

## 6. ミヤコグサ遺伝子解析法 (1) DNA抽出法

### (1) CTAB法によるミヤコグサDNA調製

河内宏

農業生物資源研究所・生理機能研究グループ・窒素固定チーム

kouchih@nias.affrc.go.jp

サザンハイブリダイゼーションなど、大量のgenomeDNAを必要とする実験に用いる植物DNA抽出法である。

〔準備するもの〕

#### 試薬等

- 5xCTAB液
- 10%CTAB溶液  
沈殿バッファー  
1M NaCl/TE8、  
クロロホルム  
イソプロパノール、75%エタノール、TE8  
Rnase(10mg/ml)

1.5x CTAB		
CTAB (Sigma)	3.0g	(1.5% w/v)
1M Tris pH8.0	15ml	(75mM)
0.5M EDTA	6ml	(15mM)
5M NaCl	42ml	(1.05M)
PVP (Sigma for MB)	1.5g	(0.75% w/v)
To 200ml with sH <sub>2</sub> O, Store at RT		

10% CTAB	
CTAB	2g
sH <sub>2</sub> O	15ml
Dissolve at ~50°C	
Add 2.8ml of 5M NaCl	
To 20ml with sH <sub>2</sub> O	

沈殿バッファー		
CTAB	2.5g	(1% w/v)
1M Tris pH8.0	25ml	(100mM)
0.5M EDTA	10ml	(20mM)
sH <sub>2</sub> O to 250ml		

1M NaCl/TE8.0	
5M NaCl	10ml
20x TE8.0	2.5ml
sH <sub>2</sub> O	37.5ml

#### 器具等

乳鉢・乳棒・ジルコニアビーズ等 (植物組織破碎用)

FALCONE 2070, 2059

P5000チップ、ピペットマン

ウォーターバス、震盪器 (回転型の震盪器がベスト)、エッペンチューブ用電動ホモジナイザー

〔方法1・ラージスケール〕

1. 植物試料 (5-10g) を液体窒素中、乳鉢で微細粉末にする。(注1)
2. 液体窒素ごと、ファルコン 2070 チューブに移す
3. -80°Cにおいて、液体窒素を完全にとばす。
4. 10mlの 1.5xCTAB液 (70°Cに暖めておく) を加え、直ちにプラスチック棒でよく混ぜる。
5. 60°C湯浴中においてゆっくりしんとする。15分
6. 10ml のクロロホルムを加えて転倒混和する (15分)(注2)
7. 遠心、スイングローター、3000rpm、15分、室温
8. 上層を P5000 で新しい2070 チューブに移す
9. クロロホルム抽出を繰り返す
10. 1/10 容の 10%CTAB 溶液を加え、よく混ぜる
11. クロロホルム抽出を繰り返す
12. 等量の沈殿バッファーを加える
13. 室温に 15分おく
14. 遠心、スイングローター、5000rpm、15分、室温
15. 沈殿に 5ml の 1M NaCl/TE8 を加える
16. 60°C湯浴中において溶かす (注3)
17. 液を 2059 チューブに移す
18. 等量のイソプロパノールを加えて混ぜる
19. 遠心、1000rpm、1分、室温
20. 沈殿を 75%エタノールで洗浄し、乾燥させる (注4)
21. 500-1000 $\mu$ l のTE8 に溶かす。5-10 $\mu$ l のRnase(10mg/ml)を加えて、4°Cに保存

注1 サンプルを 2070 チューブに入れ、ジルコニアビーズを入れて液体窒素につけて冷やし、ボルテックスする方法で効率的に粉碎できる。乳鉢を用いるよりもこの方がよい。

