の作用があります。

もっと手軽に使いたい

中性飽和フェノール (DNA用) [製品番号P4557](#)

酸性飽和フェノール (RNA用) [製品番号P4682](#)

## 酸性飽和フェノール(水飽和-フェノール)溶液の調製

- フェノール結晶を適量取り、ガラスのメディウムビンまたはポリプロピレンのチューブに移してフタを閉めます。
- 65°C のウォーターバスでフェノールを溶かします。
- フェノールが溶けたら、等量の純水を加えてフタをよく閉め、激しく数分間シェイクします。
- しばらく静置すると 2 層に分離します。遮光して 2-8°C または -20°C で保存可能です。

### 注意!

フェノールはタンパク質の変成作用がありますので、手袋や保護メガネなどの保護服を着用して下さい。

フェノールはガラスビンまたはポリプロピレンなど耐性がある容器で保存して下さい。

廃液はフェノールが含まれるので廃棄には注意して下さい。



## フェノールクロロホルムの調製

フェノールクロロホルムによって核酸からタンパク質を除去することができます。フェノールによってタンパク質が失活して RNase 活性は抑制されますが、イソアミルアルコールを少量混ぜることで RNase 活性がさらに低減します。

核酸の精製にはフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1 の組成がよく利用されます。

使用する物質	100 mL 用	製品番号
クロロホルム	49 mL	<a href="#">05-3400</a>
【DNA 精製の場合】中性飽和フェノール	50 mL	<a href="#">P4557</a>
【RNA 精製の場合】酸性飽和フェノール	50 mL	<a href="#">P4682</a>
3-メチル-1-ブタノール (イソアミルアルコール)	1 mL	I9392

### DNA用 100 mL

- 49 mL のクロロホルムに 1 mL のイソアミルアルコールを加えて混ぜます。
- 1 の混合液 50 mL と中性飽和フェノール(トリス-フェノール)溶液 50 mL を混ぜます。しばらく静置すると2層に分離します。  
遮光して 2-8°C で保存可能です。  
下層(フェノール)を核酸の精製に使います。

### RNA用 100 mL

- 49 mL のクロロホルムに 1 mL のイソアミルアルコールを加えて混ぜます。
- 1 の混合液 50 mL と酸性飽和フェノール(水飽和フェノール)溶液 50 mL を混ぜます。しばらく静置すると2層に分離します。  
遮光して 2-8°C で保存可能です。  
下層(フェノール)を核酸の精製に使います。

#### DNA 抽出用フェノールクロロホルム

Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 Saturated with 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA

製品番号 [P3803](#) 一般的な核酸抽出用

製品番号 [P2069](#) DNA抽出に最適化※

※平衡化用に 1 M トリス塩酸バッファー pH 8.0 が付属

#### RNA 抽出用フェノールクロロホルム

Phenol:Chloroform 5:1

製品番号 [P1944](#)

製品番号 P3803 は pH 8.0 の 10 mM トリスバッファーによって平衡化されていますが、実際の pH は約 6.7 です。

この pH は安定に保存できるとともに、多くの核酸抽出で使用することができます。

ゲノム DNA のように大きな DNA を抽出する場合は、pH を約 8 にする必要があります。

製品番号 P2069 は 1 M トリス塩酸バッファー pH 8.0 が付属しているため、pH を 8.0 に調製できます。

pH を 8.0 に調製した後はおよそ 1 ヶ月間しか保存できません。

## RNase溶液の調製

抽出したプラスミド DNA サンプルから RNA を除去するため、RNase A がよく用いられます。

RNase A の一般的な使用濃度 10  $\mu$ g/mL

プラスミド DNA サンプルに使用した RNase を取り除くために、(プロテイナーゼ K 処理)、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿が一般的に行われます。

使用する物質	製品番号	10 mL 用使用量	ストック溶液の組成
RNase A	<a href="#">R6513</a>	100 mg	10 mg/mL
5 M 塩化ナトリウム溶液	<a href="#">S7653</a>	30 $\mu$ L	15 mM
1 M トリス塩酸バッファー, pH 7.5	<a href="#">T2319</a>	100 $\mu$ L	10 mM, pH 7.5
滅菌した純水		9.87 mL	

### RNase Aストック溶液の調製方法

- 100 mg の RNase A に滅菌した純水 9.87 mL、1 M Tris バッファー, pH 7.5、100  $\mu$ L、5M 塩化ナトリウム溶液 30  $\mu$ L を加えて溶かします。
- エッペンドルフチューブなどに適量に分注して-20°Cで保存します。

調製後、残存する DNase を失活させるために 100°Cで煮沸することもあります。特に必要ありません。

煮沸した場合、沈殿物が生じることがあります。

RNase を取り扱う際には、周囲に RNA のサンプルがないことを確認して下さい。

もっと手軽に使用したい

**RNase A溶液** [製品番号R4642](#)

50%グリセロール溶液なので-20度で凍らず、  
凍結融解による失活が避けられます  
ロットにより濃度は異なります

## 70% エタノールの調製

70%(v/v)のエタノール溶液は滅菌用など使用されます。

使用する物質	製品番号
エタノール	<a href="#">09-0770</a>

### 1 L用

700 mL のエタノールに水を加え 1 L にメスアップします。

滅菌用に用いる場合は蒸留水を使用しますが、DNA のエタノール沈殿における DNA の洗浄などに用いる場合は純水や滅菌した純水を使用します。

オートクレーブやフィルターろ過による滅菌は不要です。

## 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 調製

3 M 酢酸ナトリウム溶液(pH 5.2)は DNA や RNA のエタノール沈殿に使用されます。

使用する物質	製品番号	100 mL 用
酢酸ナトリウム三水和物	<a href="#">S7670</a>	40.8 g
酢酸	<a href="#">01-0280</a>	pH 調製に使用

