

MaXtract Low および High Density プロトコールとトラブルシューティング

有機溶媒抽出による核酸の回収率を改善

目次	ページ
プロトコール	
MaXtractLow および High Density を用いた標準的な DNA 抽出	2
低温融解アガロースゲルからの DNA 回収	4
M13 / ファージミド DNA の抽出	6
λ DNA の抽出	8
血液あるいは培養細胞からのゲノム DNA 抽出	10
マウス尾からのゲノム DNA 抽出	14
プラスミド DNA の抽出	16
RNA フリーのプラスミド DNA 抽出	18
トータル RNA の抽出	20
トラブルシューティング	23



プロトコール：MaXtract LowおよびHigh Densityを用いた標準的なDNA抽出

この操作は、ほとんどのDNA抽出アプリケーションで使用することができます。さらに特殊な用途に用いる追加プロトコールも本冊子に掲載されています。

表2に記載されているように、お客様のサンプル容量に合ったMaXtractチューブのサイズを選択してください。

表2. MaXtract Tubeのサンプル容量

MaXtract チューブ	サンプル容量	チューブの色
1.5 ml, MaXtract Low Density	100 ~ 500 μ l	Green
1.5 ml, MaXtract High Density	100 ~ 500 μ l	Yellow
2 ml, MaXtract Low Density	100 ~ 750 μ l	Green
2 ml, MaXtract High Density	100 ~ 750 μ l	Yellow
15 ml, MaXtract LowおよびHigh Density	1 ~ 6 ml	Clear*
50 ml, MaXtract LowおよびHigh Density	5 ~ 20 ml	Clear*

* MaXtract Low Densityは半透明； MaXtract High Densityは不透明です。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温（15 ~ 25℃）で行ないます。
- 混和のためにMaXtractサンプルをボルテックスしたり、高速シェーカーに入れしないでください。すべての混和ステップはマニュアルで行なうことが重要です。
- 遠心操作中にチューブがしっかりと支えられるように、適切な遠心アダプターを使用します。
- 15 mlおよび50 mlのMaXtractチューブの遠心操作の際に、最高遠心力が3,500 x gを超えないようにしてください。
- テキスト中、1.5 mlおよび2 mlのMaXtract Tube用には■、15 mlおよび50 mlのMaXtract Tubeには●で操作法を記載しています。

操作手順

1. 使用直前に、マイクロ遠心機を用いて12,000 ~ 16,000 x gで20 ~ 30秒 (■) あるいは通常の遠心機を用いて1,500 x gで1 ~ 2分間 (●) 遠心操作してMaXtract Low/High Densityをペレット化する。
2. 下の表に記載した量のサンプル溶液および等量の有機溶媒を、ステップ1で準備したMaXtractチューブに直接添加する。

MaXtractチューブ	サンプル容量
■ 1.5 ml	100 ~ 500 μ l
■ 2 ml	100 ~ 750 μ l
● 15 ml	1 ~ 6 ml
● 50 ml	5 ~ 20 ml

3. 水層と有機溶媒層が一瞬均一な懸濁液になるまで完全に混和する。
重要：ボルテックスで混和しないでください。
4. 12,000 ~ 16,000 x gで5分間 (■) あるいは1,500 x gで5分間 (●) 遠心して液層分離する。
水層と有機溶媒層の間にMaXtractゲルが境界層を形成します。微量のゲルがチューブの底に残ることがあります。2回目の抽出が必要で、チューブの最大容量を超えない場合には、2回目用の有機溶媒を同じチューブに添加し、混和、再遠心することができます。
5. 上層の核酸を含んだ水層をデカントあるいはピペティングにより新しいチューブに慎重に移す。
6. ダウンストリームのアプリケーションで推奨される方法に従って、塩類、アルコール、キャリア (必要に応じて) を添加して核酸を沈殿させる。

プロトコール：低温融解（LMP；Low Melting Point）アガロースゲルからのDNA回収

本操作は、2 mlのMaXtract Low Density チューブを用いて低温融解アガロースゲルからのDNA回収用に最適化されています。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。
- すべての有機溶媒は室温で使用します。

実験を始める前の準備事項

- 英語版 Handbook 38ページの説明に従ってTAEおよびTEバッファーを調製します。
- 10 Mの酢酸アンモニウム溶液を調製します。
- 有機溶媒抽出用に次の溶液を調製します。
 - Trisバッファー（pH 8.0）で飽和したフェノール
 - フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25:24:1）
 - クロロホルム：イソアミルアルコール（24:1）

操作手順

1. 1x TAE（Tris-acetate-EDTA）バッファーを用いてLMPアガロースゲルでDNAフラグメントの電気泳動を行なう。
TBE（Tris-borate-EDTA）ゲルの溶解は困難なので、TBEは推奨しません。
2. ゲルをエチジウムブロマイドで染色する。
3. ゲルを染色している間に、MaXtract Low Densityの入った2 mlチューブの重量を測定し、チューブを12,000 x gで20～30秒間遠心する。
4. 長波長の紫外線を照射してDNAを可視化し、鋭利なかみそりの刃で目的のバンドを慎重に切り出す。
5. ステップ3で準備したMaXtractチューブにゲル切片を移す。チューブの重量をもう一度測定して、ゲル切片の重量を計算する。
6. アガロースゲル切片の5倍容量（ミリグラム）に相当する量のTEバッファー（マイクロリッター）を添加し、65℃にセットしたサーモミキサーあるいはヒートブロックにアガロースゲル切片が溶解するまで5～10分間インキュベートする。
サーモミキサーが入手できない場合には、アガロースが融解するまでサンプルを2～3分ごとにゆっくりと攪拌します。
重要：ボルテックスで混和しないでください。