注2 適当な震盪器を使う。震盪中にクロロホルム層と水層が分離しない程度の速度で震盪する。

注3 しばしば完全に溶けるのに時間がかかる。1日以上かかることもあるが、根性で溶かす  
乾かしすぎない方が、溶かすのに楽。

ピペティング等に十分注意を払えば、この方法で高品質のDNAを調製できる。

〔方法2・マイクロスケール〕

1. 約100-300mgの植物サンプル(葉2-3枚以上)を1.5ml エッペンチューブにとる。
2. 液体窒素または-80℃フリーザー中で凍結
3. あらかじめ液体窒素で冷やしたエッペンチューブ用電動ホモジナイザーで微細粉末にする。
4. 70℃の 300  $\mu$ l 1.5x CTABを加え、直ちに混和する
5. 60℃, 25分、震盪する(注1)
6. 等量のクロロホルムを加え、15分転倒混和する
7. 遠心、15krpm、10分、室温
8. 上清をとる。
9. クロロホルム抽出を繰り返す
10. 1/10容の10%CTAB液を加えてよく混ぜる
11. クロロホルム抽出を繰り返す
12. 等量の沈殿バッファーを加えてよく混ぜる
13. 室温、15分以上放置
14. 遠心、15krpm、10分、室温
15. 600  $\mu$ lの1M NaCl/TE8に溶かす(60℃)
16. 600  $\mu$ lのイソプロパノールを加えて混ぜる
17. 遠心、12krpm、5分、室温
18. 沈殿を75%エタノールで洗浄する
19. 50  $\mu$ lのTE8に溶かし、1 $\mu$ lのRNase (10mg/ml)を加え、4℃保存する。

注1 2070チューブにエッペンチューブを入れ、震盪器で転倒混和するのがもっともよい。以下クロロホルム抽出も同様

## (2)DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)による植物ゲノム DNA 抽出法

今泉(安楽)温子  
農業生物資源研究所・生理機能研究グループ  
[onko@nias.affrc.go.jp](mailto:onko@nias.affrc.go.jp)

本法では、ミヤコグサ葉 0.1-0.2g から 10ug 前後のゲノム DNA を抽出できる。一度の実験で、24 サンプルの DNA 抽出が 3 時間程度で可能であり、AFLP サンプルとしても利用可能である。

### 〔準備するもの〕

#### キット・試薬

Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen; 20sample 69103, 50 sample 69104, 250 sample 69106)  
100% EtOH

#### 器具・装置

ジルコニアビーズ、タングステンビーズ等 ( 5mm )  
FALCON 2070 チューブ  
エッペンドルフチューブ 2.0, 1.5ml  
ウォーターバス、ヒートブロック、ボルテックス

### 〔方法〕

1. ミヤコグサの葉は、0.1-0.2g 程度を収穫後、アルミホイル等にくるみ、-30~-80 で保存しておく。
2. FALCON 2070 チューブに、ジルコニアビーズを 8 個程度入れ、チューブの蓋をしめて、液体窒素で冷やしておく。  
ここに、ミヤコグサの葉をいれ、ボルテックスにより、葉を粉碎処理する ( 約 30 秒で破碎できる )
3. AP1 buffer 400ul を加え、ボルテックスをかけながら、混和する。溶液を 2.0ml チューブに移し、5ul RNase sol を加えて混和した後、ヒートブロック等で 65 、10 分処理をおこなう。処理中、2-3 回、チューブを転倒混和する。
4. AP2 buffer 130ul を加え、混和後、氷中に 5 分静置する。
5. 得られた反応液を、QIA shredder spin column ( 紫 ) にアプライする。12,000rpm, 2min, RT 遠心する。( 反応液の粘性が高い場合は、spin column にかける前に、遠心 12,000rpm, 2min, RT し、上清のみを spin column にかけてもよい )
6. 得られた溶液を、1.5ml チューブに取り、1.5 倍量の AP3/EtOH 溶液を加え、良く混和する。
7. 6 の反応液を DNeasy mini spin column にアプライし、10,000rpm, 1min, RT 遠心する。
8. DNeasy カラムに新しい付属チューブをつけ、AW buffer 500ul をアプライ後、10,000rpm, 1min, RT 遠心し、カラム洗浄する。もう一度 AW buffer をアプライし、15,000rpm, 1min, RT 遠心し、buffer をカラムから除去する。
9. カラムに 1.5ml チューブをつける。あらかじめ 65 で温めておいた AE buffer 100ul をアプライし、室温に 5 分間置いて、カラム内の DNA を溶出する。10,000rpm, 1min, RT 遠心して、溶出液をチューブに落とす。これをもう一度繰り返す。
10. 全 200ul の DNA 溶液のうち、2-5ul をとって、電気泳動にてチェックする。DNA 溶液は 4 で保管する。

