

実験方法（

第1章 葉の洗浄

- ①ペーパータオルm、乳鉢、乳棒（サンプルごと）
- ②5ミリ四方に切る
- ③HEPES 洗浄液を 1 mL 乳鉢に加える

HEPES 洗浄液（1 サンプル分）：0.1M-HEPES-NaOH buffer (pH8.0)	1.0mL
2-mercaptethanol	20 μ L
pvp	10.0mg
Ascorbic Acid	9.0mg

*実際のサンプル数×2+2程度

- ④乳棒で葉をよくすりつぶす（10分～15分程度）
- ⑤マイクロピペットですりつぶしたサンプルをエッペンチューブに移す。
- ⑥チューブを BART 6、800G で 5 分遠心
- ⑦上澄みをマイクロピペットで捨てる
- ⑧新たに HEPES 洗浄液を 1 mL 加えてボルテックス（10 秒間程度）
- ⑨チューブを BART6、800G で 5 分遠心
- ⑩上澄みをマイクロピペットで捨てる
- ⑪-20°C で保存（長期間使用しない場合は、4°C）

第2章 DNA 抽出

- ①すりつぶした葉の入ったチューブに 60°C の DNA 抽出液を 560 μ L 加えてボルテックス（→スピンドウン）

DNA 抽出液（1 サンプル分、60°C に加温して余裕を持った量を調整）

2 × CTAB	600 μ L
Lysis buffer	60 μ L
2-mercaptethanol	6 μ L

- ②60°C のヒーターにセットする。（30 分以上、10 分おきくらいにボルテックス、ボルテックスは 10 カウント程度、続いてスピンドウン）
- ③クロロホルム-イソアミルアルコール混合液（クロイソ）を 500 μ L 加えて手で良く振る
- ④チューブを BART6、MAXG で 10 分遠心
- ⑤上澄みをマイクロピペットで回収して新しいチューブに移す。
- ⑥回収した上澄みにクロロホルム-イソアミルアルコール（クロイソ）を 500 μ L 加えて、手で良く振る
- ⑦チューブを BART6、MAXG で 10 分遠心
- ⑧上澄みをマイクロピペットで回収して、新しいチューブに移す。
- ⑨回収した上澄みに-20°C に冷却した 2-プロパノールを 400 μ L 加える（このとき DNA がみられるかもしれない）
- ⑩手で振ったあと、冷蔵庫で-20°C に冷却する（10 分以上）
- ⑪チューブを BART6、MAXG で 10 分遠心

- ⑫上澄みをマイクロピペットで吸い取り、捨てる。チューブの底に DNA が溜まっていると想像し、底に触れないように吸う
- ⑬ -20°C に冷却した 70%エタノールを $500\mu\text{L}$ 加え、手で良く振る。
- ⑭チューブを BART6、MAXG で 5 分間遠心する
- ⑮上澄みをマイクロピペットで吸い取り捨てる。チューブの底に DNA が溜まっていると想像し、底に触れないように吸う
- ⑯チューブの蓋を開けてデシケーターで減圧乾燥する 10 分間 または、室温で overnight
- ⑰TE を $100\mu\text{L}$ 加え、ボルテックス
- ⑱ -20°C で保存する（長期間保存しない場合は -4°C ）

第 3 章 PCR 増幅

《 normal PCR 》

- ① PCR 増幅用溶液を必要量調整し、 $19\mu\text{L}$ ずつプレートに分注する（実際は少し少なめの $18.8\mu\text{L}$ ）

PCR 増幅用溶液	$20\mu\text{L}$ 反応系	1 サンプル分
	MilliQ	$14.88\mu\text{L}$
	10×buffer	$2.0\mu\text{L}$
	dNTP	$1.6\mu\text{L}$
	プライマー 1 ($10\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	$0.2\mu\text{L}$
	プライマー 2 ($10\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	$0.2\mu\text{L}$
	Taq polymerase	$0.12\mu\text{L}$

* 冷蔵庫から出した試薬は、ボルテックス→スピンドアウンをしてから使用する。

* Taq polymerase は使用する直前に冷凍庫からとりだす。

* ボルテックス時間：酵素や DNA サンプルは 5 秒以内（DNA とタンパク質は激しくボルテックスしない Buffer や Primer は 10 秒程度）

* エッペンチューブで試薬を混ぜる時：マイクロピペットでピペッティング

- ②DNA サンプルを $1\mu\text{L}$ 加え、PCR 用シールでふたをする。

PCR 用シールは耐熱性がある。PCR にかけない時は、より安価な保存用シールでふたをすること

- ③プレートごとボルテックスして、BART7、500G 程度でスピンドアウン。

- ④BIORAD を起動させ、Protocol Library → NormalPCR → Run protocol と選択し、Sample Volume をサンプル総量 $20\mu\text{L}$ ("20")に変更

- ⑤サンプルが入ったプレートをセットし、Begin Run を選択して反応を開始させる。

サーマルサイクラーのプログラムは以下の通り。3 時間くらいかかる。

94°C	1 分	} × 35
50°C	1 分	
72°C	1 分	
72°C	5 分	
4°C	Hold	

⑥PCR 反応が終わったサンプルは-20°Cで保存する。

第4章 電気泳動による PCR 増幅の確認

①三角フラスコに Agarose S を 0.25 g とり、これに 1×TAE buffer を 50mL 加える。

訂正：×50 TAE buffer 4mL と蒸留水 196mL を混合し、Agarose を 1g 加える

②電子レンジを加熱し、AgaroseS を溶解させる。(700W 2分程度)