### 3 M 酢酸ナトリウム調製方法

- 40.8 g の酢酸ナトリウム三水和物を 90 mL の純水に溶かします。
- 攪拌しながら pH を測定し、酢酸を少しずつ加えて pH を 5.2 に調製します。
- 純水で 100 mL にメスアップします。
- 121°C で 15 分間オートクレーブして滅菌します。溶液は室温で保存可能です。

もっと手軽に使いたい

3 M 酢酸ナトリウム溶液

製品番号 [71196](#)

分子生物学用グレード

## TAEバッファー(トリス-酢酸-EDTAバッファー)の調製

TAE バッファー(トリス酢酸 EDTA バッファー)は DNA のアガロース電気泳動用のバッファーとして用いられます。電気泳動でアガロースゲルを作製する際、アガロースの溶解にも用いられます。頻繁に使用するため、50xまたは 10xのストック溶液を作製しておく便利です。ストック溶液は室温で保存可能です。

TAE バッファー	製品番号	50x、1L 用	10x、1L 用
トリス塩基 (Trizma base)	<a href="#">T6791</a>	242 g	48.4 g
酢酸	<a href="#">01-0280</a>	57.1 mL	11.4 mL
0.5 M EDTA 二ナトリウム溶液 または EDTA 二ナトリウム二水和物	<a href="#">E7889</a> <a href="#">E5134</a>	100 mL 18.6 g	20 mL 3.7 g

### TAEストック溶液調製方法

上表の試薬を適当な量の蒸留水で溶かして 1L にメスアップします。オートクレーブは不要です。

10x TAE バッファー(溶液)

製品番号 [T9650](#)

例) 100 mL の 1xTAE を作る場合 = 2 mL の 50xTAE + 98 mL の蒸留水  
または 10 mL の 10xTAE + 90 mL の蒸留水

## TBEバッファー(トリス-ホウ酸-EDTAバッファー)の調製

TBE バッファーは DNA および RNA のポリアクリルアミドゲル電気泳動の泳動バッファーに用いられます。非変性ゲルまたは変性ゲル(7 M 尿素)に使用され、DNA シークエンス用ゲルにも用いられます。5xまたは 10xのストック溶液を作製すると便利です。

TBE バッファー	製品番号	5x、1L
ホウ酸	<a href="#">B7901</a>	27.5 g
トリス塩基	<a href="#">T6791</a>	54 g
0.5 M EDTA 二ナトリウム溶液	<a href="#">E7889</a>	20 mL

10x TBE バッファー(溶液)

製品番号 [T4415](#)



### 5xTBE調製方法

1. 上表の試薬を適量の水で溶かして 1L にメスアップします。
2. 使用する前に、蒸留水で 5 倍に希釈します。オートクレーブは不要です。ストック溶液は室温で保存可能。

例) 100 mL の 1xTBE を作る場合 = 20 mL の 5xTBE + 80 mL の蒸留水

長期間保存すると沈殿が生じる場合があります。

## エチジウムブロマイド溶液の調製

エチジウムブロマイド(臭化エチジウム; EtBr)は核酸を染色し、電気泳動した核酸の検出によく用いられ、UV トランスイルミネーターによって励起・検出ができます。

水で 10 mg/mL に溶解してストック溶液として室温・遮光で保存します。

アガロースゲル内の DNA を染色する場合、使用濃度は 0.5  $\mu$ g/mL 程度です。

### 10 mL調製

100 mg のエチジウムブロマイドを 10 mL の水で溶解します。

使用する物質	製品番号
エチジウムブロマイド (EtBr)	E7637

エチジウムブロマイドは有害性が指摘されていますので、手袋など防護して取り扱って下さい。

### 使用例

電気泳動後のアガロースゲルを染色する場合、泳動バッファーをタッパーなどの容器に入れ、泳動バッファー約 100 mL あたり 10 mg/mL のエチジウムブロマイド溶液 5  $\mu$ L を混ぜ、ゲルを入れて室温で 30~45 分間インキュベートします。

**EtBr水溶液 10 mg/mL 製品番号E1510**

## アガロースゲル作製(核酸電気泳動用)

DNA の電気泳動には 0.5~4.0% のアガロースゲルが一般的に用いられ、濃度によって分離できる DNA のサイズが異なります。濃度が高いほど分離できる DNA のサイズは小さくなり、1% の場合はおよそ 0.5~7 kb の DNA が分離できます。

バッファーには一般的に TAE がよく用いられますが、TBE を使用することもあります。TAE はサイズの大きな DNA に適し、TBE は小さいサイズの DNA の分離に適しています。

ゲノム DNA やスーパーコイル状プラスミドの泳動には TAE が用いられます。

使用する物質	製品番号
アガロース	A5093

### アガロースゲル(TAEバッファー用)作製例

1. 200 mL の TAE バッファーを少し大きめの三角フラスコ(500 mL 程度)に入れ、2 g のアガロースを加え、穏やかに懸濁します。
2. 三角フラスコの口を耐熱性のあるラップで覆い、ラップには数箇所穴を開けます。  
補足) ゲル内にエチジウムブロマイド(EtBr)を入れる場合は、この時点でエチジウムブロマイドを最終濃度が 0.5  $\mu$ g/mL になるように添加します。この場合、200 mL のゲル溶液に対して 10 mg/mL のストックエチジウムブロマイド溶液を 10  $\mu$ L 入れます。
3. 電子レンジで数分間温め、フラスコをゆすって攪拌します(泡立たないように溶液を回転させます)。  
注意) フラスコおよび内部の溶液は非常に熱いので取り扱いには注意して下さい。
4. もう一度電子レンジで 1~2 分間温め、フラスコをゆすって攪拌します。  
補足) 溶液が透明になるまで繰り返します。
5. 自然に冷まし、50~55°C になったらゲル作製のトレーに静かに流し入れ、コームを挿します。  
補足) ゲル溶液の表面に気泡が生じた場合は、マイクロチップやキムワイプの先端で吸い取ります。
6. ゲルが固まるまで室温に静置します(通常は 30 分間~1 時間程度)。