7. アガロースゲル切片が完全に溶解されるまでよく混和する。溶解したサンプルを室温（15～25℃）にもどし、サンプルに等量のTrisバッファー（pH 8.0）飽和フェノール溶液を添加する。サンプルが均一になるまでよく混和する。
重要：ボルテックスで混和しないでください。
8. 最高速度（マイクロ遠心機で12,000 x g以上）で2分間遠心操作して液層分離する。
遠心後に水層が濁っている場合には、等量のTrisバッファー飽和フェノール溶液（pH 8.0）を添加、混和、再遠心して抽出操作を繰り返します。
9. 新しい2 mlのMaXtract Low Densityチューブを12,000 x gで20～30秒間遠心操作する。
10. 上層の核酸を含んだ水層をデカントあるいはピペッティングにより、ステップ9で準備したMaXtractチューブに慎重に移す。
11. 等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25:24:1）を添加し、均一になるまで混和する。
重要：ボルテックスで混和しないでください。
12. 最高速度（マイクロ遠心機で12,000 x g以上）で2分間遠心操作して液層分離する。
13. 新しい2 mlのMaXtract Low Densityチューブを12,000 x gで20～30秒間遠心操作する。
14. 上層の核酸を含んだ水層をデカントあるいはピペッティングにより、ステップ13で準備したMaXtractチューブに慎重に移す。
15. 等量のクロロホルム：イソアミルアルコール（24:1）を添加し、均一になるまで混和する。
重要：ボルテックスで混和しないでください。
16. 最高速度（マイクロ遠心機で12,000 x g以上）で2分間遠心操作して液層分離する。
17. 上層の核酸を含んだ水層をデカントあるいはピペッティングにより新しいマイクロ遠心チューブに慎重に移す。
18. 0.25倍容量の10 M酢酸アンモニウムと2.5倍容量のエタノール（96～100%）をサンプルに添加し、よく混和する。
19. 室温で20分間インキュベートし、核酸をペレット化するために遠心、70%の冷却エタノールで2～3回洗浄、ペレットを空気乾燥して、適切なバッファーで再懸濁する。

プロトコール：M13 / ファージミド DNA の抽出

一本鎖 DNA を調製するための一般的なプロトコール (6, 7)* の効率は、MaXtract ゲルを使用することにより改善されることがあります (8)*。本操作は、15 ml の MaXtract Low Density チューブを用いて M13/ファージミド DNA の抽出用に至適化されています。

実験を始める前の重要事項

- 特別な記載がない限り、すべての遠心操作は室温 (15 ~ 25) で行ないます。
- すべての有機溶媒は室温で使用します。

実験を始める前の準備事項

- 英語版 Handbook 38 ページの説明に従って次の溶液を調製します。
 - LB
 - TE バッファー、pH 8.0
- 次の溶液を調製します。
 - 25 mg/ml カナマイシン水溶液 (ファージミド DNA のみ)
 - 20% PEG 8000/2.5 M NaCl
 - 3 M 酢酸ナトリウム、pH 5.2
- 有機溶媒抽出用に次の溶液を調製します。
 - Tris バッファー (pH 8.0) で飽和したフェノール
 - フェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール (25:24:1)
 - クロロホルム : イソアミルアルコール (24:1)

操作手順

1. ステップ 1a あるいは 1b に従って M13 ファージを増殖する。
 - 1a. M13 ssDNA を調製するために、2.5 ml のプレティング用細菌溶液 (5 ~ 7 時間培養後 4 で保管し、3 日以内の 50 ml 培養液) と 300 μ l の M13 ファージストック溶液 (1 x 10¹¹ pfu/ml) を混和し、室温で 5 分間インキュベートし、ファージをバクテリオファージのレセプターと相互作用させる。ファージ/細菌培養液を 250 ml の LB 培養液に添加し、37 で 5 ~ 7 時間インキュベートする。培養液の通気をよくするために十分に振とうする。
 - 1b. ファージミド ssDNA を調製するために、ファージミドをトランスフォームした細菌のコロニーを、3 ml の LB 培養液が入った 15 ml の培養チューブ中で懸濁する。ヘルパーファージ M13KO7 を最終濃度が 2 x 10⁷ pfu/ml になるように添加し、200 ~ 300 rpm で振とうしながら 37 で 1.5 時間インキュベート

