

第2章 核酸の分析

第1節 DNA抽出

1.1 植物細胞からのDNA抽出

植物細胞からのDNA抽出は、植物細胞に多量に含まれている多糖類やポリフェノール類が問題となることが多い。ここでは界面活性剤であるcetyltrimethylammonium bromide (CTAB)を用いて植物細胞からのDNAを抽出を行う。本法では、1) CTABの生体膜を溶かしDNAを核から取り出す作用と2) CTABが高塩濃度条件下でタンパク質や酸性多糖類と複合体を形成し沈殿する作用(核酸は溶液中)の2つを利用して高純度のDNAの抽出を行う。なお、本法では核酸のCTAB沈殿とよばれるCTABが低塩濃度条件下で核酸と複合体を形成し不溶性になる性質(タンパク質や酸性多糖類は溶液中)は利用していない。

【器具・機器類】

冷蔵庫(4°C, -20°C, -80°C), 遠心器(50 mlと15 ml, そしてマイクロチューブを回せるもの, 卓上のマイクロチューブ専用の小型のもの), ボルテックス, オートクレーブ, 電子天秤, pHメーター, ウォーターバス(65°Cに設定でき, 50 mlのコニカルチューブ30本を同時に立てられるもの), 液体窒素保存容器, アスピレータ, デシケーター, ピペットマン(P-20, P-200, P-1000, P-5000), DNA沈殿を絡め取るためのホック(パスツールピペットを加工したもの), 乳鉢と乳棒, 50 mlコニカルチューブ, 15 mlコニカルチューブ, マイクロチューブ, イエローチップ, ブルーチップ, P-5000用のチップ, 薬包紙, 薬さじ等

【試薬類】

CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) buffer, 2-mercaptoethanol, NaOH, エタノール, イソプロパノール, RNase A溶液(10mg/ml), CIA溶液(クロロフォルム:イソアミルアルコール=24:1で混ぜる), 3M 酢酸ナトリウム溶液, PEG溶液(PEG8000, 13% (w/v), 1.6 M NaCl), TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0)

CTAB bufferは以下のように調製する

CTAB	2 g
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	10 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	4 ml
NaCl	8.18 g
PVP K30	1 g
滅菌水を加えて	100 mlに定容

【手順】

- 1) 3g程度の若い葉のサンプル(生のものでも, 凍結サンプルでもよい)を乳鉢に入れ, 液体窒素をあふれるぐらい注ぎ, 乳棒で破碎する。
- 2) 液体窒素が全て気化したら, 葉のパウダーを薬包紙にとり, 予め60°Cにあたためておいた50 mlコニカルチューブ中の20 mlのCTAB buffer(使用直前に2-mercaptoethanolを20 mlに200 μ lの割合で加える)に入れる。
- 3) ゆっくりとチューブを反転させ十分にパウダーを懸濁させ(DNA分子が切断されるので強く混ぜないこと。ただし, ここで十分に混ぜないとDNAの収量が減る), 60°Cのウォーターバス中で30分間振盪しながらインキュベートする。
- 4) 等量のCIAを加え, 数回反転させて, ゆっくりと均一化する。
- 5) 室温で, 3,000rpm x 5分遠心分離する。
- 6) 水層を新しい50ml遠心管に移し, 2/3量の(10-12ml)のイソプロパノールを加え, ゆっくり