7. 固まったゲルはすぐに使用するか、保存する場合は溶媒(この場合は TAE バッファー)と同じ溶液中に一時的に保存します。

### アガロース選択ガイド

製品番号	用途・特徴
<a href="#">A9539</a>	核酸の電気泳動、サザン、ノーザンブロットングに適用
<a href="#">A5093</a>	核酸の電気泳動用。SYBR Green やエチプロ染色で低バックグラウンド
<a href="#">A9414</a>	融点が高いのでゲルを溶かして DNA 回収するのに適しています
<a href="#">A4718</a>	2%ゲルで小さい DNA を泳動するのに用いられます
<a href="#">A7431</a>	DNA 10-1500 bp 用。製品番号 A2790 より割れやすい
<a href="#">A2790</a>	DNA 50-1000 bp 用
<a href="#">A2929</a>	DNA 10-2000 kb 用。パルスフィールド電気泳動用
<a href="#">A3054</a>	染色体 DNA 用。パルスフィールド電気泳動用

## ローディングバッファーの調製(DNAの電気泳動用)

アガロースゲル電気泳動または非変性のポリアクリルアミドゲル電気泳動に使用することができます。

- ・アガロースゲル電気泳動の場合  
プロモフェノールブルーは 300 bp 付近、キシレンシアノール FF は 4 kb 付近に現れます。
- ・ポリアクリルアミドゲル電気泳動の場合  
プロモフェノールブルーは 45~460 bp 付近、キシレンシアノール FF は 15~100 bp 付近に現れます(ゲル濃度により変化)。

目的の DNA が近いサイズになる場合は、色素を含まないローディングバッファーを用意します。

ローディング溶液	製品番号	10 mL 用	組成
プロモフェノールブルー (BPB)	<a href="#">B8026</a>	2.5 mg	0.25% (w/v)
スクロース (シヨ糖)	<a href="#">S0389</a>	4.0 g	40% (w/v)
キシレンシアノール FF	<a href="#">X4126</a>	2.5 mg	0.25% (w/v)
【オプション】 0.5 M EDTA ニナトリウム溶液	<a href="#">E7889</a>	20 µL	1 mM
【オプション】 10% SDS 溶液	<a href="#">L4522</a>	500 µL	0.5% (w/v)
【オプション】 フィコール	<a href="#">F2637</a>	1.5 g	15% (w/v)
【オプション】 グリセロール	<a href="#">G6279</a>	3.0 g	30% (w/v)

### ローディング溶液の調製例(10 mL用)

2.5 mg のプロモフェノールブルー、2.5 mg のキシレンシアノール FF、4 g のシヨ糖を数 mL の滅菌した純水で溶かし、10 mL にメスアップします。

溶液は 2-8°C で保存可能です。

電気泳動に使用するときには、サンプル:ローディングバッファー=4~5:1 の比率で混ぜて泳動します。

### (オプション)

核酸の分解を防ぐために EDTA を加えることがあります。

DNA-タンパク質の影響によるバンドの乱れを抑えるため SDS を加えることもあります。

ショ糖の代わりにフィコール(最終濃度 15%)またはグリセロール(最終濃度 30%)を使用することもできます。

### 調製済みローディング溶液

#### アガロースゲル電気泳動、非変性ポリアクリルアミド電気泳動用

製品番号	G7654	G2526
組成		
プロモフェノールブルー	0.25%	0.05%
キシレンシアノール FF	0.25%	なし
スクロース (ショ糖)	40%	40%
EDTA	なし	0.1 M, pH 8.0
SDS	なし	0.5%
使用量(製品:サンプルの比率)	1:4~5	1:2~5

## DEPC処理水の調製

DEPC(Diethyl pyrocarbonate)は核酸分解酵素の阻害作用があり、RNA サンプルの分解を防ぐために DEPC 処理した水が使用されます。一般的な使用濃度は 0.1%(v/v)です。

使用する物質	製品番号	1 L 用
DEPC (ジエチルピロカーボネート)	<a href="#">D5758</a>	1 mL

1. 1L の純水に 1 mL の DEPC を加え、スターラーなどでよく攪拌します。  
補足) DEPC はすぐに溶けないので、数時間~オーバーナイトで攪拌します。
2. DEPC の粒が見えなくなったら、121°C で 15 分間オートクレーブします。  
補足) オートクレーブ処理によって DEPC は分解されます。

DEPC は有害性が指摘されているので、手袋などの保護具を着用して下さい。

### DEPC 処理水の代わりに

分子生物学用グレード 水 製品番号 [W4502](#)

0.1 μm フィルターろ過処理済み

Dnase, RNase, プロテアーゼ検出レベル以下

# プロトコール

## 大腸菌プラスミドの抽出 アルカリ-SDS法(アルカリミニプレップ)

### 概要

少量の大腸菌培養液(1~2 mL)からプラスミドを回収する方法のひとつに、アルカリ SDS 法(アルカリミニプレップ法、アルカリ溶解法)が知られています。この方法により得られるプラスミド DNA は、アガロースゲル電気泳動や制限酵素処理に用いることができます。

### 試薬の準備

自分で調製する場合	製品番号	使用量	調製済みの試薬を使う場合	製品番号
水酸化ナトリウム	<a href="#">S8045</a>	20.0 g	5 N 水酸化ナトリウム溶液	<a href="#">S8263</a>
EDTA 二ナトリウム二水和物	<a href="#">E5134</a>	18.6 g	0.5 M EDTA 二ナトリウム溶液	<a href="#">E7889</a>
SDS	<a href="#">L3771</a>	1 g	10% SDS 溶液	<a href="#">L4522</a>