* 英語版 Hand Book 40 ページの "References" 参照

- する。カナマイシン（25 mg/ml水溶液）を添加して、最終濃度を70 µg/mlにする。37 °Cで一晩（12～15時間）培養液をインキュベートする。
2. 全培養液を遠心チューブかボトルに入れて、4 °C、4,000 x gで20分間遠心操作してバクテリアをペレット化する。
 3. 上清を新しいチューブ/ボトルに入れ、4 °C、4,000 x gで20分間再遠心する。
 4. 上清を新しい遠心チューブに入れ、0.25倍容量の20% PEG 8000/2.5 M NaClを添加する。チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和後、15～25 °Cで20分間インキュベートする。
 5. 4 °C、15,500 x gで20分間遠心し、上清を捨てる。
廃棄する前に上清の量を測ります。チューブから上清を完全に取り除きます。
 6. 新しい15 mlのMaXtract Low Densityチューブを1,500 x gで1～2分間遠心操作する。
 7. ステップ5で取り除いた上清1 mlあたり50 µlのTEバッファー（pH 8.0）で、ペレットを再懸濁し、ステップ6で準備したMaXtractチューブに全サンプルを移す。
 8. 等量のTrisバッファー（pH 8.0）飽和フェノール液を、MaXtractチューブ中のサンプルに添加し、チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和する。1,500 x gで5分間遠心して液層を分離する。
 9. 等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25:24:1）を、MaXtractチューブ中のサンプルに添加し、チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和する。1,500 x gで5分間遠心して液層を分離する。
 10. 等量のクロロホルム：イソアミルアルコール（24:1）を、同じMaXtractチューブ中のサンプルに添加し、チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和する。1,500 x gで5分間遠心して液層を分離する。
 11. 最後の水層を新しい2 mlのコレクションチューブ（添付）にピペットで移す。25：1の無水エタノール：3 M酢酸ナトリウム（pH 5.2）の混合液を3倍容量添加してよく混和する。
 12. 室温で15～30分間インキュベート後、4 °C、12,000 x g以上で20分間遠心分離する。
 13. 0.5 mlの70%エタノールでペレットを2回洗浄後、空気乾燥する。
 14. ペレットを20～50 µlのTEバッファー（pH 8.0）で再懸濁する。

プロトコール：λ DNAの抽出

このプロトコールは、上清 450 μlあたり 15 ~ 20 μgの収量で高品質のλ DNA (λgt10) を精製することができます。MaXtract チューブは、他のλ DNA 精製法でも使用することができます(9)*。本操作は 15 mlのMaXtract LowおよびHigh Density チューブを用いたλ DNAの抽出用に至適化されています。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温 (15 ~ 25 °C) で行ないます。
- すべての有機溶媒は室温で使用します。

実験を始める前の準備事項

- 英語版 Handbook 38 ページの説明に従って次の溶液を調製します。
 - LB-MgSO₄ medium (MgSO₄を添加したL-broth培養液)
 - Top アガロース
 - SMバッファー
 - λ diluent
 - TEバッファー
- 次の溶液を調製します。
 - 1 mg/ml DNase I
 - 12.5 mg/ml RNase A
 - 20% SDS
 - 10 mg/ml proteinase K
 - 3 M 酢酸ナトリウム、pH 5.2
- 有機溶媒抽出用に次の溶液を調製します。
 - フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1)
 - クロロホルム：イソアミルアルコール (24:1)

操作手順

1. LB-MgSO₄ medium中の最適な植菌用バクテリア・ストック溶液 10mlを 37 °C、一晚培養する。
2. SMバッファー 0.1mlあたり 10⁵ pfu になるようにλファージストック溶液を希釈する。その後 0.1 mlのI希釈液と 0.1 mlの植菌用バクテリアを滅菌済みの培養チューブ (13 x 100 mm) 中で混和し、37 °Cで20分間ファージをバクテリアに吸収させる。

* 英語版 Hand Book 40 ページの "References" 参照

3. 45 ~ 50 °C で融解したトップアガロース 2.5 ml をチューブに入れる。よく混和して、100 mm の LB-MgSO₄ プレートに注ぐ。トップアガロースをセットし、37 °C で 8 時間インキュベートする。
8 時間後にブランクが見えるようになります。
4. 4 °C で 15 分間プレートを冷やす。3 ml の λ 希釈液をプレートに入れ、ゆっくり振盪しながら 4 °C で一晩インキュベートする。
5. ファージの入った λ 希釈液を遠心チューブに移し、4 °C 、 4,000 x g で 10 分間遠心操作する。
このステップではデブリスがペレット化します。
6. 15 ml の MaXtract Low あるいは High Density チューブを 1,500 x g で 1 ~ 2 分間遠心操作する。
7. ステップ 6 で準備した MaXtract チューブにステップ 5 の上清 450 μl を移す。4.5 μl の DNase I (1 mg/ml) および 2.0 μl の RNase A (12.5 mg/ml) を添加する。混和後、37 °C で 30 分間インキュベートする。
8. 11.5 μl の 20% SDS および 4.5 μl の proteinase K (10 mg/ml) をサンプルに添加後、混和、37 °C で 30 分間インキュベートする。
9. 500 μl のフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール (25:24:1) を添加し、チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和する。1,500 x g で 5 分間遠心して液層を分離する。
10. 同じ MaXtract チューブでステップ 9 を繰り返す。
11. 500 μl のクロロホルム : イソアミルアルコール (24:1) を同じ MaXtract チューブに添加し、チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和する。1,500 x g で 5 分間遠心して液層を分離する。
12. 最後の水層を新しい 1.5 ml のコレクションチューブに移す。45 μl の酢酸ナトリウム (3M、pH 5.2) と 500 μl の 100% イソプロパノールをサンプルに添加する。混和後、15 ~ 25 °C で 15 分間インキュベートする。
13. 12,000 x g 以上で 20 分間遠心操作する。上清を捨て、70% エタノールでペレットを 2 回洗浄後、乾燥する。
14. DNA を 20 ~ 50 μl の TE バッファーで再懸濁する。