と反転し、DNA（この段階ではRNAも混入している）を沈殿させる（糸状のもやもやした沈殿が析出する）。このDNA沈殿をホックで絡め取る。

- 7) 15ml遠沈管に75%エタノールを10ml程度入れておき、そこにホックで絡め取ったDNAを入れて、洗浄する。
- 8) 遠心分離する（4℃, 3,000rpm, 5分間）
- 9) 上清を捨て（ここで放置可能）、チューブを逆さまにしてペーパータオル上で乾燥させる。
- 10) 完全に乾いたことを確認の上、4 mlのTEに溶解する。溶けにくい時は、60℃に加熱するかTEをさらに加える。
- 11) RNase A溶液を10 μ l加え、37℃で15分間インキュベートする。
- 12) 1/10量の（400 μ l）の3M酢酸ナトリウムと2.5倍量（10 ml）のエタノールを加え、DNAのエタノール沈殿を行う。
- 13) 上清を捨て、デシケーター内で15分間乾燥させる。
- 14) 完全に乾燥したことを確認し、1 mlのTEに溶解する。溶けにくい時は60℃に加熱するか、TEを加えて溶解する。
- 15) 500 μ lずつマイクロチューブに分注し、等量のPEG溶液[PEG8000, 13% (w/v), 1.6 M NaCl]を加え（ゲル状になるので、加えたらすぐ反転させて混ぜる）、氷上で1時間インキュベートする。
- 16) 遠心分離する（4℃, 15,000 rpm, 15分間）
- 17) 上清を捨て（沈殿は透明なゲル状）、75%エタノール1 mlで洗浄後、遠心する（4℃, 15,000 rpm, 5分間）。
- 18) 上清を捨て、75%エタノール1 mlを加えて、洗浄後、遠心する（4℃, 15,000 rpm, 5分間）。その後、デシケーター内で、15分間、減圧乾燥する。
- 19) 100–200 μ lのTEに溶解し、分光光度計や電気泳動によって濃度を確認する（1.4を参照）。

1.2 動物細胞からのDNA抽出

動物細胞は細胞壁を持たないなど植物細胞とは異なる特徴を有している。このため動物細胞からのDNA抽出法も、植物細胞のものとは異なっている。ここでは、血液サンプルからのDNA抽出の手順について述べる。

【器具・機器類】

遠心器（50 mlコニカルチューブを回せるもの）、オートクレーブ、電子天秤、ウォーターバス、ピペットマン（P-20, P-200, P-1000, P-5000）、先端を塞ぎU字型に曲げたパスツールピペット、50 mlコニカルチューブ

【試薬類】

ACD (acid citrate dextrose)溶液, extraction buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS, 20 μ g/ml RNase), 20 mg/ml Proteinase K, TE飽和フェノール(pH 8.0), フェノール:クロロフォルム(TE飽和フェノール:クロロフォルム:イソアミルアルコール=25:24:1で混ぜる), PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4), エタノール, 70%エタノール, 酢酸アンモニウム溶液, TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)

ACD溶液は以下のように調製する。

citric acid	0.48g
sodium citrate	1.32g
glucose	1.47g

滅菌水に溶かし 100ml にメスアップする。

PBS は以下のように調製する。

NaCl	8.0g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.9g
KH ₂ PO ₄	0.2g

蒸留水に溶かし 1,000ml にメスアップ後、オートクレーブで滅菌する

【手順】

- 1) 血液サンプルの採取
ACD溶液 3.5mlを入れた50mlのコニカルチューブに血液20mlを採取し、-70°Cで凍結保存する。
- 2) 凍結した血液サンプルを室温の恒温槽につけ解かした後、PBS 20ml を加える。
- 3) 3,500rpm, 室温で15分間遠心分離した後、上清を捨てる。
- 4) チューブに残った細胞ペレットに extraction buffer 10ml を加え、細胞を懸濁する。
- 5) 37°Cの恒温槽につけ、1時間インキュベートする。
- 6) Proteinase K(20mg/ml) 50 μ l を加えよく混ぜた後、50°Cで3時間ゆっくり振とうしながらインキュベートする。
- 7) 溶液を室温に冷やした後、TE 飽和フェノール 10 ml を加え、ゆっくりとチューブを反転させフェノールと溶液を10分間よく混合する。3,500rpm, 室温で10分間遠心分離し、水層とフェノール層を分離する。先端を切断し、口を大きくしたチップをつけたピペットマンを使い水層を新しい50ml コニカルチューブに移す。このフェノール抽出の操作をもう1度繰り返す。細胞を溶解した溶液はかなり粘性が高いため、注意して取り扱う必要がある。フェノールとの混合の際など乱暴に扱えばDNAが切断される。
- 8) 新たなチューブに移した水層にフェノール:クロロフォルム 10 ml を加え、7)と同様に抽出を行う。
- 9) フェノール:クロロフォルム抽出後、水層を新しい50ml コニカルチューブに移し8 M 酢酸アンモニウム溶液 2.5 ml を加えよく混ぜる。
- 10) 100%エタノール 25 ml を加え、ゆっくりとチューブを反転しよく混ぜる。
- 11) 沈殿したゲノムDNAを、先端を塞ぎU字型に曲げたパスツールピペットで巻き取る。
- 12) 巻き取ったゲノムDNAを70%エタノール 10 ml を入れたチューブに浸し洗浄する。この操作を2回繰り返す。
- 13) できるだけ70%エタノールを除いた後、巻き取ったゲノムDNAを風乾する。
- 14) 充分乾燥しエタノールを除いた後、ゲノムDNAをTE 2 ml に溶かす。
(高分子量のゲノムDNAは水に溶けにくいので一晩4°Cで放置し十分時間をかけて溶かす)