### (3)DNA の簡易抽出方法 (PCR 用)

田畑哲之  
かずさ DNA 研究所  
tabata@kazusa.or.jp

ミヤコグサの各種組織から、サザン分析、PCR などおおよその用途に問題なく使用できる純度の DNA を簡便に抽出することができる。

#### 〔準備するもの〕

##### キット・試薬

Nucleon PhytoPure, plant and fungal DNA extraction kits (Amersham Pharmacia)

RPN8510 (for 0.1 g x 50 samples) 17000 円

RPN8511 (for 1.0 g x 50 samples) 32000 円

Isopropanol, 80% EtOH

TE

##### 器具等

2 ml microtube (アシスト)

3 mm, 6 mm アルミナビーズ (メーカーは問わない・1Kg 2000 円程度のものでよい)

TOMY microtube mixer [MT-360]

TAITEC ミキサー(

#### 〔方法〕

##### (1) 組織の破碎法

サンプルの数が少ない場合は、液体窒素で凍結した状態で破碎する。多い場合は、アルミナビーズを使用する。後者の場合、攪拌の時間が長いと DNA が数 kb 程度に壊れるが、PCR の鋳型としては問題ない。

##### A. サンプル数が少ない場合

1. 2 ml の microtube (アシスト) に、Nucleon PhytoPure DNA prep kit (Amersham) I 液に最終濃度 100  $\mu$ g/ml RNaseA を加えたものを 750  $\mu$ l 入れる。
2. 100~150 mg のサンプルを液体窒素中で乳鉢で破碎する。
3. 破碎したサンプルを 1 のチューブにいれて攪拌する

##### B. サンプル数が多い場合

1. 2 ml の microtube (アシスト) に径 3 mm のアルミナビーズ 0.7 g (10 個) と径 6 mm のアルミナビーズ 2 個を入れる。(3 mm のビーズが底にくるように先に入れる)
2. Nucleon PhytoPure DNA prep kit (Amersham) I 液に最終濃度 100  $\mu$ g/ml RNaseA を加えたものを 750  $\mu$ l 入れる
3. 植物体 100~150 mg をハサミで 0.5 mm 程度にきざんで、2 のチューブにいれる  
(なるべく若くて柔らかい葉を使う)
4. TOMY mixer 最高回転で 15-20 分間振とうする(途中で、均一に攪拌、破壊されているか確認)

(2) DNA の抽出

5. II 液を 250  $\mu$ l 加え混合した後、65、10 分間 incubation (たまに攪拌する)
6. ラックごと-20 に入れ(フタなし) 20 分間 静置
7. -20 に冷やした Chloroform を 400  $\mu$ l 加える
8. Nucleon PhytoPure resin を 35  $\mu$ l 加える
9. TAITEC ミキサー、140rpm 室温で 10 分間振とうする
10. 1300 x g、25、10 分間遠心する (microcentrifuge で 5,000 rpm)
11. 遠心の際に、2 ml の microtube に isopropanol を 0.9 ml 入れておく
12. ピペットマンを 1 ml に合わせ、水層最大 1 ml を 11 のチューブに移し、よく振盪後 4、30 分間以上静置
13. microcentrifuge で 15,000 rpm 15 分間遠心する
14. 80% Ethanol 500  $\mu$ l を加えかるく振とうした後、15,000 rpm 5 分間遠心する
15. Ethanol を完全に除いた後、風乾 10 分
16. TE を 50  $\mu$ l 入れかるく振とうした後、4 1 時間以上放置
17. かるく振盪し完全に溶けていることを確認後、15,000 rpm 5 分間遠心する
18. 水層を保存用チューブに移し、1  $\mu$ l を電気泳動

#### (4)形質転換ミヤコグサのDNA抽出法

河内宏

農業生物資源研究所・生理機能研究グループ・窒素固定チーム

kouchih@nias.affrc.go.jp

この方法はPCRまたはサザンブロッティングによる導入遺伝子の検出に用いることができる。

##### 〔準備するもの〕

##### 溶液・器具等

抽出バッファー(50ml) ;

1M Tris-Cl pH7.5 10ml (200mM)

5M NaCl 2.5ml (250mM)

0.5M EDTA pH8 2.5ml (25mM)