プロトコール：血液あるいは培養細胞からのゲノムDNAの抽出

このプロトコールでは、スタートサンプルの血液と培養細胞で核分離ステップが異なります。血液からの核分離には、ステップ1～5の後、ステップ13に続けます。培養細胞からの核分離には、ステップ6～12の後、ステップ13に続けます。両スタートサンプル共に、ステップ11およびそれ以降のステップは同じで、核の溶解およびDNAからのタンパク質除去、タンパク質抽出、DNA沈殿について記述しています。本操作は、15 mlのMaXtract Low Densityチューブ用に最適化されています。

実験を始める前の重要事項

- ゲノムDNAは壊れやすく、機械的な力により容易に切断されます。ゲノムDNAを溶液として取り扱う場合には、口径の大きなピペット・チップを使用し、ボルテックスは避けてください。
- すべての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。
- すべての有機溶媒は室温で使用します。
- 血液からのゲノムDNA抽出には、ステップ1～5の後、ステップ13に続けます。培養細胞からのゲノムDNA抽出には、ステップ6～10の後、ステップ13に続けます。

実験を始める前の準備事項

- 英語版 Handbook 38 ページの説明に従って次の溶液を調製します。
 - 1x TBS (Tris-buffered saline) (トリ血液あるいは有核赤血球細胞をもつ他種の血液、あるいは組織培養細胞から核を分離する場合)
 - Cell Lysis Buffer
 - Proteinase K/Glycerol Solution (20 mg/ml)
 - 生理食塩水/EDTA 溶液
- 10% SDS 溶液を調製します。
- 有機溶媒抽出用に次の溶液を調製します。
 - 水飽和フェノール
 - 水飽和フェノール：クロロホルム (1:1)

操作手順

血液からの核分離

1. 全血 5 ml を 15 ml のポリプロピレン製遠心チューブに移す。
血液抗凝固剤として EDTA を用いて血液を処理します。
トリ血液あるいは有核赤血球細胞をもつ他種の血液を使用する際は、5 ml の血液の代わりに、0.2 ml の血液と 4.8 ml の 1x TBS を使用します。
2. 5 ml の 2x Cell Lysis Buffer を添加後、静かに転倒して混和し、5 分間氷上でインキュベートする。
3. 4 で 1,000 x g、12 分間の遠心操作により核をペレット化する。
4. 上清をデカントし、チューブをペーパータオルの上にさかさまに 2 分間放置して残った上清を取り除く。
この時点で核ペレットを -70 で数週間保存できますが、新鮮な核からゲノム DNA を分離すると、分子量がより大きな DNA が得られます。
5. ステップ 13 に進む。

組織培養細胞からの核分離

6. 100 mm プレートの細胞を培養液で懸濁し、15 ml のポリプロピレン製遠心チューブに移す。
7. 4 で 250 x g、5 分間の遠心操作により細胞をペレット化する。
8. 上清をデカントし、チューブをペーパータオルの上にさかさまに 2 分間放置して残った上清を取り除く。
9. ピペットを用いて細胞を 1 ml の 1x TBS で数回アップダウンして懸濁する。その後 4 ml の 1x TBS と 5 ml の 2x Cell Lysis Buffer を細胞懸濁液に添加する。転倒混和して氷上で 5 分間インキュベートする。
10. 4 で 1,100 x g、12 分間の遠心操作により核をペレット化する。
11. 上清をデカントし、チューブをペーパータオルの上にさかさまに 2 分間放置して残った上清を取り除く。
この時点で核ペレットを -70 で数週間保存できますが、新鮮な核からゲノム DNA を分離すると、分子量がより大きな DNA が得られます。
12. ステップ 13 に進む。

核の溶解および DNA からのタンパク質除去

13. ピペットを用いて核ペレットを 2 ml の生理食塩水/EDTA 溶液で数回アップダウンして懸濁する。
14. 15 ml の MaXtract Low Density チューブを 1,500 x g で 2 ~ 3 分間遠心操作する。

15. ステップ14で準備したMaXtractチューブにステップ13の核懸濁液を慎重に移す。
16. 50 μ lのproteinase K/glycerol Solutionおよび200 μ lのSDS (10%)を核懸濁液に添加後、静かに転倒させて混和する。
17. 時々静かに攪拌しながら37 °Cで2時間インキュベートし、ステップ18に進む。
このステップは必要に応じて16 ~ 18時間まで延長可能です。

