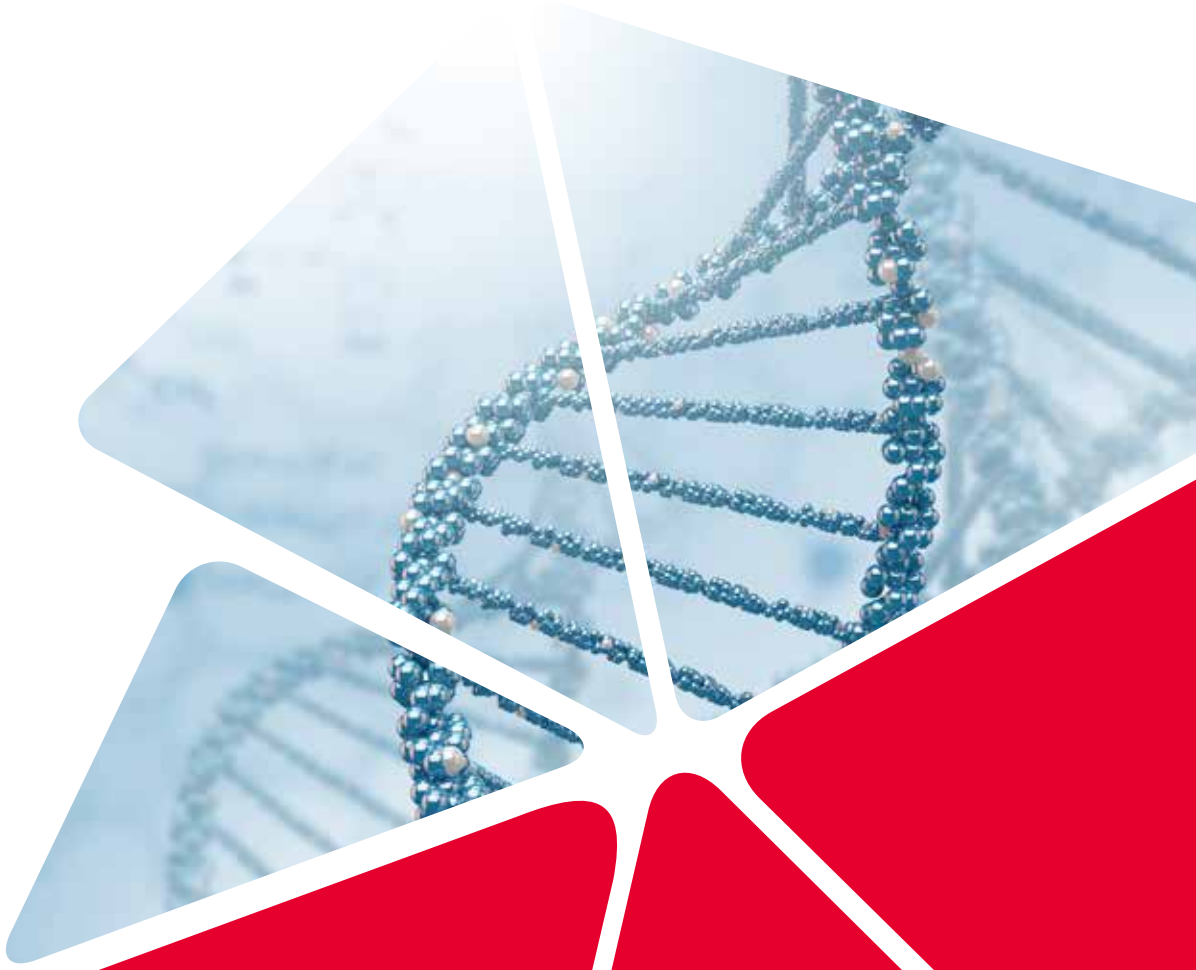
Biology

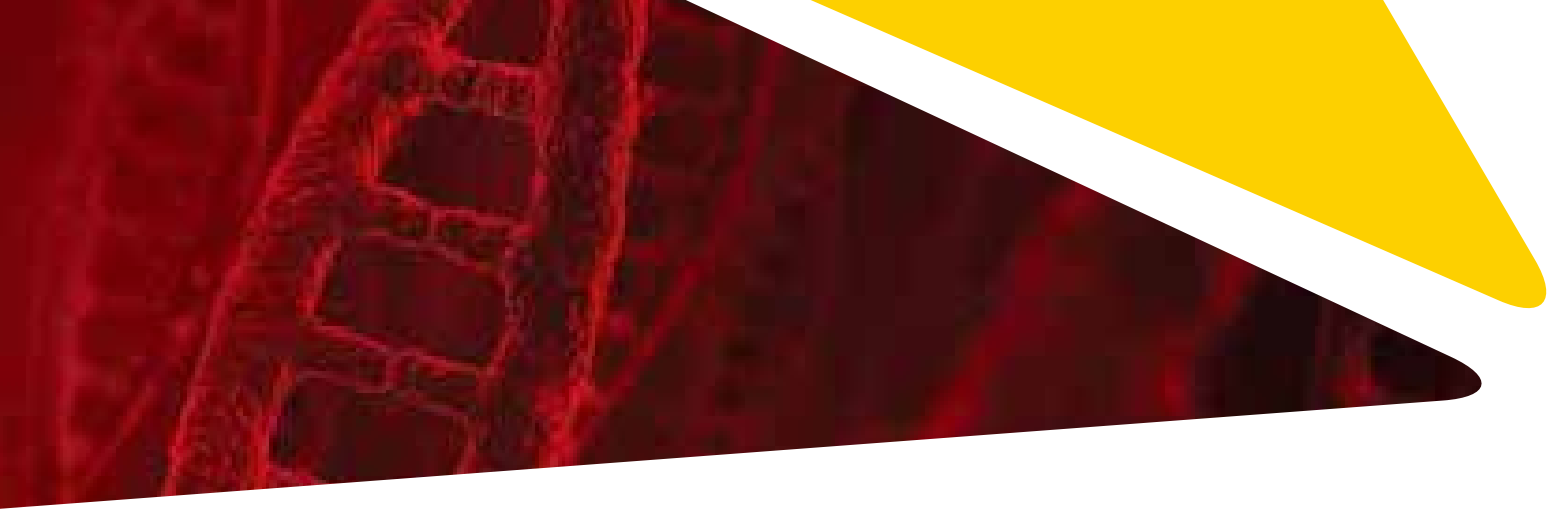
MERCK

シグマ アルドリッチ
遺伝子基礎じっけんレシピ集



The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

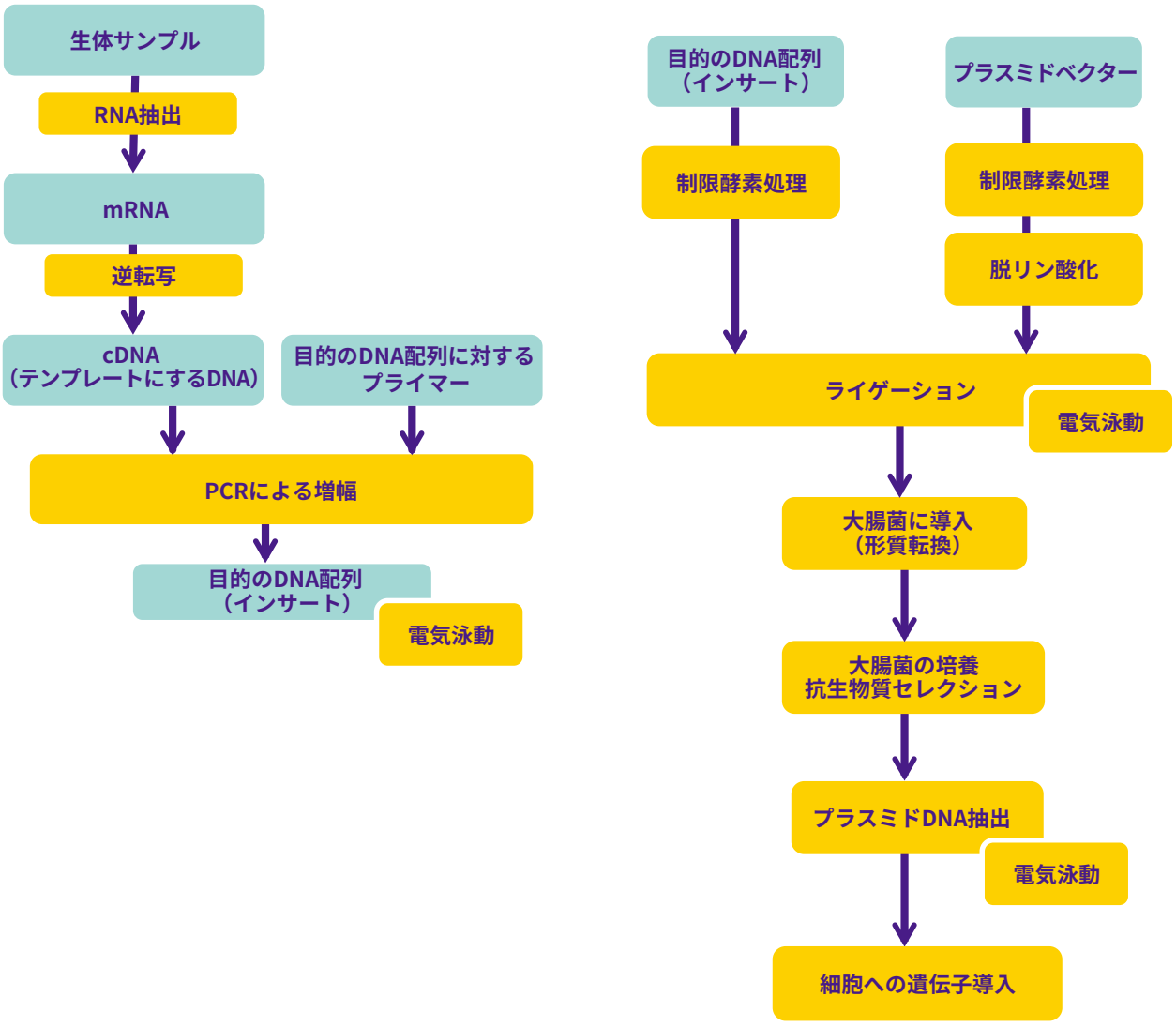
Sigma-Aldrich®
Lab & Production Materials



シグマ アルドリッチ遺伝子基礎じっけんレシピ集について

分子生物学は分子レベルでの生体メカニズムを研究するための学問で、動物や植物の細胞内ネットワークで作用する核酸およびタンパク質機能の解明を行います。分子生物学では長年にわたり最適化されたスタンダードな実験方法が確立されています。これらの基礎的な実験法は異なる多くの研究分野にも利用されています。
この「遺伝子基礎じっけんレシピ集」では、遺伝子に関する古典的な分子生物学の実験方法をワークフローに沿って紹介します。各実験の内容やプロトコール、最適な試薬についてご確認いただけます。

ワークフロー



目次

クローニング 4
プラスミドベクターと DNA フラグメントの制限酵素処理 4
プラスミドベクターの脱リン酸化 5
DNA の平滑末端クローニング（ブラントエンドクローニング） 5
DNA フラグメントとプラスミドのライゲーション 6
部位特異的変異導入 7

大腸菌操作 9
LB 培地の作成 9
LB 寒天培地の作成 9
SOC 培地の作成 10
TB 培地の作成 10
大腸菌の培養方法 11
抗生物質 12
大腸菌の形質転換 13
大腸菌の形質転換 14
大腸菌コロニーの凍結保存 14
コンピテントセル作成 15

大腸菌のセレクション 16
ブルーホワイトスクリーニング 16
制限酵素によるスクリーニング 17
コロニー PCR によるスクリーニング 17

大腸菌のプラスミド抽出 18
プラスミド DNA ミニプレップ 18
プラスミド DNA マキシプレップ 19

プラスミド精製キット 21
ミニプレップキット 21
プラスミド精製キット一覧 22

DNA サンプルのクリーンアップ 23
DNA のエタノール沈殿 23
DNA サンプルの RNase 処理と RNA の除去 23
フェノールクロロホルム抽出 24

ゲノム DNA 精製キット 25
ゲノム DNA 精製キット一覧 25
RNA 精製キット一覧 26

PCR 27
一般的な PCR 27
ホットスタート PCR 29
PCR 反応後の DNA 精製 30

サンプルからのダイレクト PCR 31
Extract-N-Amp（XNA）シリーズ 31

核酸のアガロースゲル電気泳動 33
アガロースゲル電気泳動 33
アガロースゲル電気泳動分子量マーカー 34
アガロースゲル電気泳動後の DNA 抽出 34

RNAi 35
siRNA または miRNA のトランスフェクション 35
shRNA レンチウイルスによるノックダウン 37
抗生物質（ピューロマイシン）濃度の最適化 38
shRNA レンチウイルスの感染効率評価方法 39
microRNA 抽出 40
microRNA 定量の流れ 42
microRNA の定量 43

