

ジェノタイピング用ライセートの作製法 (鳥取大学 林)

重要な点：ライセートから直接 PCR を行う本方法は、簡便であるが、標的の配列によっては PCR による増幅が起こりにくい。その場合は、DNA の精製を行うと良い。

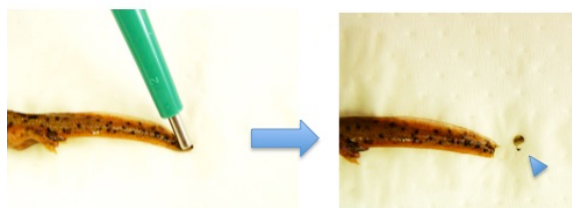
【 サンプルの採取 】



準備するもの

1、1.5 ml チューブ (サンプルの数用意する)

2、ハサミまたは生検トレパン



生検トレパンを使うことで、一定の大きさの試料を採取することができる。

これにより、ライセートの濃度がある程度揃うので、後の PCR 操作が行いやすい。

生検トレパンは本来使い捨てであるが、水で洗って乾燥させておけば、何回も使用できる。

方法

- ① イモリを麻酔する。
- ② 遺伝子型を調べたい組織 (通常は尾の先端や指) を 2-3 mm 角程度、切り取る。

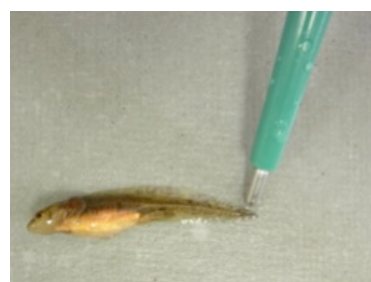
ハサミまたは生検トレパンを使用する。

変態前の個体をペーパータオルの上に乗せる際には、ペーパータオルを濡らしておかないと、皮膚が損傷する。

- ③ 組織片を 1.5 ml チューブに移す。

すぐに次のステップに進まない場合は、冷凍庫で保存する。

- ④ 同じハサミや生検トレパンを使って別の個体をサンプリングする時には、水でよく洗う。この時、刃の表面に前の個体の細胞や組織片が残らないように気をつける。



【 サンプルの溶解 】

準備するもの

- 1、 5x Lysis buffer
- 2、 蒸留水
- 3、 20 mg/ml Proteinase K (Takara など)
- 4、 ヒートブロック (98℃に加熱できるもの)
- 5、 55℃に加熱できるボルテックスミキサー

*ボルテックス機能がない場合は、時々かき混ぜれば良い。

方法

- ① 5x Lysis buffer を水で 5 倍に希釈する。サンプルあたり約 300 μ l 使用する。
- ② 希釈した Lysis buffer に 1/100 – 1/300 容の Proteinase K を加える。
- ③ サンプルの入った 1.5 ml チューブに、Lysis buffer (Proteinase K 入り) を 300 μ l 加える。
- ④ 55℃に加熱したボルテックスシェーカーでかき混ぜながら、2 時間処理する。
ボルテックス機能がなければ、30 分に 1 回程度よく攪拌する。
組織が溶けていなければ、Proteinase K を追加、または処理時間を延ばす。
- ⑤ 組織が溶けていることを確認したら、98℃で 5 分間処理する。
熱処理が不十分であると、Proteinase K の活性が残り、次の PCR に失敗する。
- ⑥ 溶解と熱処理が終わったサンプル (ライセート) は冷凍または冷蔵で保存する。
冷蔵庫内で 1 年以上の保存が可能であるが、より長期間の保存には冷凍庫を使用する。
- ⑦ ライセートをごく少量 (PCR 反応液 20 μ l に対して 0.1-0.25 μ l 程度) 用いて PCR 反応を行う。
PCR 酵素は目的 (バンドのチェックやシーケンシングなど) や標的の遺伝子により使い分ける。

5x Lysis buffer stock solution

| | | |
|--|-----------|---------------|
| 1M Tris-HCl (pH8.8) | - - - - - | 9.75 ml |
| 1M (NH ₄) ₂ SO ₄ | - - - - - | 2.49 ml |
| 2-メルカプトエタノール(原液) | - - - - - | 10.4 μ l |
| 10mM EDTA (pH8) | - - - - - | 100.5 μ l |
| Triton X-100(原液) | - - - - - | 750 μ l |
| 蒸留水 | - - - - - | 16.9 ml |

* 分注後、-20℃保存。凍結融解しても良い。