#### 5 N 水酸化ナトリウム(NaOH)溶液: 100 mL調製

- 準備 1 約 70 mL の純水をビーカーに入れ、水酸化ナトリウム 20.0 g を加え、スターラーなどを用いて完全に溶かします。
- 準備 2 100 mL になるように純水でメスアップします。  
水酸化ナトリウム溶液はガラス容器での保存を避け、ポリプロピレンなどのプラスチック容器で保存して下さい。

#### 0.5 M EDTA溶液(pH 8.0): 100 mL調製

- 準備 1 18.6 g の EDTA・二ナトリウム・二水和物(EDTA・2Na・2H<sub>2</sub>O)を 80 mL の純水に溶かします。
- 準備 2 1 の溶液を攪拌しながら pH を測定し、水酸化ナトリウムを少しずつ加え、pH を 8.0 付近に近づけます。
- 準備 3 pH が 8.0 に近づいたら、5N 水酸化ナトリウム溶液を少しずつ加え、pH を 8.0 に合わせます。
- 準備 4 純水で 100 mL にメスアップします。

#### 10% SDS溶液: 10 mL調製:

- 準備 1 g の SDS を 10 mL の水に溶解します。

### 溶液 I, II, III の調製

使用する試薬	製品番号	使用量
グルコース	<a href="#">G7528</a>	0.9 g
1M トリス塩酸バッファー, pH 8.0	<a href="#">T2694</a>	2.5 mL
0.5 M EDTA 二ナトリウム溶液	<a href="#">E7889</a>	2 mL
5 M 酢酸カリウム溶液 または粉の酢酸カリウム	<a href="#">95843</a> <a href="#">P1190</a>	60.0 mL 29.5 g
酢酸	<a href="#">01-0280</a>	11.5 mL

#### 溶液 I の調製: 100 mL 用 (4°Cで保存可能)

- 準備 1 約 90mL の純水で 0.9 g のグルコースを溶かします。
- 準備 2 この溶液に、1M トリス塩酸バッファー 2.5 mL と 0.5 M EDTA 溶液(pH 8.0) 2 mL を混ぜ、純水で 100 mL にメスアップします。  
最終濃度は、50 mM グルコース、25 mM Tris-HCl、10 mM EDTA になります。

**溶液Ⅱの調製:** 10 mL 用 (用時調製。使用前まで室温に置きます。)

準備 1 約 9 mL の水に 10N 水酸化ナトリウム溶液※を 0.2 mL、10% SDS 溶液を 1 mL 加え、水で 10 mL にメスアップします。

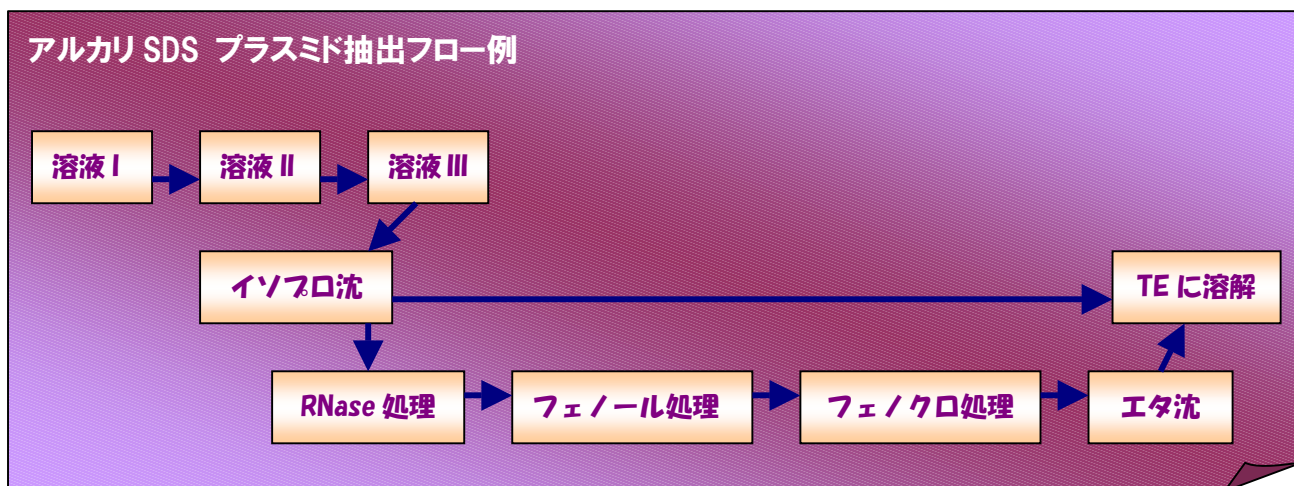
※5N の水酸化ナトリウム溶液を用いる場合は 0.4 mL。

最終濃度は、0.2 N 水酸化ナトリウム、1%(w/v) SDS になります。

**溶液Ⅲの調製:** 100 mL 用 (オートクレーブ後、4℃で保存可能)

準備 1 5Mの酢酸カリウム溶液※60.0 mLと酢酸(製品番号01-0280)11.5 mL、純水 28.5 mLを混ぜます。

※ 粉の酢酸カリウムを用いる場合は、29.5 gの酢酸カリウム(製品番号P1190)を溶解して、純水で 100 mLにメスアップします。



培養 1 プレート培地(プラスミドに適した抗生物質を含む)に大腸菌を画線培養します(数時間～オーバーナイト、37℃)。LB 培地が一般的によく用いられます。

培養 2 適した抗生物質を含む培地 2 mL を 15 mL プラスチックチューブ(フタあり)に無菌的に分注します。

培養 3 滅菌したつまようじ(または白金耳)を用いて 1 のプレートからシングルコロニーをピックし、2 の培地に大腸菌を植えます。

培養 4 37℃のウォーターバスで数時間～オーバーナイト、激しく振とうしながら培養します。

容器は完全に密封ないようにします(ただしウォーターバスの水が入らないように注意)