遺伝子導入 46
プラスミドの選択 46
入れ換え簡単 SnapFast ベクター 47
プラスミドのトランスフェクション 48

タンパク質の電気泳動 50
SDS-PAGE 用プレキャストゲル 52
ハカセに質問！ 53

溶液の調製 54
PBS 54
PBS-T 54
トリス塩酸バッファー（Tris-HCl バッファー） 55
TAE バッファー（トリス - 酢酸 -EDTA バッファー） 56
TBE バッファー（トリス - ホウ酸 -EDTA バッファー） 56
HEPES バッファー 57
MOPS バッファー 57
EDTA 溶液 58
TE バッファー 58
TBS 59
TBS-T 59
中性飽和フェノール（トリスフェノール）溶液 60
酸性飽和フェノール（水飽和フェノール）溶液 60
フェノールクロロホルム溶液 61
RNase 溶液 61
DEPC 処理水 62
IPTG 溶液 62
X-gal 溶液 62
塩化マグネシウム溶液 63
硫酸マグネシウム溶液 63
塩化カリウム溶液 63
酢酸ナトリウム溶液 63
グルコース溶液 63
70% エタノール 64
水酸化ナトリウム溶液 64

付録 65
モル濃度の計算 65

製品リスト 68
試薬 68
キット 75
器具 76

クローニング

目的の細胞内で複製や発現するベクターにある遺伝子を挿入する一連の操作はクローニングと呼ばれます。組み込まれた遺伝子は細胞内での発現など、様々な実験や研究に利用されます。その中で制限酵素を利用したクローニング技術は広く利用されています。制限酵素によって目的の遺伝子およびプラスミドベクターを切断し、それらをつなぎ合わせる（ligation）ことによって目的の遺伝子配列をプラスミドベクターに挿入することができます。

プラスミドベクターと DNA フラグメントの制限酵素処理

必要な試薬

10 ～ 20 µL	プラスミド（200 ～ 300 ng/µL, 3-5 µg）
10 µL	10x 制限酵素用バッファー
10 µL	1 mg/mL ウシ血清アルブミン（BSA）溶液（カタログ番号 A7906）BSA をヌクレアーゼフリーの水に溶解して調製する一般的な最終濃度 100 µg/mL
1.5 ～ 2 µL	10 ～ 20 units/µL の制限酵素 1
1.5 ～ 2 µL	10 ～ 20 units/µL の制限酵素 2 ※

合計 70 µL または 100 µL になる量の TE バッファー（カタログ番号 T9285）またはヌクレアーゼフリーの水（カタログ番号 W4502）

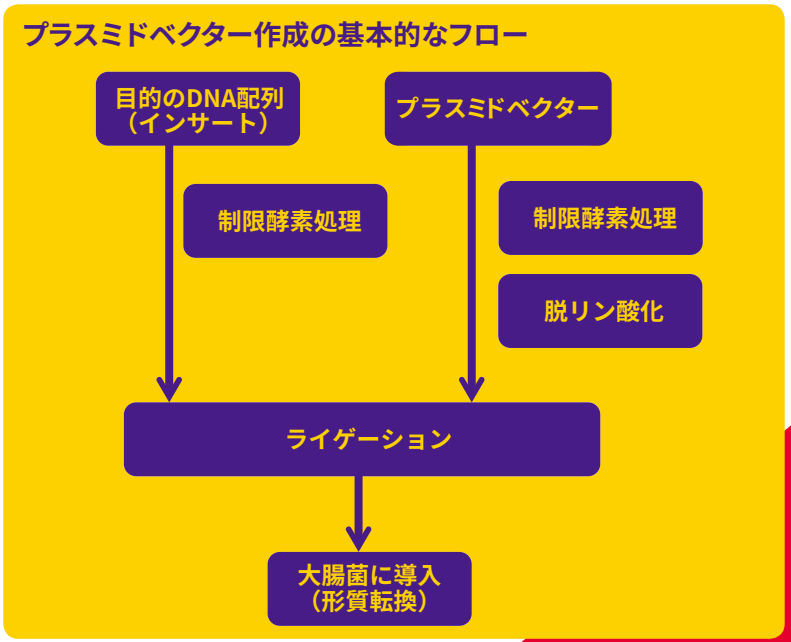
※制限酵素は使用するプラスミドと目的に応じて選びます。クローニングの方法によって制限酵素を 1 種類にすることもあります。

ここで紹介しているプロトコールはプラスミド DNA ベクターが Tris-EDTA（TE）バッファーや溶出バッファー（10 mM トリス塩酸バッファー , pH 8.5）またはヌクレアーゼフリーの水の溶液に溶解している場合の例です。DNA フラグメントの制限酵素処理も同様に行います。

プロトコール

1. 1.5 mL エッペンドルフチューブに TE（または水）、プラスミド DNA、制限酵素用バッファー、BSA の順で上記の量を入れて混合します。
2. 最後に制限酵素を加え穏やかに混合します。
3. 反応液を適切な温度でインキュベート（一般的には 37°C。例外的に SwaI は 25°C。適切な温度は各製品情報でご確認ください）。
4. 40 ～ 60 秒反応させます。
5. 反応後、アルカリホスファターゼによる脱リン酸化処理を行うことができます。
6. また、アガロースゲル電気泳動を行って、制限酵素処理が行われたかを確認します。

制限酵素は温度変化に影響を受けやすいため、一時的な保管は氷上に置くのではなく -20°Cのクールボックスに入れることが推奨されます。
制限酵素が入っているチューブを持つとき、チューブの底を持つことは避け、できるだけ素早く取り扱います。



プラスミドベクターの脱リン酸化

プラスミド DNA 同士が結合することを防ぐ目的で5‘リン酸基を除去するため脱リン酸化処理を行います。
使用されるアルカリホスファターゼはウシ腸由来ホスファターゼ（Calf Intestinal Phosphatase, CIP　カタログ番号 P4978）が最も一般的ですが、熱不活性化がやや困難です。
処理の時間やバッファーは酵素によって異なりますので、各ラボのマニュアルをご参照ください。

プロトコール（制限酵素処理反応液中の DNA の脱リン酸化）

1. 1 unit/µL のウシ腸由来ホスファターゼ（CIP）溶液 1 ～ 2 µL を制限酵素処理した DNA 溶液 50 ～ 100 µL※に加えてよく混ぜます。 ※ DNA が 5 µg になる量を入れます。
2. 37°Cで 30 ～ 60 分間インキュベートします。

プロトコール（水または TE バッファー中の DNA の脱リン酸化）

1. 1.5 mL エッペンドルフチューブに TE バッファーまたはヌクレアーゼフリーの水を適量※1、DNA 溶液 20 ～ 40 µL※2、10x CIP バッファー 5 µL、1 unit/µL のウシ腸由来ホスファターゼ（CIP）溶液 1 ～ 2µL の順で入れてピペッティングでよく混ぜます。
   ※ 1　反応液の合計が 50 µL になる量を入れます。
   ※ 2　DNA が 5 µg になる量を入れます。
2. 37°Cで 30 ～ 60 分間インキュベートします。

10x CIP バッファーの組成
1 M 塩化ナトリウム
0.5 M トリス塩酸バッファー pH 7.9
0.1 M 塩化マグネシウム
0.01 M ジチオトレイトール

脱リン酸化したプラスミドと DNA フラグメントのライゲーションには DNA フラグメントに 5’リン酸基が必要です。一般的なオリゴ / プライマーや PCR 産物は 5’端がリン酸化されていないため、T4 ポリヌクレオチドキナーゼによるリン酸基の付加または制限酵素処理によるリン酸基の露出が必要になります。DNA のリン酸化よりも DNA フラグメントを制限酵素処理する方が一般的です。

DNA の平滑末端クローニング（ブラントエンドクローニング）

以下のような場合、挿入する DNA フラグメントを平滑末端にして簡易的にクローニングを行う場合があります。

- **DNA ライブラリー作成**
- **ダメージを受けてせん断された DNA をベクターに入れる場合**

平滑末端クローニングはベクターと挿入する DNA フラグメントの両方とも平滑末端になっている必要があります。平滑末端にするため DNA ポリメラーゼ（Klenow または T4）あるいは Mung bean（リョクトウ）ヌクレアーゼが使用されます。Klenow や T4 DNA ポリメラーゼは 5’オーバーハングを埋め 3’オーバーハングを除去する作用があります。T4 DNA ポリメラーゼの方が強力な 3’→ 5’エキソヌクレアーゼがあるため、3’オーバーハングを埋める必要があるときには T4 DNA ポリメラーゼが推奨されます。Mung bean ヌクレアーゼは 5’と 3’オーバーハングの両方を除去します。

Klenow 平滑末端プロトコール

1. DNA 溶液（制限酵素バッファーまたは T4 DNA リガーゼ反応バッファーに溶解）に最終濃度が 33 µM で dNTP を添加します。
2. DNA 1 µg あたり 1 unit の Klenow（カタログ番号 KEM0031）を加え、25°Cで 15 分間インキュベート。
3. 最終濃度が 10mM になるように EDTA を加えて反応を止め、75°Cで 20 分間熱処理します。

T4 平滑末端プロトコール

1. DNA 溶液（制限酵素バッファーに溶解）に最終濃度が 100 µM になるように dNTP を添加します。
2. DNA 1 µg あたり 1 unit の T4 DNA ポリメラーゼ（カタログ番号 KEM0033）を加え、12°Cで 15 分間インキュベート。
3. 最終濃度が 10 mM になるように EDTA を加えて反応を止め、75°Cで 20 分間熱処理します。

Mung bean ヌクレアーゼ平滑末端プロトコール

1. 1x Mung bean ヌクレアーゼ（バッファーに溶解）に 0.1 µg/µL の濃度で DNA を懸濁。
2. DNA 1 µg あたり 1 unit の Mung bean ヌクレアーゼを加え、30°Cで 30 分間インキュベート。

※不活性化の前に DNA が部分的に一本鎖になるため、Mung bean ヌクレアーゼの熱処理による不活性化は行いません。DNA 精製用スピンカラムまたはフェノール / クロロホルム沈殿とエタノール沈殿によって酵素を除去します。

DNA フラグメントとプラスミドのライゲーション

ライゲーション反応はコントロール反応を行うことでプロセスの成否を判断しやすくなります。

- **目的のライゲーション : DNA フラグメント + ベクター + リガーゼ**
- **コントロール 1：ベクター + リガーゼ**
- **コントロール 2：リガーゼなしでベクターのみ**

コントロール 2 でコロニーが生じる場合：ベクターの制限酵素処理がうまくいかず元のベクターが残っていたと考えられます。
コントロール 1 でコロニーが生じ、2 で生じない場合：プラスミドが再環状化していることからベクターのアルカリホスファターゼ処理（脱リン酸化）がうまくいっていないと考えられます。
目的のライゲーションのみコロニーが生じ、コントロール 1 と 2 は生じない（またはごく微量）場合：成功です。

ライゲーションの条件はラボによって異なりますが、16°Cで一晩処理する方法が最も成功しやすく、室温で 1 ～ 2 時間の処理も良い結果が得られやすい方法です。

一般的なライゲーション反応液の組成

サンプル	ベクター	フラグメント	10x ライゲーションバッファー ※下記組成	リガーゼ（1U/µL）（カタログ番号 KEM0020）	水
目的のライゲーション	1 µL	3 µL	2 µL	1 µL	13 µL
コントロール 1	1 µL		2 µL	1 µL	16 µL
コントロール 2	1 µL		2 µL		17 µL

ライゲーションプロトコール

1. 各チューブに上記の量の水とバッファー、ベクターを入れます。
2. 目的のライゲーションのチューブのフラグメントを添加します。
3. リガーゼを目的のライゲーションとコントロール 1 のみに添加します。リガーゼは物理的ダメージに弱いため指で穏やかにタッピングするなどして混合します。
4. 室温で 1 ～ 2 時間または 16°Cで一晩インキュベートします。あるいは 65°Cで 20 分間インキュベートする方法もあります。
5. ライゲーション完了後、大腸菌に形質転換してタンパク質発現や培養してコピーの作成に用いられます。

10x ライゲーションバッファーの組成
0.5 M トリス塩酸バッファー pH 7.6
100 mM 塩化マグネシウム（カタログ番号 M8266）
100 mM ジチオトレイトール（DTT）（カタログ番号 D9779）
500 µg/mL ウシ血清アルブミン（BSA）（カタログ番号 A7906）
ヌクレアーゼフリーの水で調製します。
分注して -20°Cで保存可能。冷凍することで BSA が析出することがありますが、37°Cで溶解してから使用します。

実験のヒント

- **リガーゼバッファーは凍結融解によって溶液中の BSA が沈殿することがあります。その場合は、ボルテックスや指の間で一時的に温めて再溶解します。**
- **リガーゼバッファーには ATP が含まれ、多数の凍結融解によって劣化することがあります。バッファーストックを少量に分注して保管し、3 回以内の凍結融解で使用します。**
- **ライゲーション時に酵素を添加する前に 37°Cで数分間処理することで、再環状化したベクター（1 つの制限酵素で処理したベクター）の付着末端を開く、または直線状化することもあります。熱処理後、室温に戻してからリガーゼを添加します。**
- **ライゲーションをサポートするためにライゲーション前の PCR 産物をプロテイナーゼ K で処理することもあります。プロテイナーゼ K は PCR クリーンナップキットで除去できます。**
- **ゲルから DNA を切り出す際の UV によって DNA がダメージを受け、ライゲーション効率が下がることがあります。**
- **ゲルから回収した DNA 溶液はライゲーション反応の 20 ～ 30% 以下になるようにします。DNA 溶液からのコンタミが多いとライゲーション効率が下がることがあります。**
- **ライゲーションにベクターは 20 ～ 30 ng を使用し、ベクターとフラグメントは 1:2 または 1:3 のモル比で一般的に行います。ベクターに比べて 10 倍以上にならないようにします。**