1.3 プラスミドDNAの抽出

I. アルカリ-SDS 法による抽出

【器具・機器類】

1.5ml マイクロチューブ, 滅菌した爪楊枝, ボルテックスミキサー, 遠心分離機, キムタオル, 遠心乾燥機

【試薬類】

Solution I (50mM グルコース, 25mM Tris-HCl(pH8.0), 10mM EDTA), Solution II (0.2N NaOH, 1% SDS), Solution III (5M 酢酸カリウム 60ml, 酢酸 11.5ml, 蒸留水 28.5ml), クロロホルム:イソアミルアルコール (24:1), 2-プロパノール, 70%エタノール, 1/10 TE

【手順】

- 1) 培養液を 1.5ml 取り, 1.5ml マイクロチューブに移して 15,000rpm, 4°C で 1 分間遠心し, 菌体をチューブの下へ集める.
- 2) デカンテーションで上澄を捨て, 1) を繰り返し, 菌体を全て集める.
- 3) 菌体のペレットに 100 μ l の氷冷した Solution I を加え, 滅菌した爪楊枝で懸濁する.
- 4) 200 μ l の Solution II を加え, 滅菌した爪楊枝で混合する.
- 5) 氷上で 5 分間放置する.
- 6) 50 μ l の氷冷した Solution III を加え, チューブを指ではじき, 内容物をよく混合する.
- 7) 氷上で 5 分間放置する.
- 8) クロロホルム:イソアミルアルコールを 50 μ l 加え, フタをしっかりと閉めて指およびボルテックスミキサーでよく混合する.
- 9) 15,000rpm, 4°C で 5 分間遠心し, 沈殿をチューブの底に固める.
- 10) 上澄(約 400 μ l)をマイクロピペッターで注意深く取り, 新しい 1.5ml マイクロチューブに移す.
- 11) 等量の 2-プロパノールを加え, フタを閉めて激しくチューブを振り, 内容物をよく混合する.
- 12) 室温で 5 分間静置する.
- 13) マイクロチューブを 15,000rpm, 4°C で 10 分間遠心し, 核酸をペレット状に沈殿させる.
- 14) 上澄をデカンテーションで捨てる.
- 15) 70%エタノールを 1ml 加え, マイクロチューブを 2, 3 回上下反転し, ペレットを洗浄する.
- 16) マイクロチューブを 15,000rpm, 4°C で 5 分間遠心し, 核酸をペレット状に沈殿させる.
- 17) 上澄をデカンテーションで捨てる.
- 18) マイクロチューブをキムタオルの上に逆さまに立てて, 水分を取り除く.
- 19) 遠心乾燥機で 3 分間ペレットを乾燥させる.
- 20) 100 μ l の 1/10 TE に溶解し, RNA の除去・DNA の精製操作に移る.

II. プラスミドDNAの精製

【器具・機器類】

1.5ml マイクロチューブ, 遠心分離機, キムタオル, 遠心乾燥機

【試薬類】

10 mg/ml RNase A (DNase free) 溶液, PEG 溶液 (1.6M NaCl, 13%(w/v)ポリエチレングリコール (PEG8000)), 70%エタノール, 滅菌水

【手順】

- 1) 3.1 のアルカリ-SDS 法で得られた 100 μ l のプラスミド溶液に 10mg/ml RNase A 溶液を 1 μ l 加え, 37°C で 30 分間インキュベートする.
- 2) 等量の PEG 溶液を加え, ボルテックスミキサーでよく攪拌する.
- 3) 4°C で 1 時間冷却する.

