

Genotyping

1. DNA 抽出 (フェノクロ抽出)

- 1) 100 μ l Tail buffer を入れたチューブに指を切り入れていく。
- 2) 50 でインキュベートを行う。(途中混和すれば2時間程度でも構わないが基本はO.N.)
- 3) 100 μ l フェノクロ液(下層)を入れ、ボルテックスし遠心する。(15,000 rpm, 5 min, 4)
- 4) 中間層のタンパク質(白い沈殿物)が入らないように上層を取り、100% EtOH(250 μ l)へ入れる。(このときは新しいチューブを用いる)
- 5) 攪拌すると、白い沈殿物が現れるがその綿状のものが核酸である。
- 6) 遠心。(15,000 rpm, 10 min, 4)
- 7) EtOH をキレイに全部捨て、70 % EtOH を入れ遠心。(15,000 rpm, 3 min, 4)
- 8) EtOH を捨て、室温にて約 5-10 分間乾燥させる。
- 9) 乾燥後 TE を 150 μ l 入れ、4 で保存。

2. PCR

- 10) 下記に記した polymerase Taq.以外の試液を氷上もしくは室温にて融解させる。
- 11) 使用する本数分のバッファーを調整するが、足りなくとも考えられるため一本多めの量で調製する。
- 12) 融解したら、水 PCR buffer dNTP primer の順に新しいチューブへと入れていく。
(これらは何れもボルテックスにより混和した後加えること)
- 13) これら全てを入れた後、ボルテックスにより混和 スピンドアウンを行う。
- 14) この後に、Taq.を入れる。(Taq.は極力熱にさらすことを避ける)
- 15) PCR チューブへと 12.5 μ l ずつ分注する。(PCR チューブにはフタ、本体ともに番号を書きしておくこと。また種類により色を使い分ける)
- 16) PCR チューブにバッファーを分注した後、DNA を 0.5 μ l ずつ加える。(DNA もボルテックスを行ってから加えること)
- 17) その後、スピンドアウンしサーマルサイクラーへ。

genotype PCR	volume (μ l)
10xPCR buff.	1.25
2.5 mM dNTP	1
primer	0.5
	0.5
Taq.	0.065
H ₂ O	9
DNA	0.5

Tail buffer (10ml)	
1 x SSC	500 μ l (x20)
10 mM Tris (pH 8.0)	100 μ l (1 M)
20 mM EDTA	400 μ l (500 mM)
1% SDS	1 ml (10%)
H ₂ O	7.5 ml
ProK (0.5 mg/ml)	500 μ l (10 mg/ml)