ベクター : フラグメント比 =1:3 のとき必要となるフラグメント量の計算例（比率を変えるときは数字の 3 を別の数値に変更します）

$$\text{インサート DNA フラグメントの質量 ng} = 3 \times \frac{\text{インサート DNA フラグメントの長さ bp}}{\text{ベクター DNA 長さ bp}} \times \text{ベクター DNA の質量 ng}$$

部位特異的変異導入

部位特異的変異導入（Site Directed Mutagenesis, SDM）はプラスミド内の特異的な部位に変異を導入する有用な方法で、遺伝子の置換、挿入、欠損を行うことができます。

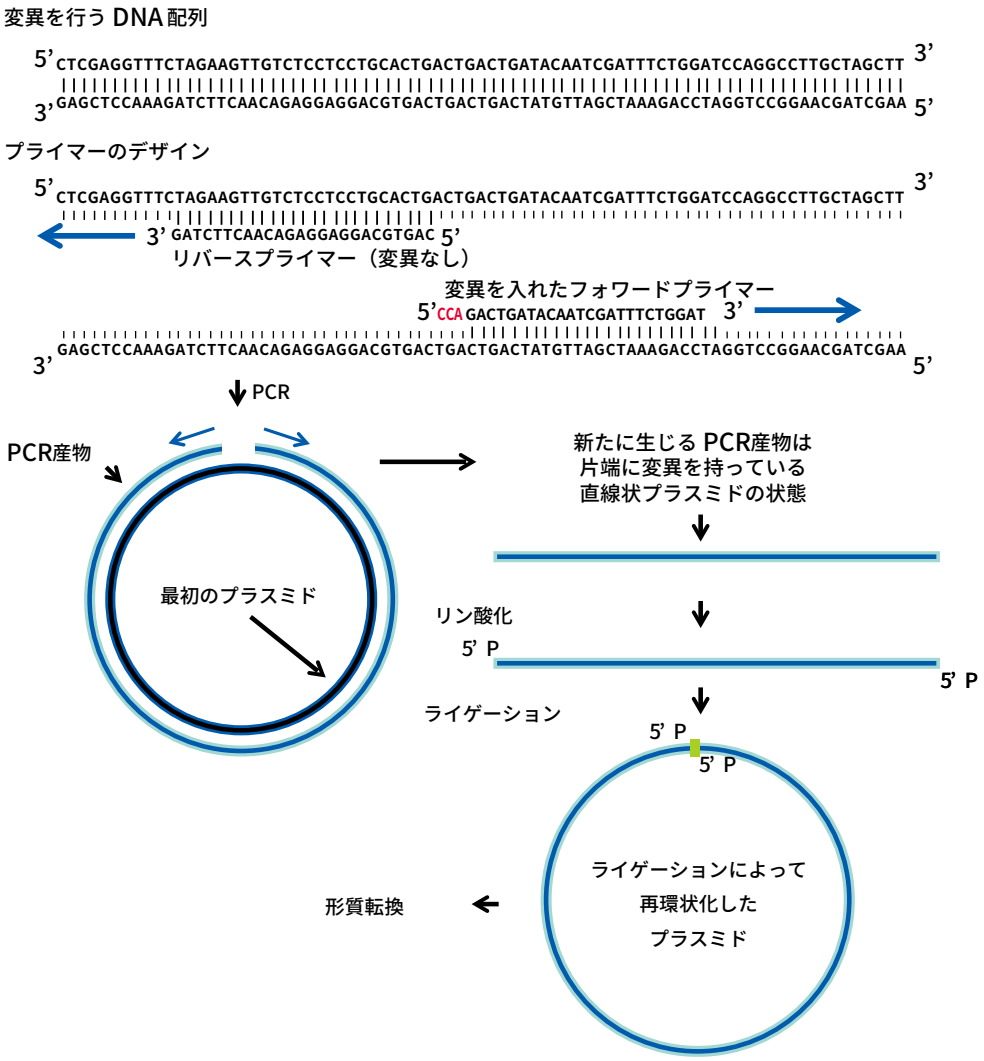
ここでは PCR をベースにした部位特異的変異法を紹介します。原理は背中合わせにペアとなる PCR プライマーを用い、PCR によってプラスミド全体を増幅することで行います。片方のプライマーは目的の変異を組み込んでおきます。PCR によって増幅された直鎖の産物はリン酸化後に DNA リガーゼで両端を結合します。この環状化したベクターを大腸菌に形質転換します。

プロトコール

ステップ 1　変異のプロセスとプライマーのデザイン

1 つのプライマーの 5’末端に目的の変異を組み込んでデザインします。相補的領域の Tm が 60°Cになるように設計します。

例：



注記：フォワードプライマーのみ変異を入れると、今後異なるシリーズの変異を作るとき異なるフォワードプライマーを用いて同じリバースプライマーを使えるため便利です。上記の例は 3bp 置換ですが挿入も同様に行えます。もし長い置換や挿入が必要な場合は、両方のプライマーの 5’端に変異を入れることで対応できます。
欠損はテンプレートの配列から欠損させたプライマーを用いることで行えます。
合成された PCR プライマーは通常 5’端にリン酸基が付いていないため、PCR 産物はそのままでライゲーションして環状化することができません。そのためあらかじめ 5’端がリン酸化されたプライマーを注文するか、PCR 産物をポリヌクレオチドキナーゼ（PNK）でリン酸化する必要があります。作成する SDM が少ない場合は 5’端がリン酸化されたプライマーを注文した方が PNK を使用するより経済的と考えられます。

ステップ 2 PCR

意図しない変異を避けるためプルーフリーディング（校正）活性のあるポリメラーゼを用いることが重要です。また、PCR は小さいプラスミドの方がより正確に働くため、変異させたフラグメントのサブクローンを作って元のベクターに戻すことも有効です。

PCR 反応液の例

35.5 µL	水
5 µL	10x DNA ポリメラーゼ用バッファー
1.5 µL	フォワードプライマー（最終濃度 0.3 µM）
1.5 µL	リバースプライマー（最終濃度 0.3 µM）
5 µL	dNTP（最終濃度 200 µM）
1 µL	テンプレート DNA
0.5 µL	DNA ポリメラーゼ

反応液ミックスを氷上に置き、あらかじめ温めた PCR ブロックにセットして下記のプログラムを実行します。

PCR 反応プログラムの例

1. 98°C、60 秒
2. 98°C、8 秒
3. 55 ～ 65 °C、20 秒
4. 72°C、時間はプラスミドの大きさとポリメラーゼによって異なります
   2 ～ **4** を 27 ～ 30 サイクル以上繰り返し
5. 72°C 5 分
   反応後は室温でホールド

ステップ 3 PCR のクリーンアップ

すべての PCR 反応液をアガロースゲルで電気泳動。
泳動後のバンドを切り出し、ゲルからの抽出キットで DNA をクリーンアップします。
クリーンアップの溶出液は 30 µL 以内にします。

ステップ 4 5’ 端のリン酸化

※リン酸化されたプライマー（リン酸化オリゴ）で PCR した場合、この手順は必要ありません。

下記の反応液を混合します。

4.5 µL	ヌクレアーゼフリーの水（カタログ番号 W4502）
4 µL	ステップ 3 で得た PCR 産物
1 µL	10x T4 DNA リガーゼ用バッファー※
0.5 µL	T4 ポリヌクレオチドキナーゼ（カタログ番号 KEM0006）

37°Cで 40 分間インキュベートします。

※ DNA リガーゼ用バッファーは ATP が含まれているため、PNK の活性化に使用されます。

ステップ 5 DNA 端の結合

下記の反応液を氷上で準備します。

6.7 µL	ヌクレアーゼフリーの水（カタログ番号 W4502）
2 µL	PNK 反応液（ステップ 4 の反応後の溶液）
0.8 µL	10x T4 DNA リガーゼバッファー
0.5 µL	T4 DNA リガーゼ（カタログ番号 KEM0020）

16°Cで一晩または室温で 2 時間インキュベートします。

ステップ 6 大腸菌（コンピテントセル）の形質転換

ステップ 7 DNA シークエンスによる変異の確認

大腸菌操作

LB 培地の作成

ここでは一般的なプラスミドを導入した大腸菌の培養に用いられている LB 培地の作成方法を紹介します。

LB 培地　1 L 用レシピ

	カタログ番号	使用量
トリプトン	T7293	10 g
酵母抽出物（イーストエクストラクト）	Y1625	5 g
塩化ナトリウム（Lenox の組成では塩化ナトリウム 5 g）	S3014	10 g

1. 上記の試薬を秤量してオートクレーブ可能な容器に入れ、脱イオン水で 1 L にメスアップします。溶液を撹拌して、粉が底に張り付いたり塊がないようにします（ここで完全に溶解する必要はありません）。
2. 容器のキャップを軽く締め、オートクレーブテープを貼ってオートクレーブします。

便利な調製済み培地

製品名, 形状	製品情報	カタログ番号
LB 培地（Lennox）, 粉末	通常の粉。20g で培地 1 L 分	L3022
LB 培地（Lennox）, EZMix	粉が舞い散りにくい粒子形状。1 袋（10.3 g）で培地 500 mL 分	L7658
LB 培地（Lennox）, 錠剤	1 錠で培地 50 mL 分（48.3 mL の水に溶解）	L7275
LB 培地（Miller）, 粉末	通常の粉。25 g で培地 1 L 分	L3522
LB 培地（Miller）, 溶液	そのまま使用できる調製済みの溶液	L2542

※ LB 培地の Lenox の組成は塩化ナトリウム 5g、Miller の組成は塩化ナトリウム 10g

LB 寒天培地の作成

LB 寒天培地を 50 ～ 60 枚作成する方法を紹介します。

LB 寒天培地　1 L 用レシピ

	カタログ番号	使用量
トリプトン	T7293	10 g
酵母抽出物（イーストエクストラクト）	Y1625	5 g
塩化ナトリウム	S3014	10 g
寒天（アガー）	A1296	15 g

1. 上記の試薬を秤量してオートクレーブ可能な容器に入れ、脱イオン水で 1 L にメスアップします。溶液を撹拌して、粉が底に張り付いたり塊がないようにします（ここで完全に溶解する必要はありません）。
2. 容器のキャップを軽く締め、オートクレーブテープを貼ってオートクレーブします。
3. オートクレーブ後、50°C近くまで自然冷却します（45 ～ 50°C以下にしない）。必要に応じて適量の抗生物質を加え、泡立たないよう穏やかに水平に回すように混ぜます。
4. 混ぜた培地をプレート（カタログ番号 Z617636）あたり 12 ～ 15 mL 程度注ぎ入れます。※

※バクテリア用の適切なフード内または火をつけたバーナーの近くで行います。

固まった寒天培地はそのまま使用するか冷蔵で保存します。

便利な調製済み培地

製品名, 形状	製品情報	カタログ番号
LB 寒天培地（Lennox）, 粉末	通常の粉。35 g で培地 1 L 分	L2897
LB 寒天培地（Lennox）, EZMix	粉が舞い散りにくい粒子形状。1 袋（17.8 g）で培地 500 mL 分	L7533
LB 寒天培地（Lennox）, 錠剤	1 錠で培地 50 mL 分（50 mL の水に溶解）	L7025
LB 寒天培地（Miller）, 粉末	通常の粉。40 g で培地 1 L 分	L3147

プレート（ペトリ皿）

製品名	製品情報	カタログ番号
Greiner dishes（ペトリ皿）	94 x 16 mm、ポリスチレン製、未滅菌 微生物の培養に適しています（培地 15 ～ 16 mL まで） 480 枚入り（各 20 枚単位で包装）	Z617636

SOC 培地の作成

SOC 培地は、大腸菌の形質転換後の回復用培地として使用されます。

SOC 培地 1L 用レシピ

	カタログ番号	使用量
塩化ナトリウム	S3014	0.5 g
トリプトン	T7293	20 g
酵母抽出物（イーストエクストラクト）	Y1625	5 g
1M 塩化カリウム溶液		2.5 mL（最終濃度 2.5 mM）
1M 塩化マグネシウム溶液		10 mL（最終濃度 10 mM）
1M 硫酸マグネシウム溶液		10 mL（最終濃度 10 mM）
1M グルコース溶液		20 mL（最終濃度 20 mM）
水酸化ナトリウム溶液（濃度 5N など）	S8263	数 100 µL 程度