タンパク質抽出

18. 水飽和フェノール4 mlを、タンパク分解したDNAを含むMaXtractチューブ(ステップ17から)に添加する。チューブの蓋を硬く閉める。
19. 激しく振盪して均一な溶液にする。
重要: ボルテックスで混和しないでください。
20. DNAを含む水層(上層)を分離するために1,500 x gで5分間遠心する。
21. 新しい15 mlのMaXtract Low Densityチューブを1,500 x gで2 ~ 3分間遠心操作する。
22. ステップ21で準備したMaXtractチューブにステップ20の上層(DNAを含む)を慎重にデカントする。
23. 水飽和フェノール:クロロホルム(1:1)を4 ml添加する。チューブの蓋を硬く閉める。
24. 激しく振盪して均一な溶液にする。
重要: ボルテックスで混和しないでください。
25. DNAを含む水層(上層)を分離するために1,500 x gで5分間遠心する。
26. 上層の水層(DNAを含む)を慎重に15 mlのポリプロピレン製遠心チューブ(新しい蓋)にデカントし、ステップ27に続ける。

DNA沈殿

27. 100 μ lの2 M KClをステップ26のチューブに添加し、チューブを静かに転倒させて混和する。
28. DNA溶液の上に5 mlの95 %エタノールを重層する。
チューブの壁にエタノールをゆっくりとピペットで入れます。
29. DNAとエタノール溶液の境界面にパスツールピペットチップを入れて、DNAをピペットチップに巻きつける。
チップを境界面に置いたままピペットを回し、層を完全に混和します。
30. DNAを巻きつけたピペット・チップを1 mlの70 %エタノール中に2分間放置する。

31. 70%エタノールからピペット・チップを取り出し、数秒間上向きに持って過剰なエタノールを除去する。

重要：DNAを乾燥させないでください。

32. ピペット・チップを200 μ lのTEバッファーが入ったマイクロ遠心チューブに入れ、室温で20分間インキュベートする。

DNAはピペット・チップからTEバッファーに移動します。必要に応じてチューブの内側にDNAをこすり付けてDNAをピペットから慎重に取り除きます。

33. 4 で一晩インキュベートしてDNAを完全に再溶解する。

DNAを4 で保存します。凍結しないでください。

プロトコール：マウス尾からのゲノムDNA抽出

本操作法は、2 mlのMaXtract High Densityチューブを用いたゲノムDNAの抽出用に最適化されています。

実験を始める前の重要事項

- ゲノムDNAは壊れやすく、機械的な力により容易に切断されます。ゲノムDNAを溶液として取り扱う場合には、口径の大きなピペット・チップを使用し、ボルテックスは避けてください。
- すべての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。
- すべての有機溶媒は室温で使用します。

実験を始める前の準備事項

- 英語版 Handbook 38 ページの説明に従って次の溶液を調製します。
 - Mouse Tail Lysis Buffer
 - TEバッファ
- 次の溶液を調製します。
 - 10 mg/ml proteinase K
 - 10 mg/ml DNase-free RNase A
- 有機溶媒抽出用に次の溶液を調製します。
 - フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25:24:1）
 - クロロホルム：イソアミルアルコール（24:1）

操作手順

1. 1.5 mlのマイクロ遠心チューブに1 cmの尾サンプルを入れる。700 µlのMouse Tail Lysis Bufferおよび35 µlのproteinase K（10 mg/ml）をサンプルに添加後、簡単に混和する。
クロスコンタミのリスクを最小限に抑えるために、尾サンプルを細かくカットしないでください。
尾先端部はマイクロ遠心チューブ中で-20℃で保存できます。
2. サンプルを55～60℃で一晩インキュベートする。
このステップにより尾サンプルは完全に溶解します。尾が完全に溶解しない場合には、さらにproteinase Kを添加してサンプルを数時間インキュベートします。
3. 20 µlのRNase A（10 mg/ml; DNaseフリー）をサンプルに添加する。簡単に混和後、37℃で1～2時間インキュベートする。
4. 2 mlのMaXtract High Densityチューブを1,500 x gで1～2分間遠心操作する。

5. ステップ4で準備したMaXtractチューブにステップ3のサンプルを移す。0.5 mlのフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25:24:1）を添加し、チューブの転倒を繰り返すことによりよく混和する。
重要：ボルテックスで混和しないでください。
6. 2 mlのMaXtract High Densityチューブを1,500 x gで1～2分間遠心操作する。
7. ステップ5のサンプルを最高速度（12,000 x g以上）で5分間マイクロ遠心機により遠心し、ステップ6で準備したMaXtractチューブに水層を慎重に移す。
8. 0.5 mlのクロロホルム：イソアミルアルコール（24:1）をサンプルに添加し、チューブの転倒を繰り返すことによりよく混和する。
重要：ボルテックスで混和しないでください。
9. マイクロ遠心機を用いて最大速度（12,000 x g以上）で5分間遠心し、水層を新しいマイクロ遠心チューブに慎重に移す。
10. 100%イソプロパノールをサンプルに入れて、チューブを満たす。チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和し、すぐにステップ11に進む。
DNA沈殿物が観察されます。
重要：ボルテックスで混和しないでください。
11. DNA沈殿物をピペット・チップで回収し、これを1.5 mlのマイクロ遠心チューブ（70%エタノールを含む）に移す。
加熱により密封したガラス製のマイクロピペットチップでDNAに接触するか、黄色のピペットチップを付けたピペットで軽く吸い込ませながらDNAを持ち上げます。
DNAが粘性でない場合には、簡単に低速で遠心操作しこれをペレット化します。
12. 70%エタノールでDNAを1回洗浄後、95%エタノールで2回洗浄する。
13. DNAを部分的に乾燥させる。その後、400 µlのTEバッファーを含んだマイクロ遠心チューブにこれに移すか、チューブ中のDNAに400 µlのTEバッファーを入れる。
重要：チューブをボルテックスしたり懸濁液をピペッティングすることにより、DNAを再懸濁しないでください。
14. 30～60 rpmで一晩チューブを回転させてDNAを再懸濁する。
サンプルを50℃で加熱することにより、DNAの再懸濁が容易になります。

