

■ 2-2 Trisバッファーの作り方 ～2種類の塩を混ぜて作る方法～

トリス^{*5}と、トリス塩酸塩^{*6}を混ぜて、それらの間のpHのTrisバッファーを作ることができる。

●準備

- トリス(2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール, CAS RN: 77-86-1, 分子量 121.14)
- トリス塩酸塩(2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール塩酸塩, CAS RN: 1185-53-1, 分子量 157.60)
- 超純水 ~1L

*5 溶かすと塩基性(pH10程度)になる

*6 溶かすと酸性(pH7程度)になる

●方法

- Step1 ビーカーに800mLの超純水を用意し、スターラーを用いて表1の量のトリスとトリス塩酸塩を溶かす

(表1) トリスとトリス塩酸塩の混合量とpH(1Mを1L作る場合)

pH	7.2	7.4	8	8.5	9
トリス	7.71 g	19.45 g	54.67 g	84.02 g	113.4 g
トリス塩酸塩	147.6 g	132.3 g	86.48 g	48.29 g	10.11 g

↓

- Step2 メスシリンダーなどで1Lにメスアップする
pH試験紙などで正しくできているか確認する
- ↓
- Step3 メディウム瓶に移し、必要に応じてオートクレーブ処理をして保管

■ 2-3 1M MOPS(pH 7.4)の作り方

●準備

- MOPS(3-モルホリノプロパンスルホン酸) 104.63 g
- 10N NaOH(pH調整用)
- 超純水 ~400 mL

●方法

- Step1 上記の試薬をスターラー入りのビーカーに入れ、攪拌する
- ↓
- Step2 pHを測りながら10N NaOHを追加し、pH 7.4にする
- ↓
- Step3 超純水を用いて500mLにメスアップする

3. DNA/RNAの抽出作業

■ 3-1 ホモジエナイス

DNAやRNAは細胞の中にあるため、いずれの抽出法においても組織を破碎し、細胞膜を破碎するプロセスが必要となる。これをホモジエナイスという。

ゲノムDNAは、細胞内の酵素では分解されにくいが、逆に物理的な衝撃で断片化されてしまう^{*18}。そのため、タンパク質分解酵素であるProteinase Kを用いた酵素処理で細胞タンパクを破壊し、界面活性剤で細胞膜を破壊して抽出する方法が主に用いられる。

一方、RNAは細胞内の酵素などで分解されやすいため、物理的な衝撃で迅速に破壊を行う。

■ 3-2 ホモジエナイスの方法

ホモジエナイスには主に以下の3つの方法がある。

①ペッスル

1.5 mLチューブの底に合うような形の棒(ペッスル、図3)で、組織をすりつぶす(動画12)。注意点は、チューブには平底と丸底があり、一般的なペッスルは丸底チューブを用いないと隙間ができてしまうことである。しっかりと組織を潰すため、チューブとペッスルの形が適合することを確認してから用いる。

「組織と抽出液が入ったチューブ」にペッスルを差し込み、ペッスルを少し回転させながら、組織を底に押しつけてつぶすとよい。組織の断片が見えなくなるまで、押し潰す。

②回転刃ホモジナイザー(ポリトロンなど)

内軸の刃が回転し、組織を細かく破断できる。内軸と外軸の間に必然的に液が入り込む構造のため、サンプルごとに十分な洗浄が必要である。

サンプルを破碎した後の洗浄プロセスは、蒸留水を入れた50 mLチューブ内で運転させ洗浄させる方法がよい。ボトルを3本用意し、順番に洗浄^{*19}する。最後に、サンプル破碎に用いている溶液^{*20}で回転させ、次のサンプルに水を持込まないようにする^{*21}。

③ビーズ破碎機

チューブにサンプルと一緒に硬いビーズ(ジルコニアなど)を入れて、機械で高速でシェイクすることにより、ビーズとの高速な衝突でサンプルが破碎される(図4)。回転刃ホモジナイザーと異なり、サンプルに機械の一部を入れるわけではないので、サンプル間のコンタミは原理的に起こらない。

***18** 染色体レベル等、長い状態での保持に関してであり、PCRで断片を增幅する場合には物理的に破壊を多少行っても問題ない。pacificやnanoporeシーケンサー等、1分子シーケンサーを用いる場合や、染色体の再構成を目的とする場合には特に注意が必要である。

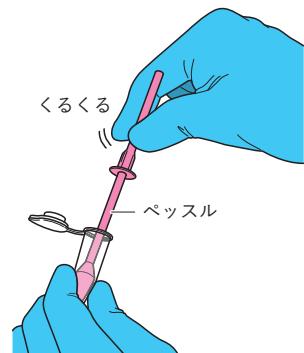
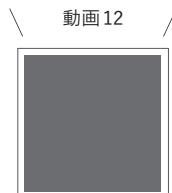


図3 ペッスル

イラストの持ち方は、DNA抽出の場合、RNAの抽出の場合は、チューブの蓋の近くを持ち、サンプルを手の熱で温めないようにする。チューブを氷の上に立てて作業するのもよい。



***19** 液内で回転させる

***20** lysisバッファーまたはフェノール溶液など

***21** “共洗い”的要領

■ 2-2 ゲノムデータベースにおけるBlastの使い方

Blastは、さまざまなデータベースで用いることができ、[代表的なものは「Ensembl」と、「NCBI」](#)である。ここでは、ゲノムの構造がより見やすいEnsemblで説明するが、NCBIのBlast^{*14}は、種を指定しなくても短時間で種を横断したBlastを行ってくれる、といったアドバンテージがある。クローニングなどで、まったく想像のしない配列がでてきて、コンタミの可能性が疑われるときなどに用いると便利である。