1. 上表の量の塩化ナトリウム、トリプトン、酵母抽出物、1 M 塩化カリウム溶液（または塩化カリウム 0.186 g）をビーカーまたはフラスコに入れ、脱イオン水 1 L を静かに入れてスターラーなどを利用してよく混ぜます。
2. NaOH 溶液を適量加えて pH を 7.0 に調整します。
3. 121°Cで 15 分間オートクレーブします。
4. 培地が十分冷えてから、別にオートクレーブした 1 M 塩化マグネシウム 10 mL、1M 硫酸マグネシウム 10 mL を無菌的に加え、よく混ぜます。
5. フィルター滅菌した 1 M グルコース溶液 20 mL を無菌的に添加し、よく混ぜます。

便利な調製済み培地

製品名	製品情報	カタログ番号
SOC 培地	そのまま使用できる調製済みの溶液。フィルター滅菌済み	S1797

TB 培地の作成

TB 培地（Terrific Broth）は栄養豊富な培地で、大腸菌の培養に用いられます。LB 培地と比べ細胞密度が高くなります。

TB 培地 1L 用レシピ

	カタログ番号	使用量
トリプトン	T7293	12 g
酵母抽出物（イーストエクストラクト）	Y1625	24 g
グリセロール	G5516	8 mL
リン酸水素 2 カリウム（K_2HPO_4）	24-5240	9.4 g
リン酸 2 水素カリウム（KH_2PO_4）	P9791	2.2 g

1. 上表の量のトリプトン、酵母抽出物、リン酸水素 2 カリウム、リン酸 2 水素カリウムをビーカーまたはフラスコに入れ、脱イオン水 900 mL を静かに入れてスターラーなどを利用してよく混ぜます。
2. グリセロール 8 mL を加えてよく混ぜます。
3. 脱イオン水を加えて、1 L にメスアップします。
4. 121°Cで 15 分間オートクレーブします。
5. 抗生物質を添加する場合は、オートクレーブ後の培地が十分冷えた状態で必要量の抗生物質を無菌的に添加し、よく混ぜます。

便利な調製済み培地

製品名, 形状	製品情報	カタログ番号
TB 培地 , 溶液	そのまま使用できる調製済みの溶液。フィルター滅菌済み	T5574
TB 培地改変型 , 粉末	通常の粉。培地 1 L に製品 47.6 g とグリセロール 8 mL を使用	T0918
TB 培地 , EZMix	粉が舞い散りにくい粒子形状。培地 1 L に製品 48.2 g とグリセロール 8 mL を使用	T9179

大腸菌の培養方法

大腸菌は一般的に寒天培地（プレート培地) 上で画線培養してコロニーを形成させ、そのコロニーからピックアップして液体培地で培養します。
一般的にコンタミを防ぐため、火をつけたバーナーの近くで操作します。これは上昇気流を起こして培地やサンプルへの大気中の微生物や埃などの落下によるコンタミを防ぐために行われます。また、実験台や手などを 70% エタノールで滅菌して作業します。

画線培養のプロトコール

1. 白金耳の先端を 70% アルコールにつけ、バーナーの炎で軽くあぶります。
2. 熱した白金耳の先端をプレート培地の表面に軽くあて（数秒）、白金耳を冷まします。
3. 白金耳の先端を大腸菌の溶液につけ、プレート培地表面に線を描くように塗ります。
4. 塗り終わったらプレートのフタをしめ、37 度で培養します（数時間から一晩）。

シングルコロニーからの液体培養プロトコール

1. 寒天培地（プレート培地) で大腸菌を 37°Cで数時間から一晩インキュベートしてコロニーを形成させます（画線培養）。
2. プラスチックチューブ（15 mL 遠心チューブなど）に数 mL（2.5 mL など）の液体培地を無菌的に分注します。液体培地には使用している大腸菌・プラスミドに適した抗生物質を適量添加します。
3. 滅菌したつまようじ（または白金耳）の先端を、画線培養したプレート上の 1 つの大腸菌コロニーに接触させます。作業は無菌的に行います。 コロニーは完全にかき取る必要はありません。
4. 2 で分注した液体培地に、3 のつまようじの先端を軽く浸します。作業は無菌的に行います。
   チューブのフタを閉め、ウォーターバス内を用いて 37°Cで振とうさせながらインキュベートします。チューブのフタを完全に閉めると酸素が不足しますので、軽く緩める必要があります。

   チューブを斜めにセットすると効率よく振とうすることができます。振とうは激しく（200 ～ 300 rpm）行います。ただし、チューブ内にウォーターバスの水が入らないように高さを調整します（揺れたときの培地液面はウォーターバスの水面より下になるようにします）。
5. 数時間から一晩培養します。
   このインキュベーション終了時点でプラスミド抽出（プラスミドミニプレップ）を行うこともできます。その他の目的のために大量に培養を行う場合は次の手順に進んでください。
6. あらかじめ滅菌した三角フラスコに滅菌済みの液体培地を無菌的に分注し、適切な抗生物質を添加します。
   フラスコの容量に対し 1/5 ～ 1/4 の液量を入れると効率よく培養できます。培地を三角フラスコに分注してアルミ箔または綿栓でフタをしてオートクレーブを行い、冷めてから抗生物質を添加することもできます。
7. **5** で培養した大腸菌液を **6** のフラスコに無菌的にデカントで注ぎ、アルミ箔または綿栓をして、ウォーターバス内を用いて 37°Cで振とうさせながらインキュベートします。
   振とうは激しく（200 ～ 300 rpm）行います。ただし、チューブ内にウォーターバスの水が入らないように高さを調整します（揺れたときの培地液面はウォーターバスの水面より下になるようにします）。
8. 目的に応じて数時間から一晩培養します。

   大腸菌の増殖度合いは、分光光度計を用いて 600 nm の吸光度（濁度）を測定することで確認できます。

抗生物質

大腸菌にプラスミド DNA を導入する際、目的のプラスミド DNA が導入された大腸菌だけを選別するために抗生物質が用いられます。これはあらかじめ目的のプラスミド DNA に、ある特定の抗生物質に対する薬剤耐性遺伝子を組み込んでおくことで、そのプラスミド DNA で形質転換された大腸菌が抗生物質の耐性を示して生存することを利用したセレクションです。また、ベクターによって抗生物質が発現誘導のスイッチとして利用されています。

プラスミド DNA ベクターにはアンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子などが一般的に用いられています。使用するプラスミドベクターに応じで抗生物質を選び、その抗生物質を大腸菌の培地に入れる、もしくは寒天培地の場合は寒天培地に入れるか表面に塗って目的の大腸菌をセレクションします。

大腸菌や真核細胞で下記の抗生物質などが用いられています。

製品名	カタログ番号
アンピシリンナトリウム塩	A0166
アンピシリン溶液（100 mg/mL）	A5354
カナマイシン硫酸塩	K1377
カルベニシリン溶液（100 mg/mL）	C1613
クロラムフェニコール	C1919
シクロスポリン A	C1832
シクロヘキシミド溶液（100 mg/mL）	C4859
スペクチノマイシン硫酸塩	S9137
スペクチノマイシン溶液（100 mg/mL）	S0692
テトラサイクリン塩酸塩	T7660
ドキシサイクリンハイクレート	D9891
ハイグロマイシン B	H3274
ハイグロマイシン B 溶液（45-60 mg/mL）	H0654
ピューロマイシン 2 塩酸塩	P8833
ピューロマイシン溶液（10 mg/mL）	P9620
リファンピシン	R8883
G418 硫酸塩	A1720

抗生物質はストック溶液を作成し、分注して -20°Cで保管しておくと便利です。一般的なストック溶液の濃度とプラスミドを導入した大腸菌のセレクションに使用するときの濃度の目安は下記の通りです。バクテリアの株によって使用濃度が異なりますので、最適な濃度を検討する必要があります。

水で溶解させる抗生物質のストック溶液（使用目安は培地 1 mL あたりストック溶液 1 µL）

抗生物質	カタログ番号	ストック溶液濃度	使用時の濃度
カナマイシン	**K4000**	50 mg/mL	50 µg/mL
アンピシリン	**A9518**	100 mg/mL	100 µg/mL
ストレプトマイシン	**S6501**	50 mg/mL	50 µg/mL
スペクチノマイシン	**S9007**	100 mg/mL	100 µg/mL

エタノールで溶解させる抗生物質のストック溶液（使用目安は培地 1 mL あたりストック溶液 5 µL）

抗生物質	カタログ番号	ストック溶液濃度	使用時の濃度
クロラムフェニコール	**C0378**	34 mg/mL	170 µg/mL
テトラサイクリン塩酸塩	**87128**	10 mg/mL	50 µg/mL

大腸菌の形質転換

形質転換はいくつかのバクテリアに見られる水平的な遺伝子の転移プロセスで、外部の遺伝的物質を取り込む作用です。これは *Streptococcus pneumoniae* において Griffith によって 1928 年に初めて報告されました。DNA の形質転換が Avery らによって 1944 年に行われました。この遺伝子転移は生きている細胞は必要とせず、環境中の DNA のみ必要とされます。バクテリアが形質転換によって外部の遺伝的物質を自由に取り込むためには事前の準備が必要で、この状態になることはコンピテントと呼ばれます。自然においてコンピテントになる条件は属によって様々です。形質転換因子（DNA）が細胞質に取り込まれた後、バクテリア DNA と異なっている場合はヌクレアーゼによって分解されることがあります。バクテリア DNA と似ている場合は染色体に融合されることもあり、またはプラスミドとして保たれることもあります。

人工的に DNA をバクテリアに導入する容易な方法としてヒートショックとエレクトロポレーションが知られています。ヒートショックはバクテリアを冷やした状態から急激に加熱すると細胞膜に穴が生じることを利用して DNA を取り込ませます。エレクトロポレーションは電気的な刺激によって細胞膜に穴を開ける方法です。エレクトロポレーションの方が多くのコロニーが生じやすいとされていますが、クローニングの場合ヒートショック法が多く利用されています。

形質転換プロトコール（一般的なヒートショック法）

1. あらかじめ作成した（もしくは購入した）コンピテントセルの1つのチューブと導入する DNA 溶液（インサート DNA をライゲーションしたプラスミド）、またはコントロール溶液を氷上に深く差し入れて静置します。細胞の融解は5〜 10 分かかります。
   細胞は熱に弱く形質転換の効率に影響するため、チューブを持つときは細胞が入っている部分に触れないようにします。
2. あらかじめ氷冷した 15 mL 遠心チューブ（カタログ番号 SIAL0791）を氷上に置き、3 〜 4 µL の DNA 溶液（またはコントロール）を各チューブに入れます。
3. 95 µL のコンピテントセルを各反応液に入れ、氷上で 20 分間インキュベート（45 分間までは OK）。
4. ヒートブロックまたはウォーターバスで 42°C、90 秒間ヒートショックします。
5. 抗生物質を含まない 1 mL の LB 培地（カタログ番号 L3022, L2542, L3522）または SOC 培地（カタログ番号 S1797）でヒートショック後の細胞を 37°Cで振とう（227rpm）しながら 1 時間インキュベート。
6. 適切な抗生物質を含む LB 寒天培地にインキュベートした培養液をすべて撒きます。
7. 乾きやすいようにプレートのフタをわずかにずらしてフードまたは 37°Cインキュベーターに 5 〜 10 分間置きます（フードを使う場合はコンタミを防ぐため哺乳動物細胞用のフードは使用しない）。完全に乾きすぎないように注意します。
8. プレートのフタを閉めて 37°Cで一晩インキュベートします。生じたクローン（コロニー）に目的の形質転換体が含まれていると期待され、その後の実験に使用します。

形質転換プロトコール（改変法）

1. あらかじめ作成した（もしくは購入した）コンピテントセルの1つのチューブと導入する DNA 溶液（インサート DNA をライゲーションしたプラスミド）、またはコントロール溶液を氷上に深く差し入れて静置します。細胞の融解は5〜 10 分かかります。
   細胞は熱に弱く形質転換の効率に影響するため、チューブを持つときは細胞が入っている部分に触れないようにします。
2. 2 〜 5 µL の DNA 溶液（またはコントロール）を 100 µL のコンピテントセルが入ったチューブに入れ、素早くピペットチップの先でかき混ぜます（上下のピペッティングはしません）。
3. 氷上で 15 分間インキュベート（45 分間までは OK）。
4. ヒートブロックまたはウォーターバスで 37°C、3 分間ヒートショックします。
5. 抗生物質を含まない 1 mL の LB 培地（カタログ番号 L3022, L2542, L3522）または SOC 培地（カタログ番号 S1797）でヒートショック後の細胞を 37°Cで振とうしながら 15 分間インキュベート。
6. 適切な抗生物質を含む LB 寒天培地にインキュベートした培養液をすべて撒きます。
7. 乾きやすいようにプレートのフタをわずかにずらしてフードまたは 37°Cインキュベーターに 5 〜 10 分間置きます（フードを使う場合はコンタミを防ぐため哺乳動物細胞用のフードは使用しない）。完全に乾きすぎないように注意します。
8. プレートのフタを閉めて 37°Cで一晩インキュベートします。生じたクローン（コロニー）に目的の形質転換体が含まれていると期待され、その後の実験に使用します。