10% SDS 2.5ml (0.5%) 滅菌水で50mlに調製

フェノール、フェノール/クロロホルム、クロロホルム

イソプロパノール、75%エタノール

RNase(10mg/ml)

攪拌プラスチック製粉碎ロッド、エッペンチューブ用電動ホモジナイザー

##### 〔方法〕

1. 約100mgの植物サンプル(葉2-3枚)を1.5mlエッペンチューブにとる。
2. 液体窒素または-80℃フリーザー中で凍結
3. あらかじめ液体窒素で冷やしたエッペンチューブ用電動ホモジナイザーで微細粉末にする(注1)。
4. 500 $\mu$ lの抽出バッファーを加え、プラスチック製ロッドでよく攪拌する(注2)。
5. 室温、30分処理後、遠心、13krpm、1分
6. 上清約350 $\mu$ lを新しいエッペンチューブに移す。
7. フェノール抽出(ボルテックス2秒)。
8. フェノール/クロロホルム抽出(ボルテックス2秒)
9. クロロホルム抽出(ボルテックス2秒)
10. 等量のイソプロパノールを加え混合
11. -70℃、30分
12. 遠心、15krpm、5分、4℃
13. 沈殿を75%エタノールで洗浄し、乾燥させる。
14. 50 $\mu$ lの水に溶かし、RNase(10mg/ml)を1 $\mu$ l加え、-20℃保存する。

注1 この間試料を溶かしてはいけな。凍結のまま粉末にする。金属製のロッドを持つ電動ホモジナイザーならば、20秒以内に粉末に出来る。電動ホモジナイザーがない場合、新鮮試料をいきなり抽出バッファーとともにプラスチックロッドで粉碎しても可。ただし収量は落ちる。

注2 エッペンチューブにあわせたプラスチックの攪拌粉碎ロッドが各社から市販されている。

## (5)ミヤコグサからの簡易 DNA 抽出法

村上泰弘

農業生物資源研究所・生理機能研究グループ

ydry@nias.affrc.go.jp

本法は、positional cloning を目的とした F2 解析など一度に多数のサンプルを解析する際の簡易 DNA 抽出法として優れている。

〔準備するもの〕

### 試薬・溶液

TE buffer (pH8.0) (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 8.0)

### 器具・装置

1.5 ml マイクロチューブ

つまようじ (120 、二時間乾熱滅菌したもの、すりつぶし棒として使用)

鍋 (100 沸騰水用、電熱式鍋なども便利)

〔方法〕

1. 最上位の本葉 1 枚 (大きければ半分程度) を 1.5ml マイクロチューブに入れ、-80 で保存する (数日以内で使用するのであれば、4 保存で問題ない)。
2. チューブに直接 TE (pH8.0) 100 ul 加え、すりつぶし棒等を使って、液が緑色になる程度まですりつぶす (多数の個体を扱う場合一度にすりつぶしても構わないが、少なくとも 30 分以内で次のステップに進むのが望ましい)。
3. 15 分間沸騰水につけ、熱処理する。
4. 5,000rpm、6 分間、4 で遠心する。
5. 上清を回収し、-80 で保存する。PCR には 2ul を用いる。

注意：1kb 以上の DNA 断片の増幅は悪い。

(Reference)

池田延之、山田哲也、上島脩志、石井尊生：イネ Wild QTL 解析 6. イネにおけるマイクロサテライトマーカーを利用した効率的な marker-assisted selection のための超簡単 DNA 抽出法、育種学研究 2 (別 2)、134 (2000)



## 6. ミヤコグサ遺伝子解析法 [2] RNA抽出法

### (1) ATA法によるノーザン分析のためのRNA調製

河内宏

農業生物資源研究所・生理機能研究グループ・窒素固定チーム

kouchih@nias.affrc.go.jp

この方法で調製されたRNAはRNaseを含むあらゆる酵素反応を受け付けない(ことになっている)。従って、操作中に格別のRNaseに対する注意を必要としないが、調製したRNAはノーザン分析にのみ用いることが出来る。収量はきわめてよい。なお、残念なことにTINSは目下入手不能になっている。

#### [準備するもの]

##### 試薬・溶液等

ATA ; Aurin tricarboxylic acid (Practical Grade, Free acid: Sigma)