手順 1 プラスミドの抽出を行う前に、**溶液Ⅰ**と**溶液Ⅲ**をあらかじめ氷上に置き冷やしておきます(溶液Ⅱは冷やさないで下さい)。

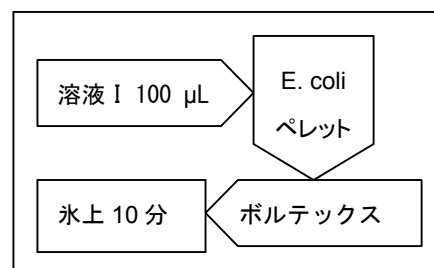
溶液Ⅱは用時調製して下さい。

手順 2 培養した大腸菌を 1.5 mL マイクロ遠心チューブに移し、15,000 rpm、1 分間室温で遠心し、上清をアスピレーターなどを用いて捨てます。

手順 3 入りきらなかった大腸菌を 5 と同じチューブに入れ、同様に遠心して上清を捨てます。

手順 4 大腸菌のペレットに冷やした 100  $\mu$ L の溶液Ⅰを入れ、チューブのフタを閉めてボルテックスまたはピペッティングによってよく混ぜ、氷上で 10 分間静置します。

溶液Ⅰを入れると白濁した溶液になります。



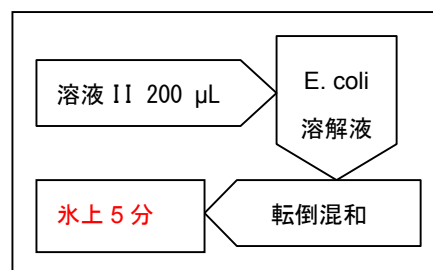


手順 5 4 のチューブに**常温**の溶液 II 200  $\mu\text{L}$  を添加し、チューブのフタを閉めてやや穏やかに数回(6~8 回)転倒混和し、氷上で 5 分間静置します。

溶液 II を入れると粘り気のあるやや透明な液体になります。

注意: ボルテックスは行わないで下さい。激しく混ぜすぎると最終産物にゲノム DNA が混入することがあります。

5 分間以上放置しないで下さい。長時間のアルカリ処理はプラスミドを不可逆的に変性させ、その後の実験に使用できなくなることがあります。



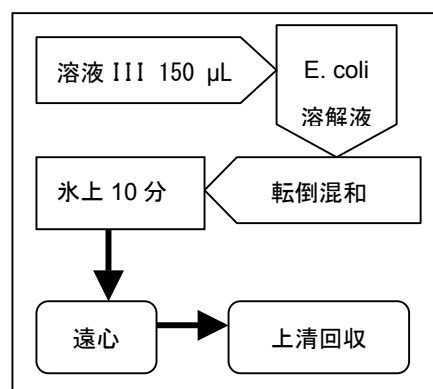
手順 6 5 のチューブに冷やした 150  $\mu\text{L}$  の溶液 III を添加し、穏やかに数回(4~6 回)転倒混和し、氷上で 10 分間静置します。

白い沈殿物(または浮遊物)と透明な液体になります。

手順 7 15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、生じた白い物質を沈殿させます。沈殿が不完全な場合は、遠心時間を延長します。

手順 8 マイクロピペットを用いて上清を新しい 1.5 mL マイクロ遠心チューブに移します。その際、沈殿を吸い取らないように注意します。

手順 9 回収した溶液と等量のイソプロピルアルコール(2-プロパノール)を添加し、フタを閉めてやや激しく数回転倒混和し、室温で 2 分間静置します。



手順 10 15,000 rpm、室温で 10 分間遠心し(核酸の白いペレットが沈殿します)、上清をアスピレーターまたはマイクロピペットを用いて捨てます。

手順 11 70%エタノールを 1 mL 添加しペレットをリンスします。  
(フタを閉めて穏やかに転倒混和するか軽くボルテックス)

核酸の白いペレットがチューブの底から塊のままはがれるように混合します。

手順 12 15,000 rpm、室温で 2 分間遠心して再びペレットにし、上清をアスピレーターまたはマイクロピペットを用いて捨てます。

一度上清を取り除いた後、軽く数秒間遠心して、再度マイクロピペットを用いてエタノールを除去すると、エタノールが取り除きやすくなります。

手順 13 フタを開けてチューブをさかさまに立てた状態で乾燥させるか、デシケーターを用いて乾燥させます。

手順 14 ペレットが完全に乾いた後、50~100  $\mu\text{L}$  の TE バッファーを添加し、ピペッティングまたはボルテックスによって完全に溶解します。

この時点でも RNase 処理、フェノール処理、フェノクロ処理を行うことができます。

### オプション (きれいなプラスミド DNA を取る場合)

手順 13 の後から

1. 風乾した DNA の沈殿に TE バッファー 100  $\mu\text{L}$  と 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase 溶液 1  $\mu\text{L}$  を添加し、37°C のウォーターバスで 1 時間処理
2. フェノール抽出 (後述レシピ参照)
3. フェノールクロロホルム抽出 (後述レシピ参照)
4. エタノール沈殿し、TE バッファーまたは水に溶解 (後述レシピ参照)

TE バッファーに溶解後のプラスミドは-20°Cで長期間保存可能です。




**じっけんレシピ**

**★大腸菌プラスミド精製キットの紹介★**

シリカをベースにしたカラムによって、迅速・簡単にプラスミドを精製することができます。  
フェノールやクロロホルムは使用しません。

<b>GenElute プラスミド抽出キット</b>			
<b>ミニフレックス</b>		1~5 mL の大腸菌からスタート	
製品番号	<a href="#">PLN10</a>	10 回分	洗浄は遠心方式のみ
	<a href="#">PLN70</a>	70 回分	
	<a href="#">PLN350</a>	350 回分	

