

# DNA を取り出したい

## 使用製品

Get *pure*DNA Kit-Cell, Tissue [GK03]

## I はじめに

ゲノム解析法の一つであるサザンブロット法、ゲノムライブラリーの作製およびPCRには、高純度のゲノム DNA を簡便かつ短時間に抽出することが求められる。Get *pure*DNA Kit-Cell, Tissue は、①細胞・動物組織細胞を溶解する、②溶解液から RNA およびタンパク質を除く、③エタノール沈殿により DNA を回収する、という3ステップで、培養細胞および動物組織から高純度のゲノム DNA を簡便に抽出できる。また、多量のサンプルからゲノムを抽出する際は、各試薬を比例倍量使用することにより対応可能である。本キットは、フェノール/クロロホルム、スピニングカラムを必要としない。抽出した DNA は制限酵素反応、PCR 反応等にそのまま使用できる。

## II 細胞または動物組織からの DNA 抽出

### 1. キット内容

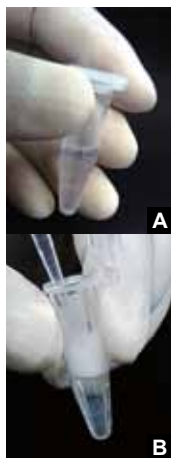
- ・ Lysis buffer 110 ml × 1
- ・ Proteinase K solution 1.05 ml × 2
- ・ RNase solution 0.5 ml × 1
- ・ Precipitation solution I 22 ml × 1
- ・ Precipitation solution II 22 ml × 1

### 2. キット以外に必要な試薬・機器類

- ・ エタノール (100%、70%)
- ・ PBS(細胞サンプルを処理する場合)
- ・ 1.5 ml 遠心チューブ
- ・ マイクロピペット及びチップ
- ・ 遠心分離機
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 65°C 恒温槽
- ・ ホモジナイザー (動物組織を処理する場合)

### 3. 操作方法

細胞  $3 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  cells を処理する場合



- 1) 細胞懸濁溶液を 1.5 ml 遠心チューブに入れる。200 x g、5 分間遠心分離後上澄みを除く。PBS 500  $\mu$ l で細胞を懸濁洗いした後、200 x g、5 分間遠心分離し上澄みを除去する。細胞ペレットを一旦 vortex (5 秒間) すると次の溶解操作が容易になる。(写真 A)
- 2) Lysis buffer 500  $\mu$ l および Proteinase K solution 10  $\mu$ l を添加し、細胞ペレットが溶解するまでピペティングする。細胞ペレットが完全に溶解したら 65°C で 10 分間インキュベートする。ピペティング開始直後、サンプル溶液の粘度が上昇するが、ピペティング操作を続けることで粘度は減少する。高粘度状態がなくなるまでピペティング操作を続ける (3 ~ 5 分程度)。(写真 B)



- 3) 室温に 2 分間静置後、RNase solution 2  $\mu$ l を加える。直ちに 10 秒間 vortex もしくは転倒混和し、室温に 2 分間静置する。(写真 C)
- 4) Precipitation solution I 100  $\mu$ l を加え、転倒混和もしくは 5 秒間 vortex する。Precipitation solution I を添加すると溶液は白濁する。(写真 D)
- 5) Precipitation solution II 100  $\mu$ l を加え転倒混和もしくは 5 秒間 vortex 後、室温に 2 分間静置する。Precipitation solution II を添加すると溶液はさらに白濁する。(写真 E)
- 6) 13,000 x g 以上で 5 分間遠心分離し、上澄みをピペットで新しい 1.5 ml チューブに移す。不溶物をピペットで吸引しないよう注意する。上澄みに沈殿物が混入している場合は、再度遠心操作を行って下さい。(写真 F)
- 7) 上澄みと同量のエタノールを加え転倒混和もしくは 5 秒間 vortex する。(写真 G)
- 8) 2,500 x g で 2 分間遠心分離し、上澄みをピペットで除去する。高回転、長時間の遠心は、DNA ペレットの溶解に長時間を要する原因となる。上澄みをピペットで除去する際に、DNA ペレットを吸い込まないように注意する。(写真 H)
- 9) DNA ペレットに 70% エタノールを 1 ml 加え転倒混和もしくは vortex 後、2,500 x g で 2 分間遠心分離し上澄みをピペットで除去する。高回転、長時間の遠心は、DNA ペレットの溶解に長時間を要しますので注意する。上澄みをピペットで除去する際に、DNA ペレットを吸い込まないように注意する。(写真 I)
- 10) DNA ペレットを TE buffer (10 mmol/l Tris, 1 mmol/l EDTA) 等に溶解する。(写真 J)