TINS ; Triisopropylnaphtalene sulfonic acid Na salt (Cica or Kodak)

Extraction buffer

3M KCl

10M LiCl

フェノール/クロロホルム、クロロホルム

5M NaCl

100%エタノール、75%エタノール

##### ATA stock (100mM)\*1

ATA	422 mg
in 10 ml EtOH (Store at 4°C)	

##### Ext. Buffer (100ml)

1M Tris pH8.0	5 ml	(50mM)
5M NaCl	6 ml	(300mM)
0.5M EDTA	1 ml	(5mM)
10% SDS	20 ml	(2%)
100mM ATA	2 ml	(2mM)
TINS*2	2 g	(2%)
H <sub>2</sub> O	to 100 ml	

Before use: Add 1/1000 vol 2-Me

##### 器具

乳鉢・乳棒 (組織破碎用)

20ml ガラスバイアル

FALCONE 2070, 2059

マグネティックスターラー

#### [方法]

1. 1~2 gの試料を乳鉢で液体窒素中微細粉末とする
2. 20mlガラスバイアルに移し、液体窒素をとばす。
3. ファルコン2070チューブに移し、液体窒素をとばす。
4. 5mlのExtraction Bufferを加え、マグネティックスターラーで5分以上攪拌する。
5. すべてを (マグネット以外) ファルコン2059チューブに移す
6. 700 $\mu$ lの3M KClを加えてよく混ぜた後、氷上に15分以上おく
7. 遠心、13000rpm、10分、4°C
8. 上清を新しい2059チューブに移す (約5.5ml)。
9. 2.2mlの10M LiClを加えてよく混ぜ、氷上に30分以上おく。
10. 遠心、13000rpm、15分、4°C
11. 沈殿を500 $\mu$ l H<sub>2</sub>Oにて溶かす。

12. 溶液をエッペンチューブに移す。
13. フェノール/クロロホルム抽出、2回
14. クロロホルム抽出、1回
15. 50 $\mu$ l 5M NaCl、1mlエタノールを加え、-70 、15分以上
16. 遠心、15krpm、15分、4 $^{\circ}$ C
17. 沈殿を75%エタノールで洗浄し、乾燥させる
18. 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>Oに溶かす。-80 で保管。

## (2) RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)によるTotal RNA抽出

河内宏

農業生物資源研究所・生理機能研究グループ・窒素固定チーム

kouchih@nias.affrc.go.jp

通常数10 $\mu$ gのRNAが得られる。サンプル量は最大200mg程度まで。

〔準備するもの〕

### キット・溶液等

Qiagen RNeasy Plant Mini Kit (74903, 74904)

RLTまたはRLC ; 使用直前に10  $\mu$ l/ml  $\beta$ -Meを加える

RPE ; キットに含まれるRPEを4容の100% エタノールで希釈する。数ヶ月は安定

〔方法〕

1. 約100mgの植物サンプル(葉2-3枚)を1.5mlエッペンチューブにとる。
2. 液体窒素または-80 $^{\circ}$ Cフリーザー中で凍結
3. あらかじめ液体窒素で冷やしたエッペンチューブ用電動ホモジナイザーで微細粉末にする。
4. 450  $\mu$ lのRLT(またはRLC)を加えてボルテックス、3分(注1)
5. 先端を切って口を太くしたブルーチップですべてをQIAshredder spin columnにかける
6. 遠心、15krpm、2分、室温(注2)
7. 上清をとり、1/2容のエタノールを加えてよく混ぜる
8. RNeasy mini spin columnにかける
9. 遠心、10krpm、15秒、室温
10. Flow-throughを捨てる
11. カラムを700 $\mu$ lのRW1 bufferで洗う(遠心条件は以下9.と同様)
12. カラムを500 $\mu$ lのRPE bufferで洗う
13. これを繰り返す、ただし遠心は15krpm、2分
14. カラムを新しいエッペンチューブに移し30  $\mu$ l H<sub>2</sub>Oで抽出する(遠心、10krpm、1分)
15. さらに30  $\mu$ l H<sub>2</sub>Oで抽出を繰り返す(注3)。
16. 合計60 $\mu$ lを-80 $^{\circ}$ Cに保存

