

1. ヒシからの DNA 抽出

TENS-U (8M)

1M Tris/HCl pH7.5	2 ml
5M NaCl	5 ml
0.5M EDTA	4 ml
10% SDS	2 ml
Urea	96.1 g

DW で 200ml.室温保存

操作

- 1) ヒシを切って、500ul TENS-U に入れる (このまま室温保存可能)
↓
- 2) Proteinase K (10mg/ml)を 10ul 加え、37C で1夜消化
↓
- 3) フェノール/クロロフォルムを 500ul 加え、1時間緩やかに撹拌
↓
- 4) 遠心、上清を回収し、CIA を 500ul 加え、1時間緩やかに撹拌
↓
- 5) 12000rpm, 5min. 水槽を回収
↓
- 6) 3M NaOAc を 50ul 加える
↓
- 7) 100% EtOH を 1 ml 加え、-20C で 20 分
↓
- 8) 15000rpm, 5min.
↓
- 9) 70% EtOH で洗浄
↓
- 11) 風乾
↓
- 12) 200ul TE に溶解

2. DNeasy Tissue Kit (Qiagen)

注意事項

- 遠心分離は室温で行う
- ボルテックスは、5-10 秒行う

抽出前にすること

- Buffer ATL, AL が結晶を形成しないか確認し、結晶がある場合、55C にして溶かす
 - Buffer AW1, AW2 に指示された量のエタノールを加える
(エタノールを入れたら、蓋に×印を記入すること)
-

抽出手順

- 1) 組織（最大 25mg）を切除し、メス・カミソリで細切
1.5ml チューブに入れ、180ul Buffer ATL を加える
↓
- 2) 20ul proteinase K を加え、ボルテックス
組織が溶けるまで 55C に加温(1-3h, O.N.)
時々、ボルテックスして消化を進める
↓
- 3) 15 秒、ボルテックス
200ul Buffer AL を加え、ボルテックス。
↓
- 4) 70C, 10min 加温
↓
- 5) 200ul エタノールを加え、ボルテックス
↓
- 6) スピнкаラムを 2ml フタなし tube にセットし、サンプルを移す
8,000rpm で 1 分遠心
↓
- 7) スピнкаラムを 新しい 2ml フタなし tube にセット
500ul Buffer AW1 を加え、8,000rpm で 1 分遠心
↓
- 8) スピнкаラムを 新しい 2ml フタなし tube にセット
500ul Buffer AW2 を加え、14,000rpm で 3 分遠心
↓
- 9) 1.5 ml tube に移し、200ul Buffer AE をメンブレン上に滴下
1 分放置後、8,000 rpm で遠心
↓
- 10) もう一度、200ul Buffer AE をメンブレン上に直接のせ、1 分後、8,000 rpm で遠心