<b>GenElute HP プラスミド抽出キット</b>					
洗浄は吸引方式と遠心方式のどちらにも対応しています					
<b>ミニフレックス</b> 50 mL の大腸菌からスタート			<b>マキシフレックス</b> 150 mL の大腸菌からスタート		
製品番号	<a href="#">NA0200S</a>	4 回分	<a href="#">NA0300S</a>	4 回分	
	<a href="#">NA0200</a>	25 回分	<a href="#">NA0300</a>	10 回分	
			<a href="#">NA0310</a>	25 回分	

<p><b>吸引方式の場合・・・</b></p> <p>バキュームマニホールドが別途必要です(製品番号VM20など)</p>	
--	--

<b>GenElute HP エンドトキシンフリープラスミド抽出キット★</b>			
<b>マキシフレックス</b>		150 mL の大腸菌からスタート	
製品番号	<a href="#">NA0400S</a>	4 回分	吸引方式と遠心方式のみ
	<a href="#">NA0400</a>	10 回分	
	<a href="#">NA0410</a>	25 回分	

★得られるプラスミドにはエンドトキシンがほとんど含まれないため、トランスフェクションに最適です。

## フェノール抽出

フェノールはタンパク質を溶解するため、DNA 溶液中のタンパク質除去に用いられます。

RNase 処理した DNA 溶液から RNase を取り除くときなどに使用されます。

フェノールは水溶性があるため、微量のフェノールが水層に溶け込みますが、クロロホルムを用いるとフェノールを除去できます。そのため、フェノールによる単独の抽出を行う場合は続けてフェノールクロロホルム抽出を行うか、または、フェノールによる単独の抽出をせずにフェノールクロロホルム抽出を行うこともあります。

飽和フェノール溶液	製品番号
【DNA 精製の場合】中性飽和フェノール	<a href="#">P4557</a>
【RNA 精製の場合】酸性飽和フェノール	<a href="#">P4682</a>

### フェノール抽出

- DNA 溶液に対し等量の中性飽和フェノール溶液 (pH 8.0) を添加し、チューブのフタをよく閉めて激しくボルテックスまたは転倒混和を 10~20 秒程度行い、均等に混ぜます。
- 最高速度 (12,000 x g 程度)、4°C で 2 分間遠心します。遠心後に溶液は 3 層 (上から透明の水層、白い微量のタンパク質層、黄色のフェノール層) に分離します。  
補足) 最高速度でも分離してこない場合は遠心時間を延長して下さい。
- マイクロピペットなどを用い、上層 (透明の水層) を新しいチューブに回収します。その際、中間層 (白いタンパク質の層) および下層 (黄色のフェノール層) は取り込まないように注意して下さい。チューブを斜めに傾けてピペット先端が壁面に付かないように操作します。

## フェノールクロロホルム抽出

DNA の場合は中性の飽和フェノール溶液 (pH 8.0) を用います。

RNA の場合は水飽和フェノール溶液を用います。

### フェノールクロロホルム抽出

- DNA 溶液に対し等量の中性フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール溶液 (25:24:1) を添加し、チューブのフタをよく閉めて激しくボルテックスまたは転倒混和を 10~20 秒程度行い、均等に混ぜます。
- 最高速度 (12,000 x g 程度)、4°C で 2 分間遠心します。遠心後に溶液は 3 層 (上から透明の水層、白い微量のタンパク質層、黄色のフェノール層) に分離します。  
補足) 最高速度でも分離していない場合は遠心時間を延長して下さい。
- マイクロピペットなどを用い、上層 (透明の水層) を新しいチューブに回収します。その際、中間層 (白いタンパク質の層) および下層 (黄色のフェノール層) は取り込まないように注意して下さい。チューブを斜めに傾けてピペット先端が壁面に付かないように操作します。  
回収した DNA 溶液をアルコール沈殿 (エタノール沈殿) などで濃縮すると使いやすい濃度になります。

#### DNA 抽出用フェノールクロロホルム

Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1

Saturated with 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA

製品番号 [P3803](#) 一般的な核酸抽出用

製品番号 [P2069](#) DNA抽出に最適化※

※平衡化用に 1 M トリス塩酸バッファー pH 8.0 が付属

#### RNA 抽出用フェノールクロロホルム

Phenol:Chloroform 5:1

製品番号 [P1944](#)

## アガロースゲルからのDNA回収法

アガロースゲル電気泳動を行ったゲル内から DNA を回収する方法として、あらかじめゲルを低融点のアガロースで作製し、電気泳動後にフェノールクロロホルム抽出を行うかアガラゼ (agarase) 処理する方法が知られています。

または、スピнкаラムを用いてアガロースゲルから DNA を回収する製品 (製品番号 56500、56501) があります。このスピнкаラムは低融点でない通常のアガロースゲルからも DNA を回収することができ、100 bp~10 kb の DNA を約 10 分で回収できます。

製品番号 56500 はアガロースゲルから、製品番号 56501 はエチジウムブロマイド (EtBr) を含むアガロースゲルから DNA を回収できます。

アガロースゲルからの DNA 回収用スピнкаラム	製品番号
エチプロを含むアガロースゲル用	<a href="#">56501</a>
エチプロを含まないアガロースゲル用	<a href="#">56500</a>
TE バッファー	<a href="#">T9285</a>

### 製品番号 56500 および 56501 の使用方法 (共通)

1. GenElute Agarose Column を付属のチューブに差し込みます。
2. 100  $\mu$ L の TE バッファー (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA) または分子生物学用の水をカラムに入れます。
3. フタを閉め、最高速度 (12,000-16,000 x g) で 5~10 秒間遠心して洗浄します。  
注意) 洗浄したカラムは乾かさないようにして下さい。洗浄は使用の直前に行い、洗浄の遠心は 10 秒間以上行わないで下さい。
4. 溶出液を捨て、スピнкаラムを付属の新しいチューブに移します。
5. UV トランスイルミネーターなどを用いて目的の DNA バンドを確認し、アガロースゲルから目的のバンドを含むゲルを切り出し、洗浄したカラムに入れます。  
注意) 余分なアガロースを含まないように切り出すと、より濃縮された DNA 溶液が得られます。また、ゲルのスライスをさらに細かく刻んでからカラムに入れると DNA の回収効率が向上します。
6. スピнкаラムを最高速度で 10 分間遠心します。得られた DNA はそのまま各実験 (ライゲーション、PCR、制限酵素処理、PCR、ラベリング、ハイブリダイゼーション) に使用できます。2-8°C または -20°C で保存可能です。