● EnsemblでのBlast検索の仕方

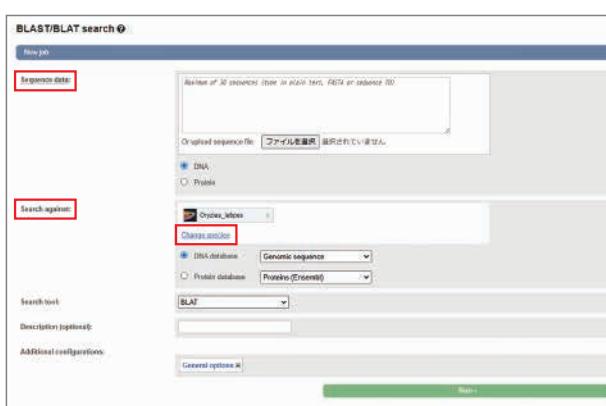


- Step1 Ensembl (<https://www.ensembl.org/>) の上部に示されている、「BLAST/BLAT」をクリックする

↓

- Step2 以下の画面が出てくる^{*15}

↓



- Step3 この画面の「Sequence data :」が、検索するクエリになる配列を入力する部分であり、「Search against :」で、その対象となる種を選択する

この時点で検索対象とする種がすでに指定されていればそのまま検索を行えばよい。種が指定されてない場合、あるいは他の種を検索したい場合、「Change species」をクリックすると、種を検索する画面がでてくる。複数種を指定することも可能。

↓

*14 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

*15 2回目以降の場合は



が出てくるのでここで「New job」をクリック

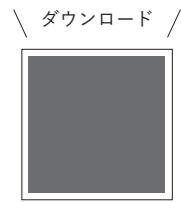
4. PCRの基本プロトコル

■ 4-1 試薬・温度条件

●試薬の組成

TaKaRa Ex Tagを想定

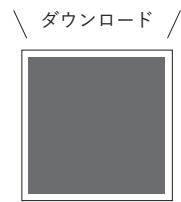
<input type="checkbox"/> Template	<200 ng
<input type="checkbox"/> 10 μM Forward Primer	1 μL
<input type="checkbox"/> 10 μM Reverse Primer	1 μL
<input type="checkbox"/> 2.5 mM dNTP	1.6 μL
<input type="checkbox"/> 10x Buffer	2 μL
<input type="checkbox"/> DNAポリメラーゼ	0.1 μL
<input type="checkbox"/> 超純水	up to 20 μL
合計	20 μL



PCR(試薬の組成)

●温度条件

- Step1 95°C 3分 # テンプレートの高次構造の解消・DNAポリメラーゼの活性化
↓
- Step2 95°C 10秒 # DNAを1本鎖にする
↓
- Step3 60°C 10~30秒*12 # プライマーのアニーリング
↓
- Step4 72°C 1 kb/分 # 伸長反応
↓
- Step5 Step2にもどり、30~35回くり返す*13
↓
- Step6 72°C 5分 # 最後の伸長反応の完遂
↓
- Step7 12~16°C ∞



PCR(温度条件)

*12 ポリメラーゼの取扱説明書にしたがう

*13 装置によっては(くり返した数)+1がサイクル数になるので注意

●温度の意味

現在のサーマルサイクラーでは、上部も温度制御可能になっている。蒸発した試薬が結露して試薬濃度が変わってしまわないよう、上部の温度は105°C程度に設定する。Step2, 3の時間は酵素に添付されているプロトコルに応じて適宜調整する。Step4は一般的な酵素の伸長速度に合わせている。もし高速で伸長するもの(例えばPrimeSTAR® Max DNA Polymeraseは1 kb/5秒程度で伸長可能)を利用する場合は、それに従う。

6. PCR・電気泳動のトラブルシューティング(2 step PCR, touch down PCR)

■ 6-1 「目的の長さ」が増えない

下記①～⑥を検討する。

① テンプレートの調整

テンプレート量を増やすまたは減らす^{*31}。テンプレートの純度が悪い場合は、キットなどを使って再精製する。

② ポリメラーゼを変える

ホットスタートのポリメラーゼや、GC含有率が高いものも伸長可能なポリメラーゼに変更してみる。

③ 増幅したい配列にGCが多く含まれる場合

DMSO (Dimethyl sulfoxide : ジメチルスルホキシド) を5%くらいになるように添加する^{*32}。

④ プライマーを変更する

プライマーの位置が悪いことが考えられる。

⑤ 伸長時間やサイクル数を変更する

⑥ 3Stepで行っている場合

2stepPCRやtouch down PCRを試す(p.157を参照)。

^{*31} 多すぎても増えないことがある。必要に応じて思い切って、100×, 10×, 1/10×, 1/100×量で同時にPCRを行い、検証するとよい

^{*32} DNAが1本鎖になりやすくなる

■ 6-2 収量が少ない

下記①～④を検討する。

① 電気泳動を行い、バンドが複数本含まれているか確認する

複数本ある場合は、2stepPCRやtouch down PCRを用いる(p.157参照)。

② 目的のバンドがない場合

PCR反応量を増やす。

③ 増やしたい配列にGCが多く含まれている場合

DMSOなどを添加する。

④ テンプレートにEDTAが多く含まれている場合

Mg²⁺濃度を上げるか、テンプレートのバッファーを変更する

■ 6-3 電気泳動したときのバンドが不明瞭

アガロースゲルの厚さを薄くする。