

## DNazol Genomic DNA Isolation Reagent による 培養細胞ゲノム DNA 抽出に関する標準操作手順書

### 1. 目的

1.1 本標準操作手順書は DNazol Genomic DNA Isolation Reagent による細胞ゲノム DNA 抽出について述べたものである。

### 2. 試薬類

2.1 DNazol Genomic DNA Isolation Reagent (#10503-027) は GIBCO-BRL 社製を使用する。

2.2 99.5% エタノール (#14713-95)、95% エタノール (#14711-15) はナカライテスク社製を使用する。

### 3. 培養細胞ゲノム DNA 抽出の手順

3.1 付着細胞の場合、トリプシンを用い、 $2-5 \times 10^6$  の monolayer をはがして、1.5 ml のエッペンドルフチューブに細胞ペレットを作る。浮遊細胞ならば、 $10^7$  の懸濁液を直接遠心し、1.5 ml のエッペンドルフチューブにペレットを作る。

3.2 1 ml の DNazol を細胞ペレットの上に加え、ピペッティングして混合し、細胞の塊を残さないように懸濁する。

3.3 0.5 ml の 99.5% エタノールを加え、5-8 回転倒攪拌する。室温で 1-3 分放置する。DNazol とエタノールが均一になったことを確認する。雲のような DNA 沈殿が見えるはずである。

3.4 新しいエッペンドルフチューブに 1 ml の 95% エタノールを加えておく。マイクロピペットチップを使って、3.3 の DNA 沈殿をチップの先で巻き取って回収する。チップを 95% エタノールのチューブに移し、素早く攪拌し、DNA 沈殿を外す。

3.5 DNA 沈殿が入ったチューブを 3-6 回で転倒攪拌して、一分間放置する。DNA ペレットがはがれないように注意しつつエタノールを捨てる。

3.6 1 ml の 95% エタノールを加え、同じようにもう一回 DNA ペレットを洗う。

3.7 エタノールを完全に除き、適当量 (50-100  $\mu$ l) の滅菌蒸留水を加え、ピペッティングして DNA を均一に溶解する。

3.8 分光光度計を用いて、波長 260 nm で O.D.値を測して、DNA の濃度を計算する。

計算式: DNA の量( $\mu\text{g/ml}$ )= $\text{O.D.}_{260} \times 50$

$\text{O.D.}_{260}$  \_\_\_\_\_  $\times 50 =$  \_\_\_\_\_ ( $\mu\text{g/ml}$ )

3.9 DNA 溶液を  $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  に調製し、分注して  $-20^\circ\text{C}$  で保存する。

保存場所: \_\_\_\_\_