オプション: 得られた DNA 溶液はエタノール沈殿によって濃縮することもできます。

エチジウムブロマイドは有害性が指摘されていますので、手袋など防護して取り扱って下さい。UV トランスイルミネーターを使用する際は UV 光から眼を防護するためメガネを着用して下さい。

## DNA の濃縮

### エタノール沈殿 (エタ沈)

水溶液中 (水または TE バッファーなど) の核酸は、エタノールなどのアルコールによる水和性の低下とナトリウムなどの塩による作用によって沈殿します。この性質を利用して核酸を沈殿させ、再び少量のバッファーに溶解することで、濃度の高い核酸を得ることができます。

使用する物質	製品番号
エタノール	<a href="#">09-0770</a>
TE バッファー	<a href="#">T9285</a>
3 M 酢酸ナトリウム溶液	<a href="#">71196</a>
【オプション DNA 沈殿用キャリアー】グリコーゲン	<a href="#">G1767</a>
【オプション DNA 沈殿用キャリアー】GenElute LPA	<a href="#">56575</a>

酢酸ナトリウム(最終濃度 0.3 M)の代わりに、酢酸アンモニウム(最終濃度 2.0 M)、塩化リチウム(最終濃度 0.8 M)または塩化ナトリウム(最終濃度 0.2 M)を用いることもできます。

1. TE バッファーまたは水に溶解している DNA 溶液に対し、0.1 倍量の 3.0 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)と 2.5 倍量のエタノールを加えます。

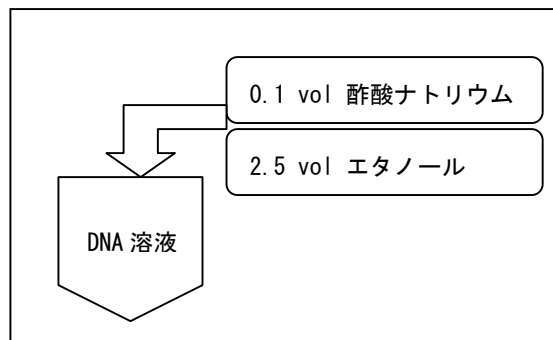
補足) DNA が TE バッファーまたは水以外に溶解している場合 (DNA 溶液に高濃度の塩が含まれている場合)は、添加する酢酸ナトリウムの量を調製する必要があります(最終濃度で 0.3 M)。

2. 転倒混和または軽くボルテックスしてから、氷上、-20℃または -80℃で 10~15 分間静置します。

補足 1) 含まれる DNA が微量の場合は時間を延ばします(1 時間~オーバーナイト)。

補足 2) 含まれる DNA が微量の場合、DNA の沈殿を助けるためのキャリアーとしてグリコーゲン(使用濃度 40~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )などを添加することもあります。

3. 4 °C、15,000 rpm(または最高速度)で 10 分間(沈殿が少ない場合は 10 分間以上)遠心します。
4. マイクロピペットを用いてペレットを乱さないように上清を取り除きます。
5. 70%エタノール 1 mL を添加してペレットをリンスし、4 °C、15,000 rpm(または最高速度)で 2 分間遠心し、上清をマイクロピペットを用いて除去します。  
補足) 一度上清を取り除いた後、軽く数秒間遠心して、再度マイクロピペットを用いてエタノールを除去すると、エタノールが取り除きやすくなります。
6. チューブ開いたままにさかさまに静置するか、デシケーターを用いて残ったエタノールを乾燥させます。
7. DNA ペレットを TE バッファー(pH 8.0)または水で再懸濁します。



## イソプロパノール沈殿(イソプロピルアルコール沈殿)

エタノール沈殿と同様にイソプロパノール(イソプロピルアルコール)でも核酸の沈殿は可能です。エタノールに比べて添加する量が少ないため、小さい容器に核酸が入っている場合に便利です。

使用する物質	製品番号
イソプロパノール (2-プロパノール; イソプロピルアルコール)	<a href="#">I9516</a>
3 M 酢酸ナトリウム溶液	<a href="#">71196</a>
【オプション DNA 沈殿用キャリアー】グリコーゲン	<a href="#">G1767</a>

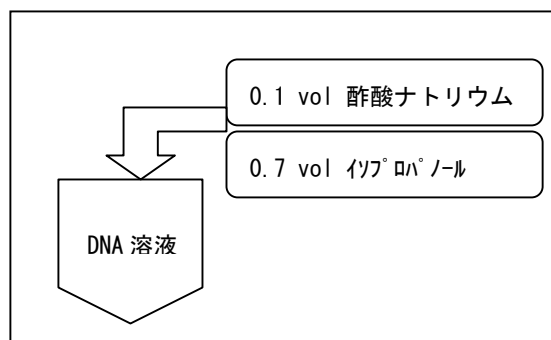
1. TE バッファーまたは水に溶解している DNA 溶液に対し、0.1 倍量の 3.0 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)と 0.7 倍量のイソプロパノールを加えます。

補足) DNA が TE バッファーまたは水以外に溶解している場合 (DNA 溶液に高濃度の塩が含まれている場合)は、添加する酢酸ナトリウムの量を調製する必要があります(最終濃度で 0.3 M)。