注1 ミヤコグサ葉についてはRLCを用いた方が安全。RLTでは糊状になることがある。

注2 粘性が高くてカラム上に残る場合は、遠心を繰り返す。

注3 RNA濃度が低い場合、ここでエタ沈濃縮してよい。

### (3)FastTrack 2.0 (Invitrogen) によるPoly(A<sup>+</sup>) RNA単離法

河内宏

農業生物資源研究所・生理機能研究グループ・窒素固定チーム

kouchih@nias.affrc.go.jp

本法により、ミヤコグサ葉、根粒、根などからライブラリー作成、逆転写によるプローブ調製やRT-PCRなどに用いる、純度の高いpoly(A<sup>+</sup>)RNAが調製できる。マイクロスケールには、MicrFastTrackキットが同様に用いることが出来る。

#### 〔準備するもの〕

##### キット・試薬等

FastTrack 2.0 (Invitrogen: #K1593-02)

Lysis Buffer ; キット付属のStock Buffer 15mlに300 μlのProtein/RNase degraderを加える。用事調製

75% EtOH

##### 器具・装置等

FALCON 2070

21ゲージ注射針

30ml シリンジ

ボルテックス、ポリトロン、ウォーターバス

#### 〔方法〕

1. 1~2 gの試料を乳鉢等で液体窒素中微細粉末とする
2. ファルコン2070チューブに移し、液体窒素をとばす。
3. 15mlのLysis bufferを加え、ポリトロンでホモゲナイズ(最高速度、20-30秒)する
4. 45℃湯浴中で60分インキュベート(ゆっくり震盪する)
5. 遠心、5000rpm、10分、室温
6. 上清を新しい2070チューブに移し、950 μlの5M NaClを加える。沈殿が消えるまでよく混ぜる。
7. 21ゲージの注射針をつけた30mlシリンジで4-5回上下する
8. 1バイアルのoligo(dT) celluloseを加えて、軽くボルテックスし分散させる。
9. 室温で60分、しんとうする。
10. 遠心、5000rpm、7分、室温(以下同様)
11. oligo(dT) celluloseを乱さないように注意して上澄みをピペティングで捨てる
12. 20mlのbinding bufferにけんたくし、遠心する
13. 10mlのbinding bufferにけんたくし、遠心する
14. 10 mlのLow Salt Wash bufferで懸濁、遠心を繰り返す(4回)
15. oligo(dT) celluloseを約800 μl のLow Salt Wash buffer に懸濁する
16. スピнкаラムに移す
17. 5000rpm、10秒、室温(以下同様)
18. 残りのoligo(dT) celluloseをすべてスピнкаラムに移し、遠心
19. 500 μlのLow Salt Wash bufferで洗浄、3回繰り返す洗液はその都度捨てる。

20. カラムを新しい 12ml チューブに移す。
21. 200  $\mu$ l の Elution Buffer を加え、イエローチップで oligo(dT) cellulose を懸濁してから遠心する。
22. さらに 200  $\mu$ l の Elution Buffer で溶出を繰り返す。
23. 計 400  $\mu$ l の溶出液に 65  $\mu$ l の 2M NaOAc と 1ml のエタノールを加える。
24. -70°C、15分以上おく
25. 遠心、15krpm、20分、4°C
26. 沈殿を 75% エタノールで洗浄後、乾燥させる
27. 10-15 $\mu$ l の 15 Elution Buffer (10mM Tris, pH7.5) に溶かす。 -80 で保管。

#### (4)ミヤコグサ RNA 単離法

かずさ DNA 研究所 浅水恵理香

asamizu@kazusa.or.jp

本法は筆者らがcDNAライブラリーを作製するために、比較的純度の高いpoly(A)<sup>+</sup> RNAを多くとる目的で用いた方法である。2つの方法はどちらも多糖類やフェノール化合物などを多く含む材料に適した方法であるが、②の方がより夾雑物の多い材料からでも比較的質の高いRNAが得られるようである。Total RNAの収量は、両者の方法とも5gの組織あたり500μg前後である。

RT-PCRなどを行うために少量のサンプルを扱う場合はスケールダウンするか、もしくは市販のキット(RNeasy Plant Mini Kit, Qiagenなど)を使う。