大腸菌の形質転換

インサート DNA をライゲーションさせたプラスミドで形質転換した大腸菌を培養したプレートにコロニーが多数生じ、コントロールのプレート（リガーゼなし、DNA なし）でコロニーがまったくないかわずかに生じたとき、ライゲーションと形質転換が成功したと期待されます。ただし、コントロールでバックグランドが多数生じた場合でも、ライゲーションしたサンプルのプレートで多数生じていれば、ライゲーションがうまくいかなかったということではありません。その場合にはより多くのスクリーニングを行って目的のコロニーを選び出す必要がありますが、必要なピックアップ数があまりにも多くなり過ぎるときは、プラスミド作成のステップからやり直した方が手間が少なることもあります。

目的のプラスミドを入れた大腸菌のプレートでコントロールのプレートに比べて 10 倍以上のコロニーが生じたとき、理論的に 10 コロニーのうち 9 のコロニーで正しく DNA が導入されたと考えられます。この場合、5 ～ 10 のコロニーをピックアップすれば十分とされます。

コロニーピックアッププロトコール

※バクテリア用の適切なフード内または火をつけたバーナーの近くで行います。

1. 37°Cインキュベーターから取り出した培養後のプレートを卓上で上下逆に置きます。
2. 適切な抗生物質を入れた 3 ～ 5 mL の LB 培地を滅菌済みの 25 mL または 50 mL チューブに入れます。使用する LB 培地の量は目的に応じて変更しますが、チューブ内の空気が少ないと大腸菌の生育に影響を与えるため、チューブ内の培地と空気の比率が少なくとも 1:3 以下にならないよう気をつけます。
3. 滅菌済みピペットチップを付けたピペット（または滅菌したつまようじ）の先端で、逆さまにしたプレートのコロニーの 1 つを少し取ります。
4. 取ったコロニーを先ほど分注した LB 培地に入れ、溶液内で軽く混ぜます。
5. 37°Cで振とう（190 ～ 225 rpm）しながら一晩インキュベートします。

大腸菌コロニーの凍結保存

液体培養した大腸菌は 4°Cで数週間キープすることができます。さらに長期間保存する場合はグリセロールストックによる冷凍保存がよく行われます。

グリセロールストックのプロトコール

1. 5 mL のグリセロール（カタログ番号 G5516）と滅菌した 5 mL の脱イオン水をよく混ぜて 50% グリセロール溶液を準備します。
2. 500 µL の 50% グリセロール溶液に 500 µL の大腸菌用液（一晩培養したもの）を入れてよく混ぜて凍結用バイアルに入れます。
3. -80°Cで保存。

コンピテントセル作成

1990 年に井上氏らによって開発されたコンピテントセル作成法はクローニングにおいて多くの株で利用されています。オリジナルの方法は大腸菌を 18°Cで一晩培養する方法ですが、ここでは 37°Cで一晩培養する方法を紹介します。
また市販されているコンピテントセルも利用することができます 。

必要な試薬と器具

DMSO（ジメチルスルホキシド）（カタログ番号 D8418）
LB 寒天培地
SOB（カタログ番号 H8032）一晩培養用に 3 x 250 mL x3 本＋スターター用に少量
0.5 M PIPES pH 6.7（カタログ番号 P1851）
Inoue transformation buffer
滅菌済みマイクロ遠心チューブ
滅菌済み遠心チューブ（250 mL 以上用）
遠心機（2,500 x g 以上に対応）

Inoue transformation buffer 1 L 用レシピ

最終濃度	1L に必要な量	成分	カタログ番号
55 mM	10.88 g	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	M5005
15 mM	2.2 g	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	L3306
250 mM	18.65 g	KCl	P9541
10 mM	20 mL	0.5 M PIPES 溶液 pH 6.7	P1851

上表の量を脱イオン水に溶かして 1 L に調製し、0.22 µm フィルターを通して滅菌。-20°Cで保存可能です。

コンピテントセル作成プロトコール

1 日目

1. LB 寒天培地で一晩培養した大腸菌コロニーから 1 つのコロニーをピックアップ。ピックアップしたコロニーを 2 mL の SOB 培地を入れた 50 mL チューブに入れ、37°Cで約 7 時間インキュベート。
2. Inoue transformation buffer を準備（または分注して冷凍保存した Inoue transformation buffer を溶解）。
3. 3 本のフラスコに各 250 mL の SOB 培地を入れ、それらに手順 **1** で培養した培養液をそれぞれ異なる容量で添加し（例 10 µL, 50 µL, 250 µL）、37°Cで一晩振とうしながらインキュベートします。

2 日目

1. 翌朝、培養した 3 つの培養液の OD600 値を測定し、適度な時間で OD600 値をモニターします。
2. 培養液のうちの 1 つの OD600 が 0.55 に達したとき、その培養液を氷冷したバスに 10 分間静置します。ここで同時にマイクロ遠心チューブも氷冷します。
3. 氷冷後の培養液を 4°Cで 2,500 x g で 10 分間遠心します。
4. 上清を捨て、沈殿を氷冷した 80 mL の Inoue transformation buffer で懸濁します。
5. 0.75 mL の DMSO を加えて回すように混ぜ、10 分間静置します。
6. 100 µL を氷冷したマイクロ遠心チューブに分注します。
7. 分注した細胞を液体窒素で急速冷凍し、使用するまで -80°Cで保存します。

大腸菌のセレクション

ブルーホワイトスクリーニング

ブルーホワイトスクリーニングは組み換え体と非組み換え体コロニーを見分けるための迅速・簡便な方法です。この方法には特定のベクターと特定の大腸菌株が必要になります。特に平滑末端クローニングや DNA ライブラリー作成などで非常に有用です。

ブルーホワイトスクリーニングの原理

まず大腸菌の最初の遺伝子としてβ - ガラクトシダーゼ（β -gal）をコードする lacZ と呼ばれる lac オペロンがあります。活性化型β -gal は四量体でラクトースをグルコースとガラクトースに分解します。 β -gal の 11-14 アミノ酸欠損（lacZ Δ M15 変異体）は四量体を形成できず酵素の機能を持ちません（Langley et al. 1975）。β -gal に 1-59 アミノ酸（α - ペプチド）をトランスに（各々に）与えることで欠損したβ -gal は四量体を形成し機能が復元することが発見されました（Ullmann et al. 1967; Langley et al. 1975）。このα - ペプチドによるβ -gal のレスキュー作用はα - 相補性と呼ばれます。後に Vieira らはα - 相補性が大腸菌コロニーにおいてインサート有無をスクリーニングするために利用できることを見出しました（Vieira & Messing 1982）。α - ペプチドをコードする領域を pUC プラスミドを作成し、さらにその領域の半ばにマルチクローニングサイト（MCS）を導入しました。この MCS に DNA 断片が挿入されるとα - ペプチドが破壊され、β -gal の機能が失われます。5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside（X-gal）はラクトースの色のない類似体で β -gal が X-gal を分解すると青色の産物（5,5 ‘-dibromo-4,4’ -dichloro-indigo）が生じます。ブルーホワイトスクリーニングでは、ライゲーションさせたプラスミドで形質転換した大腸菌株（lacZ Δ M15 変異株）を X-gal を含む寒天培地プレートに撒き、青色のコロニーはα - ペプチドがそのままの状態（インサートがない）を示し、白色のコロニーはα - ペプチドが破壊された状態（インサートが入っている）を示します。

必要な試薬

コンピテントセル（lacZ Δ M15 変異を持つ大腸菌株）
ブルーホワイトスクリーニングに使用される一般的な株
α - ペプチド領域と MCS を持つベクター
ブルーホワイトスクリーニングに使用される一般的なベクター pGEM-T, pBluescript, pUC18, pUC19
α - ペプチド領域と MCS を持つベクターに目的のインサートを導入したプラスミド
ベクターに適した抗生物質
20 mg/mL X-gal 溶液

ブルーホワイトスクリーニング用プレートの作成方法

1. 目的のプラスミドに合った抗生物質を含む LB 寒天培地プレートを数枚用意します。
2. 100 µL の 20 mg/mL X-gal 溶液と 100 µL の 10 mM IPTG をプレートに撒き、フタを少し開けて表面を乾燥させます。この作業は大腸菌用のフードまたはバーナーの火をつけながら行います。

大腸菌の形質転換

1. 大腸菌コンピテントセルを目的のプラスミドで通常通りの方法で形質転換します。
2. 形質転換後の溶液を上記の X-gal IPTG プレートに撒き、37°Cで一晩インキュベートします。
3. コロニーが生じた後、青色の発色を助長してネガティブコロニーを見分けやすくするため、4°Cで 1 時間インキュベートすることもあります。

コントロールを行う場合は、インサートを入れていないα - ペプチド領域を持つ pBluescript などのベクターを形質転換した大腸菌を用います。これらのコロニーはプレートですべて青色になると予測されます。もし青くならない場合、X-gal がうまく撒かれていないか、抗生物質が適切に作用していない可能性が考えられます。

注記：このスクリーニング法はインサートの有無を確認するためで、インサートの方向までは判断できません。またインサートが短く、α - ペプチドのフレームが維持される場合は偽陰性のコロニーを生じることがあります。ただし、この偽陰性の多くは正しい陰性に比べて明るみのある青になります。その他に白いコロニーがインサートを持っていない場合も起こり得ます（偽陽性）。これはヌクレアーゼによるベクターの分解によるα - ペプチドの破壊の結果と考えらます。これらのことから、シークエンシングによるインサートの確認も合わせて行うのが良いとされています。

リファレンス

Langley, K.E. et al., 1975. MolecμLar basis of beta-galactosidase alpha-complementation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 72（4), pp.1254–1257.
Ullmann, A., Jacob, F. & Monod, J., 1967. Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of Escherichia coli. Journal of molecular biology, 24（2), pp.339–343.
Vieira, J. & Messing, J., 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene, 19（3), pp.259–268.

制限酵素によるスクリーニング

制限酵素切断によるスクリーニングはピックアップしたクローンにインサートが入っているか確認するために行われます。
一般的に 200 ng のプラスミドを必要として、1 unit の制限酵素で 10 µL の反応で行われます。大きなプラスミドの場合はより多くのプラスミドが必要になります。例えば同じ 200 ng でも 3 kb のプラスミドは 15 kb のプラスミドの 5 倍のコピー数が含まれるため、15 kb のプラスミドから切断されるフラグメントは 1/5 になります。
もしミニプレップキットやマキシプレップキットのようなシリカレジンによる精製をしていないプラスミドを使用する場合はより多くの制限酵素が必要で、2 倍から 3 倍の制限酵素が必要とされます。
一般的に EcoR I（カタログ番号 R6265）, BamH I（カタログ番号 R0260）, Hind III（カタログ番号 R1137）が使用されます。制限酵素処理したサンプルをアガロースゲル電気泳動で確認します。

必要な試薬（精製した 1 µg/ µL のプラスミドを使用する場合）

0.2 ～ 0.5 µL　プラスミド DNA（精製した 1 µg/ µL のプラスミド DNA を使用する場合）※
1 µL　10x 反応バッファー
0.1 ～ 0.3 µL　制限酵素 1
0.1 ～ 0.3 µL　制限酵素 2（オプション）
TE（カタログ番号 T9285）またはヌクレアーゼフリーの水（カタログ番号 W4502）で 10 µL に調製
※使用するプラスミド DNA がフェノール・クロロホルム抽出して濃度不明または低濃度の場合 3 µL 使用します。

プロトコール

1. スクリーニングするサンプル +1 つのサンプルに必要な試薬量を計算します。
2. DNA を除く上記の試薬のマスターミックスを調製します。例えば 10 サンプルの場合、10x 反応バッファー 11 µL、酵素 1.1 µL、水 95.7 µL を混合。
3. マスターミックスをサンプル数チューブに分注します（この例では 10 本）。
4. 分注した各チューブにそれぞれの DNA を添加します。
5. 37°Cで 1 時間インキュベート。酵素によって反応温度が異なる場合は変更します。
6. 1 µL のローディング色素を入れてアガロースゲルで電気泳動。

コロニー PCR によるスクリーニング

寒天培地プレート上の組み換え DNA を持つコロニーを探すために PCR 法が利用され、一晩培養せずに行うことができます。寒天培地プレート上のコロニーをピックして、PCR チューブ内の PCR 反応液ミックスと大腸菌用の培地に浸して一晩培養します。一般的にこの方法は組み換えたプラスミドの増幅する領域が比較的小さい（<500 bp）ときに効果的です。また熱処理のステージでサンプルの大腸菌が溶解して DNA がリリースされると PCR 反応が進むため、使用する大腸菌株で PCR 可能かあらかじめ確認する必要もあります。