2. 混合した溶液を氷上または -80℃で 10~15 分間静置します。

補足) 含まれる DNA の量が十分ある場合はこの手順を省くこともできますが、DNA が微量の場合は時間を延長(30 分間~オーバーナイト)します。

3. よく転倒混和またはボルテックスして、4 °C、15,000 rpm(または最高速度)で 30 分間以上遠心します。
4. マイクロピペットを用いてペレットを乱さないように上清を取り除きます。
5. 70%エタノール 1 mL を添加してペレットをリンスし、4 °C、15,000 rpm(または最高速度)で 2 分間遠心し、上清をマイクロピペットを用いて除去します。  
補足) 一度上清を取り除いた後、軽く数秒間遠心して、再度マイクロピペットを用いてエタノールを除去すると、エタノールが取り除きやすくなります。



- チューブ開いたままにさかさまに静置するか、デシケーターなどを用いて残ったエタノールを乾燥させます。
- DNA ペレットを TE バッファー (pH 8.0) または水で再懸濁します。

## ポリエチレングリコール沈殿 (PEG 沈殿)

ポリエチレングリコール (PEG) は水溶液中の DNA を凝集し、沈殿させることができます。RNA は PEG で凝集しにくいいため、PEG 沈殿によって RNA の混入が少ない DNA を得ることができます。

- DNA 溶液と等量の 13% PEG 溶液 (0.8M 塩化ナトリウム含有) を加え、ボルテックスしてよく混ぜます。
- 氷上で 1 時間静置します。
- 最高速度 (15,000 rpm) で 4°C、20 分間遠心し、上清をマイクロピペットを用いて除去します。  
補足) 手順 3 の後、DNA ペレットを適量の TE バッファーに溶解してフェノールクロロホルム抽出～エタノール沈殿を行う方法もあります。
- 70%エタノール 1mL を加えて沈殿をリンスします。
- 最高速度で 4°C、2 分間遠心し、上清を捨てます。  
補足) 一度上清を取り除いた後、軽く数秒間遠心して、再度マイクロピペットを用いてエタノールを除去すると、エタノールが取り除きやすくなります。
- チューブ開いたままにさかさまに静置するか、デシケーターなどを用いて残ったエタノールを乾燥させます。
- 適量の TE バッファーまたは水に溶解し、そのまま使用するか 2-8°C または -20°C で保存します。

## RNA の濃縮 エタノール沈殿

水溶液中の核酸は、エタノールなどのアルコールによる水和性の低下とナトリウムなどの塩による作用によって沈殿します。この性質を利用して核酸を沈殿させ、再び少量のバッファーに溶解することで、濃度の高い核酸を得ることができます。

使用する物質	製品番号
エタノール	<a href="#">09-0770</a>
3 M 酢酸ナトリウム溶液	<a href="#">71196</a>

- RNA の水溶液に対し 0.1 倍量の 3.0 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と 2.5 倍量のエタノールを加えます。
- 転倒混和または軽くボルテックスしてから、氷上、-20°C または -80°C で 30 分間静置します。  
補足 1) 含まれる RNA が微量の場合は時間を延ばします (1 時間～オーバーナイト)。  
補足 2) 含まれる RNA が微量の場合、RNA の沈殿を助けるためのキャリアーとしてグリコーゲン (使用濃度 40～50  $\mu$ g/mL) などを添加することもあります。
- 4 °C、15,000 rpm (または最高速度) で 10 分間 (沈殿が少ない場合は 10 分間以上) 遠心します。
- マイクロピペットを用いてペレットを乱さないように上清を取り除きます。
- 70%エタノール 1 mL を添加してペレットをリンスし、4 °C、15,000 rpm (または最高速度) で 2 分間遠心し、上清をマイクロピペットを用いて除去します。  
補足) 70%エタノールの代わりに 80% または 100% エタノールを用いることもできます。また、一度上清を取り除いた後、軽く数秒間遠心して、再度マイクロピペットを用いてエタノールを除去すると、エタノールが取り除きやすくなります。
- クリーンベンチ内でチューブ開いたままにさかさまに静置するか、デシケーターを用いて残ったエタノールを乾燥させます。
- RNA ペレットを RNase フリーの水 (DEPC 処理水など) で再懸濁します。RNA 溶液は -70°C で保存可能です。RNase のコンタミに注意しながら行って下さい。



## 核酸の検出 吸光度による検出・定量

DNA や RNA は 260 nm の吸光度を測定することで量(濃度)を算出することができ、260 nm と 280 nm の比率が純度の指標になります。260 nm の吸光度は A260 または OD260 と表記されます。二本鎖 DNA は 260 nm の吸光度 1 が約 50  $\mu\text{g/mL}$  に相当し、一本鎖 DNA および RNA は 260 nm の吸光度 1 が約 33  $\mu\text{g/mL}$  に相当します。この数値を基に核酸の濃度を概算することができます。ただし、実際には核酸を構成している塩基(A, G, C, T)のミリモル吸光係数(millimolar extinction coefficient)はそれぞれ異なるので、オリゴヌクレオチドなど短い配列の場合は正確に算出する必要があります。

核酸の吸光とタンパク質の吸光を示す 280 nm の吸光度の比率(A260/A280)を算出することで、およその核酸の純度を知ることができます。通常、A260/A280 は 1.8~2.0 を示します。これよりも低い場合はタンパク質またはフェノールの混入が考えられます。

## 核酸の検出 エチジウムブロマイドによる染色・検出

エチジウムブロマイド(臭化エチジウム、EtBr)は核酸を染色し、電気泳動した核酸の検出によく用いられ、UVトランスイルミネーターによって励起・検出ができます。アガロースゲル内の DNA を染色する場合、使用濃度は 0.5  $\mu\text{g/mL}$  程度です。

使用する物質	製品番号
エチジウムブロマイド (EtBr) 水溶液 10 mg/mL	<a href="#">E1510</a>

エチジウムブロマイドは有害性が指摘されていますので、手袋など防護して取り扱って下さい。

UVトランスイルミネーターを使用する際は UV 光から眼を防護するためメガネを着用して下さい。