##### RNA 単離法① (Phenol/SDS を用いる方法)

〔準備するもの〕

###### 試薬等

抽出バッファー 1 M Tris-HCl (pH 9.0)/1% SDS}、10 ml Phenol (pH 9.0)

Chloroform, Phenol:Chloroform=1:1 溶液

4M, 2M LiCl

0.1M Sodium acetate

99.5%, 70% EtOH

〔方法〕

1. 液体窒素を入れた乳鉢中で植物体 ( ~5g ) をすりつぶす。
2. 10 ml 抽出バッファーに凍った状態の粉末を入れ、ポリトロンで約5分間ホモジナイズする。
3. 10 ml Chloroform を加え、更に1分間ホモジナイズする。
4. 遠心 8000×g、10分、室温。
5. 水層を新しいチューブに移し、20 ml Phenol:Chloroform=1:1 溶液を加える。チューブを上下に転倒させて混合する。
6. 遠心 8000×g、10分、室温。
7. 5、6を2回繰り返す。
8. 等量の4M LiCl を加え、ice bathに一晩おく。
9. 遠心 8000×g、30分、4°C。
10. 上清を捨てる。Pellet に5 ml 2M LiCl を加え、よく懸濁する。
11. 遠心 8000×g、15分、4°C。
12. 10、11を繰り返す。
13. Pellet を0.1 M Sodium acetate に溶解する。1.5 ml tubeに移す。
14. 100μl の99.5% EtOHをゆっくり加える。
15. 遠心 15,000 rpm、1分、4°C。
16. 上清を新しいチューブに移し、2.5倍量のEtOHを加える。-20°Cで2時間以上おく。
17. 遠心 15,000 rpm、20分、4°C。上清を捨て、pellet を70% EtOHで洗浄する。

18. 減圧乾燥後、pellet を適当量の TE に溶解する。

## RNA 単離法② (8M LiCl を用いる方法)

〔準備するもの〕

### 試薬等

抽出バッファー (8M LiCl, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol)

2M LiCl

100%, 70% EtOH

Solubilization buffer (10mM Tris-HCl (pH7.6), 25 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% SDS, 2% $\beta$ -mercaptoethanol)

Phenol (pH7.6), Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol=25:24:1, Chloroform:Isoamylalcohol=24:1

3M Sodium acetate

TE

〔方法〕

1. 液体窒素を入れた乳鉢中で植物体 (~5g) をすりつぶす。
2. 20 ml 抽出バッファーに凍った状態の粉末を入れ、ポリトロンで約5分間ホモジナイズする。
3. 4°Cに一晩おく。
4. 遠心 8000×g, 4秒, 4°C。
5. 上清を新しいチューブに移し、遠心 8000×g, 30分, 4°C。
6. 上清を捨てる。Pellet に5 ml の 2M LiCl を加え、よく懸濁する。
7. 遠心 8000×g, 15分, 4°C。
8. 6, 7 を繰り返す。
9. Pellet を 70% EtOH で洗浄する。軽く遠心後、数分風乾する。
10. 1 ml の Solubilization buffer に溶解する。
11. Phenol (pH7.6)抽出×2回。
12. Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol=25:24:1 抽出×1回。
13. Chloroform:Isoamylalcohol=24:1 抽出×2回
14. 1.5倍量の EtOH と 0.1倍量の 3M Sodium acetate を加え、-20°Cで2時間以上おく。
15. 遠心 15,000 rpm, 30分, 4°C。
16. 上清を捨て、pellet に0.5 ml の 3M Sodium acetate を加え、よく懸濁する。
17. 遠心 15,000 rpm, 10分, 4°C。上清を捨て、pellet を 70% EtOH で洗浄する。
18. 減圧乾燥後、pellet を適当量の TE に溶解する。

(Reference)

・細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ7「新版植物のPCR実験プロトコール」秀潤社

・Naito, S., Hirai, M. Y., Chino, M., and Komeda, Y. 1994, Expression of a soybean (*Glycine max* [L] Merr.) seed storage protein gene in transgenic *Arabidopsis thaliana* and its response to nutritional stress and to abscisic acid mutations, *Plant Physiol.*, **104**, 497-503.

・Vincent, C. M. and DeIseny, M. 1999, Isolation of total RNA from *Arabidopsis thaliana* seeds, *Analytical Biochem.*, **168**, 412-413