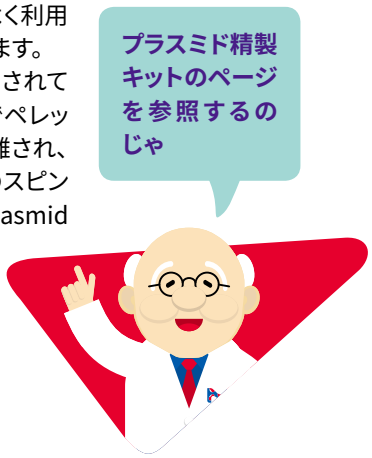
プロトコール

1. 25 mg のプロテイナーゼ K を 5 mL の TE（10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0）に溶解して 5 mg/mL のプロテイナーゼ K ストック溶液を調製します。分注して -20°Cで保存可能。
2. 1 サンプルあたり 1 µL の 5 mg/mL プロテイナーゼ K ストック溶液と 24 µL の TE をエッペンドルフチューブに入れ、25 µL のリシス溶液を準備します。
3. 滅菌したピペットチップでコロニーをピックします。
4. 適切な抗生物質を含む LB 寒天培地プレートに細胞をいくつかスポットします（スポットする部分に印を付けておく）。
5. 残りの細胞を 25 µL のリシス溶液に入れます。
6. スポットしたプレートを 37°Cで一晩培養。
7. 細胞を入れたリシス溶液を 55°Cで 15 分間インキュベート。
8. さらに 80°Cで 15 分間インキュベート。
9. サンプルを氷上で冷却し、ボルテックスで混合し軽くスピンダウンします。
10. サンプルの 1 µL を PCR 反応に用います。

大腸菌のプラスミド抽出

プラスミド DNA ミニプレップ

大腸菌からプラスミドを抽出する方法として、少量の DNA（<5 µg）を抽出するミニプレップは非常によく利用されています。より多くの DNA が必要なときはマキシプレップ、メガプレップ、ギガプレップが用いられます。特にミニプレップはクローニングした大腸菌が正しい組み換え DNA を持っているか確認するために利用されています。ピックアップしたコロニー（5 ～ 15）を 3 ～ 5 mL の LB 培地で一晩培養し、大腸菌を遠心でペレット状にしてから溶解します。大腸菌のゲノムはプラズマメンブレンに繋ぎ止められて抽出中に膜と共に分離され、小さなプラスミドはそれらの細胞破片から容易に分離されます。また、多くの研究室でミニプレップ用のスピンカラムキット GenElute™ Plasmid Mini Prep Kit（カタログ番号 PLN70）や GenElute Five Minute Plasmid Mini Prep Kit（カタログ番号 PFM50）などが利用されています。



必要な試薬

フィルター滅菌した TES バッファー（10 mM トリス塩酸バッファー pH 8.0, 5 mM EDTA, 250 mM スクロース）
TES（カタログ番号 T5691）
EDTA（カタログ番号 E6758）
スクロース（カタログ番号 S0389）
リゾチウム（カタログ番号 L3790）
5M 過塩素酸ナトリウム溶液（カタログ番号 410241）
イソプロパノール（2- プロパノール）（カタログ番号 I9516）
TE バッファー（10 mM トリス塩酸バッファー pH 8.0, 0.1 mM EDTA）（カタログ番号 T9285）

プロトコール

1. 一晩培養したフレッシュな大腸菌を用います（ピックしたシングルコロニーを 3 mL の LB 培地で一晩培養）。
2. エッペンドルフチューブに約 1.5 mL の大腸菌培養液を入れます。
3. 最大速度で 1 分間遠心し、上清を捨てます。沈殿に培地溶液があまり残っていないことを目視で確認します。
4. 150 µL の TES を添加し、ピペッティングしてよく懸濁させます。
5. すぐに 20 µL の 10 mg/mL リゾチウム溶液を加えます。
6. 室温で 5 分間インキュベート
7. 氷冷した 300 µL の脱イオン水をすぐに加えます（懸濁液中に水をスプレーするように入れ、入れた後はシェイクしません）。
8. ここまではできるだけ素早く行い、ただちに 73°Cのヒートブロックに移動します。
9. 15 分間インキュベート。
10. 最大速度（13,000 rpm）で 15 分間遠心します。ペレットが大きすぎて沈殿しない場合はさらに 15 分間遠心して沈殿させます。
11. 上清を新しいエッペンドルフチューブに回収します。上清に対して 10% 程度の量（通常 30 µL）の 5 M 過塩素酸ナトリウム溶液を入れます（ここでもし上清が少ない場合は、TE を加えて約 300 µL に調製）。キャップを締めてチューブを上下に転倒させるように混和します。

12. 400 µL のイソプロパノールを加え同様に転倒混和し、室温で最大速度で 15 分間遠心します。
13. 上清を捨て、さらに 2 分間遠心し、残った液体を 200 µL ピペットで除去します。
14. キャップを開けて室温または 37°Cで 15 分間乾燥させます。
15. 50 µL の TE を加え、5 分間ボルテックスして溶解し、保存するかそのままアッセイに使用します。

大量にプラスミド DNA が必要な場合、ミニプレップで抽出した DNA を大腸菌に入れてからマキシプレップで再びプラスミドを抽出することもできますが、ミニプレップを行ったときの培地を少量キープしておいて大量培養してマキシプレップを行う方が時間の節約になります。

プラスミド DNA マキシプレップ

ここでは一般的なマキシプレップの方法を紹介していますが、GenElute ™ Maxi Prep などのフェノールを使わない便利なキットも多く使われています。

必要な試薬

TE 50/1 バッファー（50 mM トリス塩酸バッファー pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0）
リゾチウム（カタログ番号 L6876）
0.5 M EDTA 溶液 pH 8.0
20 mg/mL リボヌクレアーゼ A（RNase A）溶液（カタログ番号 R4642）
10% Triton 水溶液
中性平衡化中性フェノール（カタログ番号 P4557）
5 M 過塩素酸ナトリウム溶液（カタログ番号 410241）
イソプロパノール（2- プロパノール）（カタログ番号 I9516）
TE（10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0 カタログ番号 T9285）
リゾチウム溶液は遠心している間に準備し、その他の溶液は事前に準備します。

取扱い注意
フェノールは接触するとただちに皮膚の火傷などを引き起こす危険性があり、接触、吸引、摂取すると有害です。安全性データシート（SDS）をご確認の上ご使用ください。

プロトコール

1. 一晩培養した寒天培地プレートからピックしたシングルコロニーを 3 mL の LB 培地で前培養します。
2. 前培養を 3 時間行って培地がやや濁ってきたら、前培養の一部をあらかじめ 37°Cに温めた 800 mL の LB 培地に移し（前培養の 500 倍希釈）、一日（24 時間）培養します。培養時間が短いとセルライセート中に余分なタンパク質や RNA が多くなることがあります。
3. 培養液を 250 mL のポリプロピレンコニカルチューブなどに移して最大速度で遠心し（例 60 分間、3699 rpm）、上清を捨てます。上清には大腸菌が残っていることがありますので、そのまま流しに捨てず、オートクレーブしてから廃棄するなどご所属の施設のルールに沿って廃棄してください。
4. 細胞ペレットの入ったチューブを氷上に置き、氷冷した 8 mL の TE 50/1 バッファーを加えます。時々氷上に戻しながら 5 分程度断続的なボルテックスによってペレットを完全に懸濁させます。10 mL の細胞懸濁液を氷上に置いた SS34 50 mL チューブに移し入れます。

以下はすべて氷上または 4°Cで行います。

5. 細胞懸濁液を入れたチューブに、新しく調製した 10 mg/mL リゾチウム溶液を 2.5 mL 加え、ただちにキャップを締めて素早く 10 分間以上転倒混和します。このとき溶液はやや粘性が生じてきます。チューブはシェイクせず、単に上下に繰り返し転倒させてください。シェイクするとゲノム DNA が切断され、プラスミド DNA に混入する原因になることがあります。
6. 氷上で 5 分間インキュベートします。
7. キャップを開けて素早く 2.0 mL の 0.5 M EDTA 溶液 pH 8.0 を加えて再びキャップを締め、先ほどと同様にシェイクしないように転倒混和し、溶液がさらにどろっとした粘性のある状態になるまで続けます。
8. さらに氷上で 5 分間インキュベートします。

9. 50 µL の 20 mg/mL リボヌクレアーゼ A 溶液と 150 µL の 10% Triton X-100 溶液を混ぜ、TE 50/1 バッファーで 1 mL に調製します。この混合液を上記で混和したチューブに添加し、チューブのキャップを締めて同様に転倒混和し、さらに粘性が生じるまで続けます。
10. 30 分間氷上に静置します。
11. Sorvall SS34 ローターなどで 18,000 rpm、60 分間遠心します。大腸菌培養が若い場合は遠心後に沈殿が落ち切らないことがあり、この場合はさらに遠心を繰り返します。
12. 上清を新しいファルコンチューブに移します。ここで上清を -20°Cに冷凍保存して作業を中断できます。あるいは 1 時間程度であれば氷上に一時的に保存しておくことも可能です。

13. 20 mL の中性平衡化中性フェノールを加えて 1 分間激しくシェイクまたはボルテックスし、スイング型のローターを用いて最大速度で 20 分間遠心してスピンダウンします。
14. しばらくチューブを静置し、徐々に上部の水層と中間層が生じるまで待ちます。上層をピペットで新しいチューブに移し、20 mL のクロロホルムを加えて 1 分間激しくシェイクまたはボルテックスし、同様に最大速度で 5 分間遠心してスピンダウンします。
15. チューブを静置して層が分離するのを待ち、上層をピペットで 30 mL Corex tube に移します（後でバッファーを添加するためチューブに 10 〜 15 mL の余地が残るようにします)。水層に対して 10% の 5M 過塩素酸ナトリウム溶液（通常は 1 mL) と水層に対して 80% の 5 M 過塩素酸ナトリウム溶液（通常は 8 mL) を加えます。
16. チューブをパラフィルムでシールして数分間よく混ぜます。HB4 などスイング型のローターで 10,000 rpm、15 分間スピンダウンします。
17. 上清を捨て、キャップを開けたまま室温または 37°Cでペレットを乾燥させます。乾燥させすぎないように注意します。
18. 乾燥させたペレットを 500 µL の TE バッファーで溶解し滅菌済みのエッペンドルフチューブに移し、4°Cで保存します。
19. アガロースゲル電気泳動などで DNA を確認して RNA の混入を調べ、さらに RNase 処理を行うこともあります。

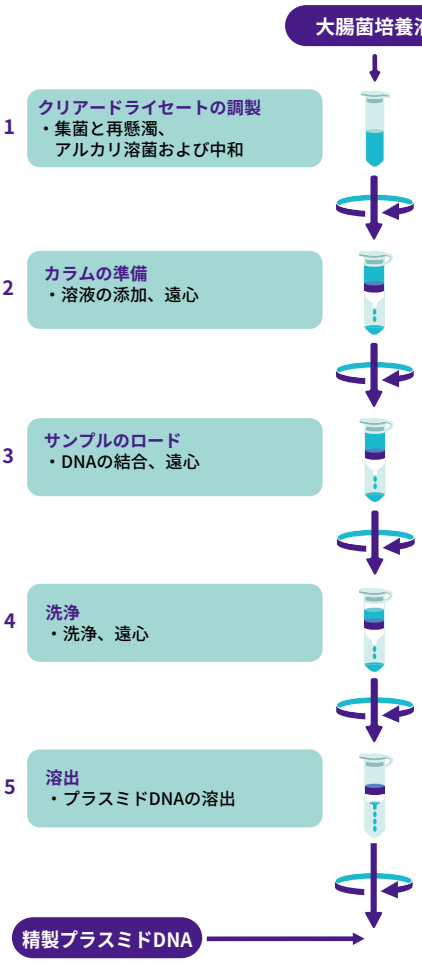
プラスミド精製キット

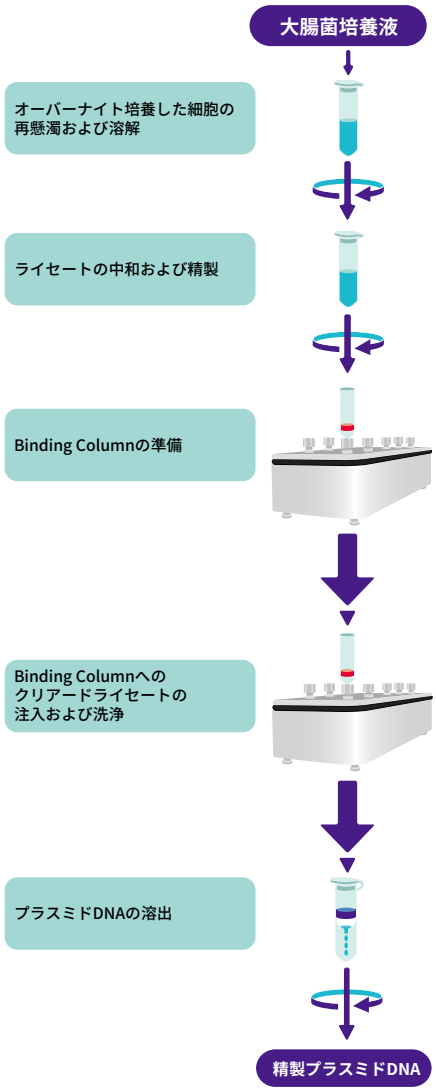
ミニプレップキット

培養した大腸菌からのプラスミド抽出はアルカリ SDS 法などで行うことができますが、調製する試薬の種類が多く、フェノールやクロロホルムのような有害な物質を使用しなければなりません。そこでプラスミド抽出の作業や危険性を低減し、高純度のプラスミド DNA が得られるキットがよく用いられています。大腸菌の培養量によってミニプレップ、ミディプレップ、マキシプレップなどがあり、得られるプラスミド DNA 中のエンドトキシンをほぼフリーにするキットなどいくつものキットが作られています。エンドトキシンフリーのプラスミド精製キットは高純度のプラスミド DNA が要求される哺乳動物細胞へのトランスフェクションなどに利用されます。