プロトコール：プラスミド DNA の抽出

MaXtract Low および High Density はアルカリ溶解法を用いた少量および大量プラスミド DNA 精製用プロトコールに使用できます (1、2、10)*。下記の基本的なプロトコールは、最高 500 ml までの LB あるいは DYT 培養液、あるいは 250 ml の Terrific Broth で 12 ~ 14 時間培養した大腸菌用です。この操作は、50 ml の MaXtract High Density チューブ用に最適化されています。

実験を始める前の重要事項

- 特別な記載がない限り、すべての遠心操作は室温 (15 ~ 25) で行ないます。
- すべての有機溶媒は室温で使用します。

実験を始める前の準備事項

- 英語版 Handbook 38 ページの説明に従って必要なバクテリア培養液 (LB、DYT、Terrific Broth) を調製します。
- 次の溶液を調製します。
 - 25 mM Tris-Cl/10 mM EDTA (pH 8.0)
 - 0.2 M NaOH/1.0% (w/v) SDS
 - 7.5 M 酢酸アンモニウム
- 有機溶媒抽出用に次の溶液を調製します。
 - フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1)
 - クロロホルム：イソアミルアルコール (24:1)

操作手順

1. 最高 500 ml までの LB あるいは DYT 培養液、250 ml の Terrific Broth 培養液で 12 ~ 14 時間大腸菌を培養する。
2. バクテリアを 10,000 x g で 5 分間遠心してペレット化する。
3. バクテリア・ペレットを合計 15 ml の 25 mM Tris-Cl/10 mM EDTA (pH 8.0) で再懸濁する。
数回ピペットでアップダウンするかボルテックスにより、バクテリアを再懸濁します。
4. 15 ml の 0.2 M NaOH/1.0% SDS を懸濁液に添加する。転倒を繰り返して完全に混和する。
重要：ボルテックスで混和しないでください。
5. 15 ml の氷冷した 7.5 M 酢酸アンモニウムをライセートに添加する。転倒を繰り返して完全に混和する。
重要：ボルテックスで混和しないでください。

* 英語版 Hand Book 40 ページの "References" 参照

6. 4、15,500 x gで30分間遠心操作する。
7. 2本の50 mlのMaXtract High Densityチューブを1,500 x gで2～3分間遠心操作する。
8. ステップ6の上清を回収し、ステップ7で準備したMaXtractチューブに等量ずつ分注する。
9. 20 mlのフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)を、50 mlの各MaXtract High Densityチューブ中のサンプルに添加し、チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和する。
重要：ボルテックスで混和しないでください。
10. 1,500 x gで5分間遠心して液層を分離する。
11. 2本の新しい50 mlのMaXtract High Densityチューブを1,500 x gで2～3分間遠心操作する。
12. ステップ11で準備したMaXtractチューブにステップ10から回収した水層を慎重に移す。
13. 20 mlのクロロホルム：イソアミルアルコール(24:1)を、50 mlの各MaXtract High Densityチューブ中のサンプルに添加し、チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和する。
重要：ボルテックスで混和しないでください。
14. 1,500 x gで5分間遠心して液層を分離する。
15. 適切なチューブに水層を移し、ダウンストリーム・アプリケーションに応じてサンプルを処理あるいは沈殿させる。

プロトコール:RNAフリーのプラスミドDNA抽出

本操作法は、15 mlのMaXtract Low Densityチューブを用いてRNAフリー・プラスミドDNAの抽出用に至適化されています。

実験を始める前の重要事項

- 特別な記載がない限り、すべての遠心操作は室温(15 ~ 25)で行いません。
- すべての有機溶媒は室温で使用します。

実験を始める前の準備事項

- 英語版 Handbook 38 ページの説明に従って次の溶液を調製します。
 - 最適なバクテリア培養液 (LBあるいはTerrific Broth)
 - 2.5 µg/mlのRNase T1 と 50 µg/mlのRNase Aを含むTEバッファー
- 次の溶液を調製します。
 - 25 mM Tris-Cl/10 mM EDTA (pH 8.0)
 - 0.2 M NaOH/1.0% SDS
 - 7.5 M 酢酸アンモニウム
- 有機溶媒抽出用に次の溶液を調製します。
 - フェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール (25:24:1)
 - クロロホルム : イソアミルアルコール (24:1)