動物組織 25 ~ 30 mg を処理する場合

- 動物組織 25 ~ 30 mg を秤量し 1.5 ml 遠心チューブに入れ、Lysis buffer 400  $\mu$ l および Proteinase K solution 10  $\mu$ l を添加する。
- 55°C で組織が完全に溶解するまでインキュベートする。30 分毎にサンプル溶液をピペティングもしくは vortex する。完全に溶解するのに 2 ~ 3 時間要する。溶解時間は使用する組織により異なるが、通常 2 ~ 3 時間である。30 分毎にサンプル溶液をピペティング、あるいは vortex することにより、溶解時間を短縮できる。ホモジナイザーを使用する場合は、Step1 でサンプルに Lysis buffer 400  $\mu$ l および Proteinase K solution 10  $\mu$ l を添加後ホモジナイズし、65°C、10 分間インキュベートする。
- サンプル溶液を室温に 2 分間静置後、RNase solution 2  $\mu$ l を加える。直ちに 10 秒間 vortex もしくは転倒混和し、室温に 2 分間静置する。
- Precipitation solution I 80  $\mu$ l を加え、転倒混和もしくは 5 秒間 vortex する。Precipitation solution I を添加すると溶液は白濁する。
- Precipitation solution II 80  $\mu$ l を加え、転倒混和もしくは 5 秒間 vortex し、室温に 2 分間静置する。Precipitation solution II を添加すると溶液はさらに白濁する。
- 13,000 x g 以上で 5 分間遠心分離し上澄みをピペットで新しい 1.5 ml 遠心チューブに移す。不溶物をピペットで吸引しないよう注意する。上澄みに沈殿物が混入している際は、再度遠心操作を行う。
- 取り出した上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは 5 秒間 vortex する。
- 2,500 x g で 2 分間遠心分離し、上澄みをピペットで除去する。高回転、長時間の遠心は、DNA ペレットの溶解に長時間を要する原因となる。上澄みをピペットで除去する際に、DNA ペレットを吸い込まないよう注意する。
- DNA ペレットに 70% エタノールを 1 ml 加え転倒混和もしくは 5 秒間 vortex 後、2,500 x g で 2 分間遠心分離し上澄みをピペットで除去する。高回転、長時間の遠心は、DNA ペレットの溶解に長時間を要する原因となる。上澄みをピペットで除去する際に、DNA ペレットを吸い込まないよう注意する。
- DNA ペレットを、TE buffer (10 mmol/l Tris、1 mmol/l EDTA) 等に溶解する。

表 1 に上記操作によって得られる例を示す。図 1 に抽出した DNA とその制限酵素消化反応後の電気泳動の例を示す。

表 1 細胞、組織からの DNA 回収量とその純度の例

サンプル	回収量 ( $\mu$ g)	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
HeLa cell (1 × 10 <sup>7</sup> cells)	80 ~ 120	1.7 ~ 1.9
HeLa cell (1 × 10 <sup>8</sup> cells)	1,000 ~ 1,500	1.7 ~ 1.9
HL60 cell (1 × 10 <sup>7</sup> cells)	40 ~ 60	1.7 ~ 1.9
HL60 cell (1 × 10 <sup>8</sup> cells)	500 ~ 900	1.7 ~ 1.9
mouse liver (25 ~ 30 mg)	40 ~ 100	1.7 ~ 1.9
mouse brain (25 ~ 30 mg)	20 ~ 40	1.7 ~ 1.9
mouse kidney (25 ~ 30 mg)	50 ~ 60	1.7 ~ 1.9
mouse heart (25 ~ 30 mg)	20 ~ 25	1.7 ~ 1.9
mouse tail (25 ~ 30 mg)	40 ~ 60	1.7 ~ 1.9
rat liver (1 g)	2,000 ~ 2,500	1.7 ~ 1.9
rat brain (1 g)	600 ~ 800	1.7 ~ 1.9
rat kidney (1 g)	1,800 ~ 2,300	1.7 ~ 1.9
rat heart (0.8 ~ 0.9 g)	600 ~ 800	1.7 ~ 1.9
rat tail (10 cm)	2,500 ~ 3,500	1.7 ~ 1.9

1 2 3 4 5 6 7 8 9



図 2 マウス組織から抽出した DNA とその制限酵素消化反応後の電気泳動写真

Lane 1:  $\lambda$  Hind III  
Lane 2-5: mouse heart  
Lane 6-9: mouse kidney  
Lane 2, 6: undigested  
Lane 3, 7: BamHI digested  
Lane 4, 8: EcoRI digested  
Lane 5, 9: PstI digested

4. 注意事項

- Precipitation solution I は、多少濁っている場合もありますが、DNA の抽出には影響ありません。
- Precipitation solution I および II は、一旦開封するとボトルの口に白い結晶が析出する場合がありますが、DNA の抽出操作には影響ありません。また、RNase solution も濁っている場合がありますが、そのまま使用しても影響はありません。
- 遠心チューブの種類により、10,000 x g 以上の遠心が不可能な場合は、遠心時間を延長し、その遠心チューブの許容最高速度で遠心分離して下さい。
- Lysis buffer は 20°C 以下になると 2 層に分離、あるいは沈殿を生じることがあります。沈殿が生じた場合は 40 ~ 50°C で加温し、完全に溶解してから使用して下さい。また、開封後は室温で保存し、使用前に転倒混和して下さい。
- エタノール沈殿後など完全に上澄みを除去するために、除去の最終段階では、最小容量マイクロピペット (< 20  $\mu$ l) をご使用下さい。
- 細胞からの抽出の際、Lysis buffer, Proteinase K solution を添加後、インキュベートする前に細胞ペレットが完全に溶解するまでピペティングして下さい。
- 組織からの抽出の際、ホモジナイザーを使用する場合は、サンプルに Lysis buffer, Proteinase K solution を添加後、ホモジナイズして、65°C、10 分間インキュベートして下さい。