ここではスタンダードなキットとして、1 ～ 5 mL の LB 培地で培養した大腸菌からアルカリ SDS 法をベースにしてプラスミド DNA を抽出し、プラスミド DNA をシリカメンブレンカラムに結合させて精製するミニプレップキットを紹介します。

遠心だけで行う従来のキット（左図）と遠心とバキュームを組み合わせて作業効率を向上させたキット（右図）があります。扱うサンプルが比較的少ない場合は左図のキットが適し、吸引器とバキュームマニホールドがあり、多数のサンプルを同時に扱う場合は右図のキットが適しています。





プラスミド精製ミニプレップキット

カタログ番号	回数
PLN10-1KT	10 回分
PLN70-1KT	70 回分
PLN350-1KT	350 回分

詳細なプロトコールはウェブサイトの各製品ページからご覧いただけます。

プラスミド精製ミニプレップキット HP シリーズ

カタログ番号	回数
NA0150S-1KT	10 回分
NA0150-1KT	70 回分
NA0160-1KT	350 回分

バキュームマニホールド
カタログ番号　VM20-1SET

プラスミド精製キット一覧

目的のプラスミドの量や品質によって下記のキットからお選びいただけます。使用する培地の量は LB 培地を用いたときの培養量です。

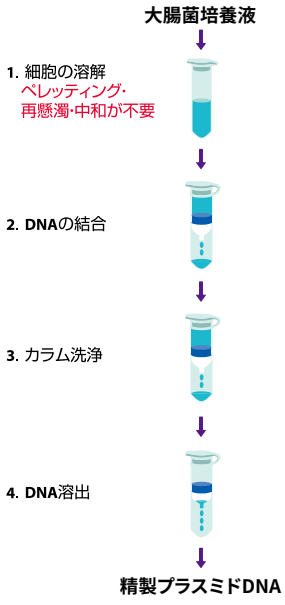
プラスミド精製キット	カタログ番号	使用回数	精製のタイプ	使用する培養量	標準的な精製時間	溶出量	期待される収量	得られるDNAの使用用途
5 分間ミニプレップ	PFM10-1KT1	10 回分	吸引または遠心	0.4 mL まで	5 分間	40 µL	5 µg まで	シークエンス、PCR
	PFM50-1KT	50 回分						
	PFM250-1KT	250 回分						
ミニプレップ	PLN10-1KT	10 回分	遠心	1.5 mL	30 分以内	100 µL	20 µg まで	制限酵素処理、クローニング、シークエンス、PCR
	PLN70-1KT	70 回分						
	PLN350-1KT	350 回分						
HP ミニプレップ	NA0150S-1KT	10 回分	吸引または遠心	1 ～ 5 mL	30 分以内	100 µL	25 µg まで	制限酵素処理、クローニング、シークエンス、PCR、トランスフェクション
	NA0150-1KT	70 回分						
	NA0160-1KT	350 回分						
ミディプレップ	PLD35-1KT	35 回分	遠心	20 ～ 40 mL	45 分	1 mL	300 µg まで	制限酵素処理、クローニング、シークエンス、PCR
	PLD140-1KT	140 回分						
HP ミディプレップ	NA0200S-1KT	4 回分	吸引または遠心	50 mL	30 分	1 mL	350 µg まで	制限酵素処理、クローニング、シークエンス、PCR、トランスフェクション
	NA0200-1KT	25 回分						
マキシプレップ	PLX15-1KT	15 回分	遠心	25 ～ 200 mL	45 分	5 mL	1.2 mg まで	制限酵素処理、クローニング、シークエンス、PCR
HP マキシプレップ	NA0300S-1KT	4 回分	吸引	150 mL	30 分	3 ～ 5 mL	1.2 mg まで	制限酵素処理、クローニング、シークエンス、PCR、トランスフェクション
	NA0300-1KT	10 回分						
	NA0310-1KT	25 回分						
HP メガプレップ	NA0500-1KT	5 回分	吸引	150 mL ～ 1L	90 分	20 mL	5 mg まで	制限酵素処理、クローニング、シークエンス、PCR、トランスフェクション

エンドトキシンフリープラスミド精製キット	カタログ番号	使用回数	精製のタイプ	使用する培養量	標準的な精製時間	溶出量	期待される収量	得られるDNAの使用用途
ミディプレップ	PLED35-1KT	35 回分	遠心	5 ～ 40 mL	95 分以内	1 mL	250 µg まで	制限酵素処理、クローニング、シークエンス、PCR、センシティブな細胞へのトランスフェクション
マキシプレップ	PLEX15-1KT	15 回分	遠心	25 ～ 200 mL	2 時間	3 ～ 5 mL	1.2 mg まで	制限酵素処理、クローニング、シークエンス、PCR、センシティブな細胞へのトランスフェクション
HP マキシプレップ	NA0400S-1KT	4 回分	吸引	150 mL	40 分	3 ～ 5 mL	1.2 mg まで	制限酵素処理、クローニング、シークエンス、PCR、センシティブな細胞へのトランスフェクション
	NA0400-1KT	10 回分						
	NA0410-1KT	25 回分						
HP メガプレップ	NA0600-1KT	5 回分	吸引	200 mL ～ 1 L	90 分	20 mL	5 mg まで	制限酵素処理、クローニング、シークエンス、PCR、センシティブな細胞へのトランスフェクション
HP ギガプレップ	NA0800-1KT	5 回分	吸引	2.5 L まで	2 時間	50 mL	15 mg まで	制限酵素処理、クローニング、シークエンス、PCR、センシティブな細胞へのトランスフェクション

わずか 5 分のミニプレップキット

大腸菌を溶かしてそのままプラスミド精製
収量最大 5 µg
吸引、遠心法のどちらも対応

カタログ番号	回数
PFM10-1KT	10 回分
PFM50-1KT	50 回分
PFM250-1KT	250 回分



DNA サンプルのクリーンアップ

DNA のエタノール沈殿

DNA のエタノール沈殿は DNA の濃度をそろえたり、濃縮や精製する目的で行われます。

必要な試薬

3 M 酢酸ナトリウムバッファー pH 5.2（4 °Cが理想的）
冷やした 100% エタノール※（希釈していないエタノール）（-20°Cが理想的）
冷やした 70% エタノール（滅菌した脱イオン水で希釈したもの）（-20°Cが理想的）
※ 100% エタノールとは希釈していないエタノールのことで、一般的には規格 99.5% 以上のエタノールが用いられます

プロトコール

1. DNA サンプル溶液を適切な大きさのチューブに入れます。チューブに入れる量はチューブの容量に対して 1/4 以下になるようにします（例 1.5 mL チューブの場合、DNA 溶液は 375 µL 以下）。
2. イオン濃度を平衡化させるため、DNA 溶液に対して 1/10 倍量の 3M 酢酸ナトリウム溶液を入れます。
3. DNA 溶液に対して 2 ～ 3 倍量の冷却した 100% エタノールを加え、-20°Cで 1 時間以上静置します。
4. 4°Cで最大速度（12,000 ～ 13,000 rpm）で 15 分間遠心します。
5. 沈殿を崩さないよう注意しながら、ピペットやシリンジなどで上清をできるだけ取り除きます。上清を取り除き切れない場合は再び遠心して上清を除去します。
6. 冷却した 250 µL の 70% エタノールを添加します。
7. 4°C、最高速度で 5 分間遠心します。
8. 200 µL のピペットなどで上清を取り除き、室温または 37°Cで上清の残りを乾燥させます。乾燥させすぎるとペレットが溶けにくくなります。
9. ペレットを希望する量の水または TE バッファーで溶解します。

4°Cでの作業は必須ではありませんが、低濃度の DNA サンプル（<20 ng/ µL）では効率的です。

DNA サンプルの RNase 処理と RNA の除去

ここではマキシプレップによって抽出したプラスミド DNA サンプルの RNase 処理を紹介しています。

必要な試薬

TE バッファー（カタログ番号 T9285）
20 mg/m RNase A 溶液（カタログ番号 R4642）
フェノール（カタログ番号 P4557）
クロロホルム（カタログ番号 288306）
5 M 過塩素酸ナトリウム溶液（カタログ番号 410241）
イソプロパノール（2- プロパノール）（カタログ番号 I9516）

プロトコール

1. マキシプレップしたプラスミド DNA サンプル溶液を 50 mL Falcon チューブに入れ、5 mL の TE バッファーで希釈します。
2. 50 µL の RNase A 溶液（20 mg/mL）を添加し、室温で 30 分間インキュベート。
3. 5mL のフェノールを添加し、1 分間ボルテックスなどで激しくシェイクし、スイング型のローターを用いて最大速度で 15 分間遠心します。
4. しばらくチューブを静置し、徐々に上部の水層と中間層が生じるまで待ちます。上層をピペットで新しいチューブに移し、5 mL のクロロホルムを加えて 1 分間激しくシェイクまたはボルテックスし、同様に最大速度で 5 分間遠心してスピンダウンします。
5. チューブを静置して層が分離するのを待ち、上層（5 mL 程度）をピペットで 15mL Corex チューブに移します。水層に対して 10% の 5 M 過塩素酸ナトリウム溶液（通常は 500 µL）と水層に対して 80% の 5M 過塩素酸ナトリウム溶液（通常は 4 mL）を加えます。
6. チューブをパラフィルムでシールして数分間よく混ぜます。HB4 などスイング型のローターで 10,000 rpm、15 分間スピンダウンします。
7. 上清を捨て、キャップを開けたまま室温または 37°Cでペレットを乾燥させます。乾燥させすぎないように注意します。
8. 乾燥させたペレットを 500 µL の TE バッファーで溶解し滅菌済みのエッペンドルフチューブに移し、4°Cで保存します。
9. アガロースゲル電気泳動などで DNA を確認して RNA の混入がないことを確かめます。DNA の濃度と純度は nanodrop などの分光光度計で測定することができます。

フェノールクロロホルム抽出

DNA のクローニングでは様々な反応条件のプロセスがあるためバッファーを交換したり、酵素を除去することが必要になります。このためにフェノールクロロホルム抽出やミニプレップキットなどがありますが、簡便で経済的なフェノールクロロホルム抽出がよく行われています。また PCR 反応度の DNA クリーンアップには専用のキット GenElute ™ PCR Cleanup Kit（カタログ番号 NA1020）もあり、多くの方に利用されています。このキットで回収できない <200 bp や >4-5 kb の DNA を抽出する場合にはフェノールクロロホルム抽出も用いられます。

必要な試薬

TE バッファー（10 mM トリス塩酸バッファー pH 8.0, 0.1 mM EDTA）
平衡化中性フェノール（カタログ番号 P4557）
クロロホルム（カタログ番号 288306）
5 M 過塩素酸ナトリウム溶液（5 M 過塩素酸ナトリウム）
イソプロパノール（2- プロパノール）（カタログ番号 I9516）

取扱い注意

フェノールは接触するとただちに皮膚の火傷などを引き起こす危険性があり、接触、吸引、摂取すると有害です。安全性データシート（SDS）をご確認の上ご使用ください。

プロトコール

1. 50 µL の DNA 溶液を 1.5 mL エッペンドルフチューブに入れます。
2. 50 µL の TE を添加します。
3. 50 µL の平衡化中性フェノールを添加します。
4. フタをしっかり閉めて、サンプルが乳液状になるまでボルテックスします。ここでタンパク質は変性してフェノール層に移動し始め、DNA は水層に留まります。
5. 100 µL のクロロホルムを添加し、フタをしっかり閉めてボルテックスします。ここで DNA とタンパク質は完全に分離されます。
6. 最大速度（12,000 ～ 13,000 rpm）で 5 分間遠心します。
7. しばらく静置し上層が分離するのを待ち、上層（水層）をあらかじめ 100 µL のクロロホルムを入れた 1.5 mL エッペンドルフチューブに移し入れます。
8. フタをしっかり閉めてボルテックスし、最大速度で 2 分間遠心します。遠心後 10 µL の 5 M 過塩素酸ナトリウム溶液を添加して混ぜます。
9. 110 µL のイソプロパノールを加え、フタをしっかり閉めてボルテックスし、最大速度で 15 分間遠心します
10. 上清を注意深く捨て、再び、最大速度で 1 分間遠心します。
11. ペレットを崩さないよう注意しながら細いピペットまたはシリンジなどで残りの上清を除去します。ペレットの反対側から上清を吸い取ると比較的容易になります。チューブの壁面にも溶液が残らないよう気をつけます。
12. フタを開けたまま室温で 1 分間置いて乾燥させ、適切な容量の TE バッファーなどで溶解します（30 ～ 50 µL）。
13. ボルテックスの合間に氷上に置くようにして、ペレットが完全に溶けるまでボルテックスを断続的に行います。