操作手順

1. 1リッターのLB培養液で12 ~ 14時間、あるいはTerrific Brothのような富栄養培地0.5リッターでバクテリアを培養する。
富栄養培地を使用する際は、培養時間を14時間以内にするのが重要です。
少量の培養液で培養する際は、ライセートの清澄化に使用する試薬をスケール・ダウンします(ステップ2 ~ 6)。
2. 4 で10,000 x g、5分間の遠心操作によりバクテリアをペレット化する。
3. バクテリア・ペレットを30 mlの25 mM Tris-Cl/10 mM EDTA (pH 8.0)で再懸濁する。
ピペットでアップダウンするかボルテックスによりバクテリアを再懸濁します。
4. 30 mlの0.2 M NaOH/1% SDS (15 ~ 25)を懸濁液に添加する。チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和する。
重要: ボルテックスで混和しないでください。
5. 30 mlの氷冷した7.5 M 酢酸アンモニウムをライセートに添加する。チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和する。
重要: ボルテックスで混和しないでください。

6. 4、15,500 x gで30分間遠心操作する。
7. 新しい遠心チューブに上清を移す。
白みがあった灰色のペレットと一緒に移さないでください。
8. 室温の100%イソプロパノール54 ml (0.6倍容量)を上清に添加する。チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和する。
重要：ボルテックスで混和しないでください。
9. 20、15,500 x gで30分間遠心操作する。上清を捨てる。
10. ペレットに70%エタノール25 mlを添加し、チューブの転倒を繰り返すことによりよく混和する。
11. 15,500 x gで5分間遠心してDNAをペレット化する。
12. 上清を廃棄し、過剰のエタノールを慎重に吸引し、ペレットを15～30分間乾燥させる。
13. 50 µg/mlのRNase Aと2.5 µg/mlのRNase T1の入ったTEバッファー1.5 mlをペレットに添加し、ペレットを溶解するために静かに混和する。
14. 15 mlのMaXtract Low Densityチューブを1,500 x gで1～2分間遠心操作する。
15. ステップ13のサンプルを10,000 x gで1～2分間遠心操作し、ステップ14で準備したMaXtractチューブにサンプルをトランスファーする。
必要に応じて、この懸濁液5～10 µlを1%のアガロースゲル電気泳動で解析して、プラスミドDNAがあることを確認します。
16. サンプルを37℃の水浴中で15分間インキュベートする。
17. 2.0 mlのフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1)を添加し、チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和する。
重要：ボルテックスで混和しないでください。
18. 1,500 x gで5分間遠心して液層を分離する。
19. 同じ15 mlのMaXtract Low Densityチューブでステップ17と18を繰り返す。
20. 2.0 mlのクロロホルム：イソアミルアルコール (24:1)を同じMaXtractチューブ中のサンプルに添加し、チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和する。
重要：ボルテックスで混和しないでください。
21. 1,500 x gで5分間遠心して液層を分離する。
22. 適切な新しいチューブに水層を慎重に移し、ダウンストリーム・アプリケーションに応じてサンプルを処理するあるいは沈殿させる。
水層の容量は1.4～1.5 mlです。

プロトコール：トータルRNAの抽出

本プロトコールは、洗浄・ペレット化した培養細胞からのRNA抽出、あるいは単層培養細胞からの直接RNA抽出用にデザインされています。洗浄・ペレット化した培養細胞と単層培養細胞では、ホモジナイゼーション操作手順がわずかに異なりますが、ダウンストリームの抽出ステップは同じです。洗浄・ペレット化した細胞の溶解およびホモジナイゼーションに関しては、ステップ1～3の後、ステップ7に続けます。単層培養細胞の溶解およびホモジナイゼーションに関しては、ステップ4～6の後、ステップ7に続けます。ステップ7および続くステップは、両タイプの細胞で同じです。本操作は、2 mlのMaXtract High Densityチューブ用に最適化されています。

実験を始める前の重要事項

- 特別な記載がない限り、すべての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。
- すべての有機溶媒は室温で使用します。
- テキスト中、最高24ウェルまでの容器/プレートで培養した細胞に使用する量は■、48あるいは96ウェルプレートで培養した細胞に使用する量は●で記載しています。
- 洗浄・ペレット化した細胞からのトータルRNAの抽出に関しては、ステップ1～3の後、ステップ7に続けます。単層培養細胞のトータルRNA抽出に関しては、ステップ4～6の後、ステップ7に続けます。

実験を始める前の準備事項

- 英語版 Handbook 38ページの説明に従って次の溶液を調製します。
 - RNA Lysis Solution
- 次の溶液を調製します。
 - 2 M 酢酸ナトリウム、pH 4.0
 - RNase フリー水
- 有機溶媒抽出用に次の溶液を調製します。
 - 水飽和フェノール
 - フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（50:49:1）
 - クロロホルム：イソアミルアルコール（49:1）

操作手順

洗浄・ペレット化した培養細胞の溶解およびホモジナイゼーション

1. $0.5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 個の細胞に 200 μl の RNA Lysis Solution を添加する。
2. 溶液をピペットで数回アップダウンするなどしてホモジナイズし、ペレットを完全に懸濁する。
口径の小さいピペット・チップを使用して、細胞ホモジネートを回収する。
3. ステップ7に進む。