③溶液が 50°C ぐらいまで冷えたら、コームを付けたゲル枠に流し込み、そのまま放置（放冷）する
ゴミが入らないよう、ラップで覆う
1時間くらいで完全に固まる。

④アガロースゲルをゲル枠ごと電気泳動層にセットする。

⑤1×TAEbuffer を槽内に入れ、ゲルが完全に浸るようにする

⑥パラフィルムの薄い紙をはがし、その上に泳動用色素を 3 μL 滴下する

⑦PCR 産物を 6 μL とり、泳動用色素と混合する

⑧マイクロピペットの目盛りを 9 μL 程度にし、混合した液をアガロースゲルの穴に注入する。

⑨泳動槽のふたを閉めて電源を入れる。

100Vで行う。泳動用色素がゲルの半分くらいになったら終了

*泳動用の buffer は一度に 350mL つくる。

(×50TAE 7mL 蒸留水 343mL)

⑩電気泳動後のゲルをミドリグリーン溶液に浸す。

ミドリグリーン溶液：蒸留水 98mL ×5TAE Buffer2mL ミドリグリーン 5 μL

*古い色素は水道に捨てる。容器を蒸留水で洗い、新しい溶液を入れる。

*ミドリグリーンは発ガン性あり。ミドリグリーンをすったマイクロピペットの先端は、ラップに包んで捨てる。

⑪紫外線でバンドを確認。

第五章 PCR 後

①CIAP 溶液を作成する。

1sample 分	MilliQ	1.84 μL
	CIAP	0.1 μL
	Exo1	0.06 μL

*冷却ブロックで冷却しながら混合液を調整する。

②PCR プレートの増幅が確認されたサンプルのウェルに、2 μL ずつ分注する

*PCR 増幅が確認されたウェルと確認されなかったウェルの区別をする。マークする。

③ボルテックスしてスピンドウン

④BIORAD の CIAP シーケンスを起動する。45 分

⑤20 μL の MilliQ を加える

⑥マイクロピペットで 0.5mL エッペンチューブにうつす。

第6章 オートサイクルシーケンス

①オートサイクルシーケンス反応液 (4.5 μ L 反応系、1 サンプル分)

BigDye Terminator V3.1 Cycle SequencingKit 2.0 μ L (1.99 μ L)

プライマー 1種類だけ (1pmol/ μ L) 0.8 μ L

②テンプレート (CIAP 処理後の DNA サンプル) を 1.7 μ L 加え、PCR 用のシールでふたをする。

(①、②については BigDye →プライマー→テンプレートの順で 3 ポイントにマイクロピペットで置いていく)

③スピンドウンして、プレートごとボルテックス→スピンドウン (BART 7、500G)

Protocol Library → Cyclicseq → Runprotocol → Sample Vol 15 に変更

⑤同じ画面で HotStart? を” Yes” HotStartTemperature (°C) → 96°Cに変更

⑥BeginRun を選択し、温度を上昇

⑦96°Cまで温度があがったことを確認したら、サンプルが入ったプレートをセットし、[Resume Run] を選択

(サイクラーのプログラム)

96°C 1分 Hold Hot Start

96°C 10秒
50°C 5秒
60°C 4分 } ×25

4°C Hold

⑧オートサイクルシーケンスが終わったサンプルは、なるべく早く精製を行う。

7章 エタノール沈殿による精製 (この処理は外部業者委託する場合のみ)

① 混合溶液 (50 サンプル分、通常は 96 サンプルを一気にやるので、100 サンプル単位で調整する)

3M 酢酸—酢酸ナトリウム 40 μ L

77%エタノール 960 μ L

② オートサイクルシーケンス後の試料に①の混合液を 20 μ L ずつプレートに分注

ボルテックス

☆シールでふたをしなくて良い

☆プレートの穴に触れない

☆ボルテックスは液がはねないくらいのスピード (3くらい)

③遠心 BART7,MAXG、20 分間

④流し台でプレートを逆さにして余分な液をすて、ペーパータオルの上にプレートを軽くたたきつけて上澄みを除く。コンタミしないように注意。

⑤70%エタノールをそれぞれ 100 μ L 入れ、ボルテックス

☆シールでふたをしなくて良い

☆プレートの穴に触れない

☆ボルテックスは液がはねないくらいのスピード (3くらい)

⑥遠心 BART7,MAXG、10 分間

⑦プレートを逆さにして余分な液をすて、ペーパータオルの上にプレートを軽くたたきつけて上澄みを

除く。コンタミしないように注意。

⑧プレートを逆さにしてペーパータオルの上のせ、そのまま BART 7 で 500G になるまで遠心

⑨塩基配列を解析するためのサンプルができた。

第 8 章 シーケンサーにかける準備

<プレートの準備>

①シーケンス反応を終えた Well に Hi-DiFormamide を 10 μ L ずつ分注する。ボルテックスしてスピンドウン（シールは必要ない）

②サーマルサイクラーのプロトコル名「HEATSHOC」を選択

プログラムは 95°C、2 min→4°C、5min。温度が 95°C まで上昇したことを確認してから、プレートをセット。サーマルサイクラーのふたは閉じない。溶液が Well の底にあることを確認する。

③プレートベース（黒）にサンプルプレートをセットする。向きがきまっているので注意

④サンプルプレートの上にセプタストリップ（灰）をセットし、プレートリテーナ（白）をはめる。カチッと音が鳴ったことを確認する。穴があっていないと、キャピラリアレイの穴が破損する。

⑤Elix 水、MilliQ 水、1 \times Running buffer を用意。これらとサンプルプレートを持って、シーケンサーのもとへ。