- 4) マイクロチューブを 15,000rpm, 4°Cで 20 分間遠心し, 核酸をペレットに沈殿させる.
- 5) 上澄をマイクロピペッターで捨てる.
- 6) 70%エタノールを 1ml 加え, マイクロチューブを 2, 3 回上下反転し, ペレットを洗浄する
- 7) マイクロチューブを 15,000rpm, 4°Cで 5 分間遠心し, 核酸をペレットにする.
- 8) 上澄をデカンテーションで捨てる.
- 9) マイクロチューブをキムタオルの上に逆さまに立てて, 水分を取り除く.
- 10) 遠心乾燥機で 3 分間ペレットを乾燥させる.
- 11) 30 μ l の TE に溶解し, プラスミド DNA サンプルとする.

1.4 抽出した DNA の確認・定量

I. 260nm の紫外線の吸収 (A_{260}) の測定による定量

【器具・機器類】

分光光度計

【手順】

- 1) 抽出した DNA 溶液を TE で 20-50 倍に希釈する.
- 2) 希釈した DNA 溶液の 260nm の紫外線の吸収 (A_{260}) を分光光度計を用いて測定する.
2 本鎖 DNA の場合, $A_{260} = 1$ のとき溶液の濃度を 50ng/ μ l として DNA 溶液の濃度を算出する.
フリーのヌクレオチドや RNA も DNA と同様に 260nm に吸収をもつため, 抽出の際 DNA が分解されていたり, RNA が不純物として含まれてる場合には, A_{260} の測定による定量では誤差が生じるので注意が必要である.

II. アガロースゲル電気泳動による確認・定量

【器具・機器類】

電気泳動装置 (ミューピッド), ゲル写真撮影装置

【手順】

- 1) 抽出した DNA 溶液 (0.2-0.5 μ g の DNA を含む量) に TE を加え全量を 10 μ l にし, さらにゲル・ローディングバッファー 2 μ l を加える. ゲノム DNA に TE やゲル・ローディングバッファーを加え混合する際, 激しいボルテックスやピペッティングは行わないこと. 分子量の大きいゲノム DNA は剪断力により物理的に切断される. チューブを指で軽くはじくなどして混ぜる. 分子量の小さなプラスミド DNA の場合にはボルテックスも用いてもかまわない.
- 2) 0.8%アガロースゲルを用いて DNA サンプル全量 (1 2 μ l) を電気泳動する. コントロールとして濃度が既知のマーカー (λ フェージ DNA を *Hind*III で切断したもの 1 μ g/レーン) を同時に泳動する.
- 3) 泳動終了後, ゲル写真撮影装置を用いて写真をとる. 抽出の際分解などが生じていなければゲノム DNA は分子量が非常に大きいため 0.8%アガロースゲルでは分離されず, ウェルに近い位置にバンドを生じる. 低分子の位置にスメアがみられる場合は, 抽出過程での DNA が分解や不純物として RNA が混入していると考えられる.
バンドの濃さ (蛍光の強さ) は DNA 量に比例する. λ フェージを *Hind*III で切断したマーカーでは複数のバンド (0.5-23 kb に 7 本) が認められるが, これらのバンドのモル比は 1 : 1 なのでバンドの濃さはほぼ長さ (つまり重量) に比例している. このことを利用し, マーカーのバンドの濃さとの比較から, おおよその DNA 濃度を推定する.
大腸菌から抽出したプラスミド DNA をそのまま電気泳動した場合, その形態の異なる分子 (開環状, 閉環状等) が混在するため複数のバンドが認められる. このためアガロースゲル電気泳動による定量を行う場合には, プラスミド DNA を制限酵素で 1ヶ所切断し, 直線状の分子にしておく必要がある.
電気泳動による定量は DNA の分解や RNA の混入といった抽出 DNA の質の確認も可能となる. しかし, 吸光度の測定のような正確な定量は困難である. 両者の特徴を考慮し定量を行うことが必要である.