単層培養細胞の溶解およびホモジナイゼーション

4. 6、12、24 ウェルプレートの各ウェルに 200 μl の RNA Lysis Solution を直接添加する。48、96 ウェルプレートの各ウェルに 100 μl の RNA Lysis Solution を直接添加する。
5. 培養ディッシュ、チューブ、ウェルから剥がれた細胞を洗浄するように気をつけて、溶液をピペットで数回アップダウンするなどして、細胞をホモジナイズする。
口径の小さいピペット・チップを使用して、細胞ホモジネートを回収する。
6. ステップ7に進む。

トータルRNAの抽出

7. 2 ml の MaXtract High Density チューブを 12,000 ~ 16,000 x g で 1 ~ 2 分間遠心操作する。
8. ステップ7で準備した MaXtract チューブにステップ2またはステップ5のホモジネートを移す。
9. ■ 20 μl あるいは ● 10 μl の 2.0 M 酢酸ナトリウム (pH 4.0) を各サンプルに添加する。MaXtract チューブの蓋をして、簡単に混和する。
10. ■ 200 μl あるいは ● 100 μl の水飽和フェノール、あるいはクエン酸緩衝フェノール (pH 4.0 ~ 4.5) を各サンプルに添加する。MaXtract チューブの蓋をして、チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和する。
重要：ボルテックスで混和しないでください。
11. ■ 60 μl あるいは ● 30 μl のクロロホルム：イソアミルアルコール (49 : 1) を各サンプルに添加する。MaXtract チューブの蓋をして、チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和する。
重要：ボルテックスで混和しないでください。
12. 氷上で 10 分間インキュベートする。
13. 12,000 ~ 16,000 x g で遠心して液層を分離する。

14. ■ 200 μ l あるいは ● 100 μ l のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（50：49：1）を同じ MaXtract チューブ中の各サンプルに添加する。
MaXtract チューブの蓋をして、チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和する。
重要：ボルテックスで混和しないでください。
15. マイクロ遠心機を用いて 12,000 ~ 16,000 x g で遠心して液層を分離する。
16. 水層を RNase フリーのマイクロ遠心チューブに移す。等量の 100 % イソプロパノールを添加し、チューブの転倒を繰り返すことにより完全に混和する。
17. 12,000 ~ 16,000 x g で 20 分間遠心操作を行なう。
18. 上清を捨てて、200 μ l の 70 % エタノールを添加し、12,000 ~ 16,000 x g で 2 ~ 3 分間の遠心操作によりサンプルをペレット化することを数回繰り返し、ペレットを洗浄する。
サンプルは 70 % エタノール中で -70 °C あるいは -70 °C 以下で長期間保存することもできます。
19. 最後の洗浄溶液を捨てて室温でペレットを乾燥する。
20. 5 ~ 10 μ l の RNase フリー水でペレットを溶解する。
RNA 溶液は -70 °C で保存してください。
吸光度は RNase フリーの TE バッファーで測定します (11)*。

* 英語版 Hand Book 40 ページの “References” 参照

トラブルシューティングガイド

コメント

MaXtractゲルで層が正しく形成されない

- a) 使用したMaXtractが不適切
英語版 Handbook 13ページの表をチェックして、選択したMaXtract LowあるいはHigh Densityがアプリケーションに適切か確認する。
- b) 遠心速度が間違っている
プロトコールに記載されている速度で遠心したことを確認する。
- c) MaXtractゲルを凍結した
MaXtractゲルは室温（15 ~ 25 °C）で保存する。
- d) 抽出前にMaXtract Low/High Densityチューブを遠心しなかった
有機溶媒抽出操作前にMaXtract Low/High Densityチューブを遠心する。

MaXtract LowあるいはHigh Densityが水層および有機溶媒層の上部に移動する。

- a) 使用したMaXtractが不適切
英語版 Handbook 13ページの表をチェックして、選択したMaXtract LowあるいはHigh Densityがアプリケーションに適切か確認する。
- b) 水層の比重がMaXtractよりも重い
ピペットチップでMaXtractゲルに穴を開けてゲルの下部にある液体を取り除く。新しいピペットチップで液体を回収し、遠心済みのMaXtractチューブに移す。分子生物学実験レベルの水あるいは適切なバッファでサンプルを希釈する。プロトコールに記述されているように続ける。

MaXtractゲルがチューブの底に残っている

- a) 使用したMaXtractが不適切
英語版 Handbook 13ページの表をチェックして、選択したMaXtract LowあるいはHigh Densityがアプリケーションに適切か確認する。
- b) 有機溶媒層の比重が軽いために、MaXtractが下に残留している
有機溶媒層の比重を増やすためにクロロホルムを添加する。

MaXtractゲルは層を形成するが、均一でない

- 液層が均一にみえない
境界面が壊れていないなら、プロトコールを続ける。
境界面中に穴が開いている場合には、サンプルを回収して新しいMaXtractチューブに入れる。クロロホルムを添加し、プロトコールに従って処理する。

株式会社 キアゲン ■ 〒104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II
Tel:03-6890-7300 ■ Fax:03-5547-0818 ■ E-mail:techservice.jp@qiagen.com



W W W . Q I A G E N . C O . J P