ゲノム DNA 精製キット

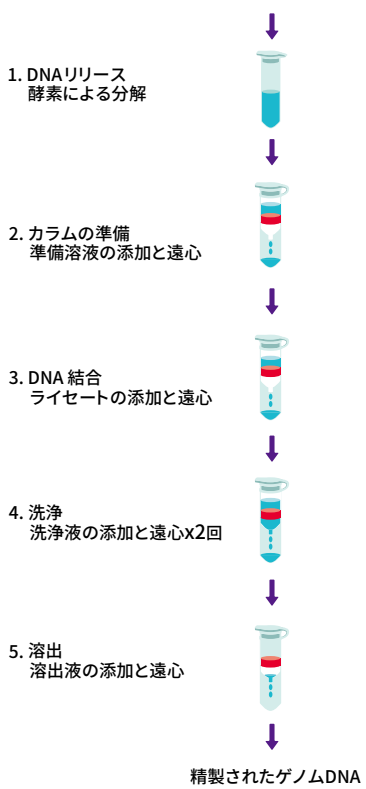
ゲノム DNA 精製キット一覧

哺乳動物の培養細胞や組織、植物、微生物など研究対象のサンプルからゲノム DNA を抽出するために、一般的に細胞や組織を界面活性剤、酵素などで処理して分解してライセートにして、フェノールクロロホルムなどでゲノム DNA を抽出する方法が古くから用いられ、サンプルの種類や研究室によって様々なプロトコールが開発されてきました。ここではキットを用いて容易にゲノム DNA を抽出・精製するキットを紹介します。有害なフェノールやクロロホルムを用いないため安心して利用できます。これらのキットはサンプルの溶解に必要な試薬と DNA を結合させるためのシリカメンブレンカラムなどが付属しています。

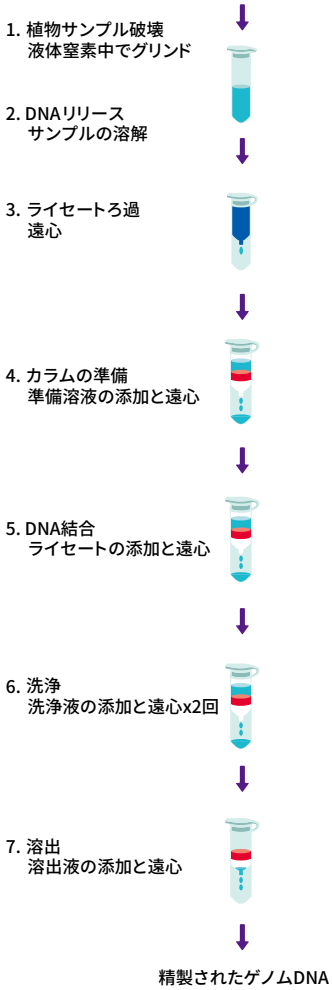
ゲノムDNA精製キット	カタログ番号	使用回数	使用するサンプルと量	標準的な精製時間	溶出量	期待される収量	得られるDNAの使用用途
哺乳動物用ミニプレップキット	G1N10-1KT	10 回分	哺乳動物の培養細胞や組織付着細胞は $5x10^6$ cells まで	溶解後 20 分	200 ～ 400 µL	HeLa 細胞 $5x10^6$ cells から 15 ～ 25 µg 20 mg の組織から 30 µg	PCR、制限酵素処理、クローニング、サザンブロット
	G1N70-1KT	70 回分					
	G1N350-1KT	350 回分					
植物用ミニプレップキット	G2N70-1KT	70 回分	植物組織 100 mg まで	40 分以内	100 ～ 400 µL	20 µg まで（サンプルの種類によって異なる）	PCR、制限酵素処理、クローニング、サザンブロット
血液用ミニプレップキット	NA2010-1KT	70 回分	全血（採取後 24 時間以内）200 µL まで	40 分以内	400 µL	10 µg まで	PCR、制限酵素処理、クローニング、サザンブロット
バクテリア用ミニプレップキット	NA2100-1KT	10 回分	グラム陰性菌、グラム陽性菌※の培養液 1.5 mL まで※	75 ～ 120 分	400 µL	20 µg まで	PCR、制限酵素処理、クローニング、サザンブロット
	NA2110-1KT	70 回分					
	NA2120-1KT	350 回分					

※ グラム陽性菌の場合、リゾチウム（カタログ番号 L4919) が別途必要です。

哺乳動物細胞からの精製プロトコール概要



植物からの精製プロトコール概要



RNA 精製キット一覧

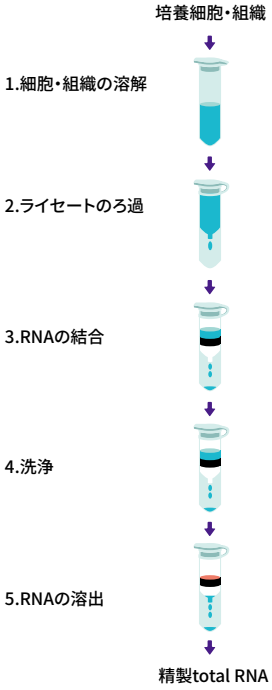
RNA は cDNA 作成のテンプレートとして利用されるだけではなく、RNA の機能にも注目されています。約 21 mer の microRNA と呼ばれる短い RNA が翻訳抑制や mRNA 切断などの方法で遺伝子発現を調節していることが知られ、より多くの研究が行われ始めています。
哺乳動物や植物などのサンプルから total RNA、mRNA、microRNA を抽出・精製するためのキットが市販されています。

Total RNA 精製キット・試薬	カタログ番号	使用回数	使用するサンプルと量	標準的な精製時間	期待される収量	得られるRNAの使用用途
哺乳動物用 total RNA ミニプレップキット	RTN10-1KT	10 回分	付着細胞は 1x10^7 cells まで 組織は 40 mg まで	30 分	150 µg まで	RT-PCR、ノーザンブロット、マイクロアレイ
	RTN70-1KT	70 回分				
	RTN350-1KT	350 回分				
植物用 total RNA ミニプレップキット	STRN10-1KT	10 回分	グリンドした植物組織 100 mg まで	30 分	20 ～ 60 µg	RT-PCR、ノーザンブロット、マイクロアレイ、ラベリング
	STRN50-1KT	50 回分				
	STRN250-1KT	250 回分				
TRI Reagent®	T9424		試薬 1 mL あたり 10^7 の細胞 試薬 1 mL あたり 100 mg の組織	90 分	10^6 細胞あたり 5 ～ 15 µg 組織 1 mg あたり 1 ～ 10 µg	RT-PCR、ノーザンブロット、マイクロアレイ
	T3809		試薬 0.75 mL あたり 0.25 mL の血液サンプル	90 分		
	T3934		試薬 0.75 mL あたり 0.25 mL の生体溶液サンプル	90 分		

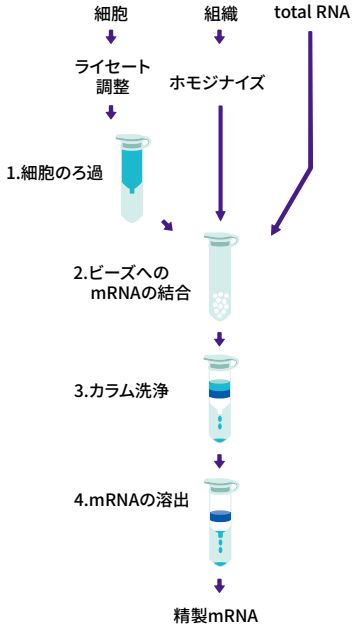
mRNA精製キット	カタログ番号	使用回数	使用するサンプルと量	標準的な精製時間	期待される収量	得られるRNAの使用用途
mRNA ミニプレップキット	MRN10	10 回分	5 ～ 500 µg の total RNA	40 分	用いた total RNA の 1 ～ 5%	RT-PCR、ノーザンブロット、マイクロアレイ
	MRN70	70 回分				
哺乳動物用 直接 mRNA ミニプレップキット	DMN10	10 回分	培養細胞は 1x10^7 cells まで 組織は 40 mg まで	60 分	5 µg まで	RT-PCR、ノーザンブロット、マイクロアレイ
	DMN70	70 回分				

microRNA精製キット	カタログ番号	使用回数	使用するサンプルと量	標準的な精製時間	期待される収量	得られるRNAの使用用途
microRNA 抽出キット	SNC10	10 回分	培養細胞は 1x10^7 cells まで 組織は 40 mg まで	30 分	20 µg まで	RT-PCR、ノーザンブロット、マイクロアレイ
	SNC50	50 回分				

哺乳動物用 Total RNAミニプレップキット



哺乳動物用直接mRNAミニプレップキット



RNase 除去にはこちら

RNaseZAP ™ （カタログ番号 R2020）
ガラスやプラスチック表面の RNase を除去できる溶液です。

RNA 抽出用サンプルの保存はこちら

RNAlater ™ （カタログ番号 R0901）
組織片を溶液につけるだけで RNA を長期間保護できます。

PCR

一般的な PCR

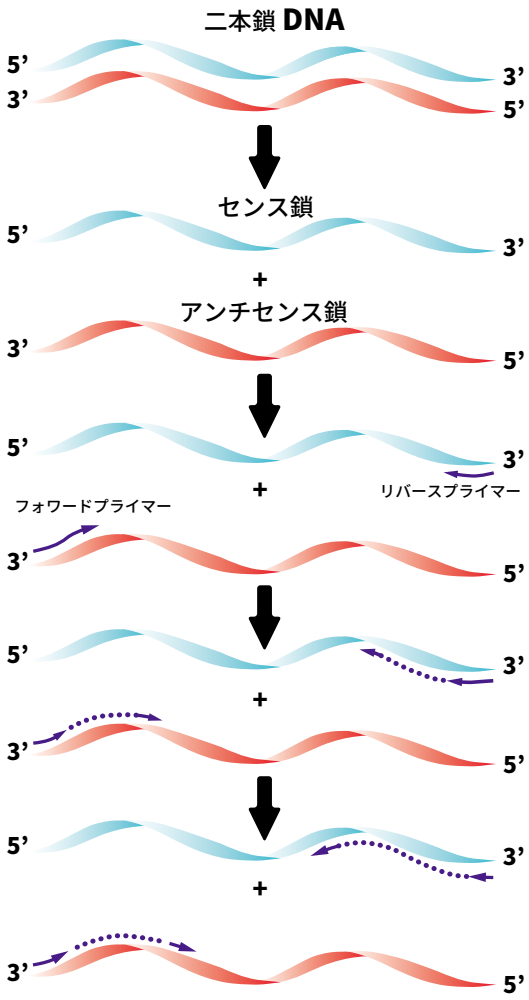
ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は分子生物学で最も広く使用されている手法のひとつです。基礎的な研究からハイスループットスクリーニングまで利用されます。PCR によって少量の DNA サンプルや RNA サンプル（RNA の場合は相補的 DNA（cDNA）に逆転写した後のサンプル）からターゲットの DNA フラグメントを増幅します。テンプレートにする DNA が劣化していたり阻害剤でコンタミしている場合でもテンプレート中の 1 つのコピーからターゲットの配列が増幅できることが PCR の大きな利点です。例えば、古代エジプトのミイラから DNA を抽出し PCR を行うことで、ツタンカーメンファミリーの一員であることを特定するという研究もなされています。

PCR 反応のプロトコール概要

PCR 反応は一般的に下記のようなサイクルで反応液を処理します。ただし、DNA ポリメラーゼやプライマー、増幅するフラグメントの長さなどによって最適な条件は異なりますので、実際にはそれぞれの実験系に応じで最適な条件を検討して行います。

最初の変性 : 95°C、1 ～ 5 分間・・・二本鎖 DNA（dsDNA）を一本鎖 DNA（ssDNA）に解離するステップ
以下を繰り返し 25 ～ 35 サイクル
変性 : 95°C、10 秒間～ 1 分間・・・二本鎖 DNA（dsDNA）を一本鎖 DNA（ssDNA）に解離するステップ
アニーリング : 45 ～ 60°C、30 秒間～ 1 分間・・・プライマーがテンプレートに結合するステップ。プライマーの Tm 値より約 5°C 低い温度で行う
伸長 : 72°C、20 秒間～ 1 分間・・・DNA ポリメラーゼによって結合したプライマー部分から DNA が伸長するステップ

Tm 値とは二本鎖 DNA の 50％が一本鎖 DNA に解離するときの温度でプライマーの Tm 値はそのプライマーの各ヌクレオチド（A,T,G,C）の数や塩濃度などで決まります。Tm 値の計算はいくつかの方法がありますが、シグマジェノシスのプライマー（オリゴ DNA）で購入した場合はラベルに記載されています。



PCR 反応プロトコール（Taq DNA ポリメラーゼ　シグマ アルドリッチカタログ番号 D1806 を使う場合の例）

ここでは 1 反応 50 µL を 10 本のサンプルで PCR を行う調製方法を紹介します。

通常複数の PCR 反応を同時に行うため、1 本分の反応液ではなく複数本数分の反応液をまとめて用意します。これはマスターミックスと呼ばれます。このとき同時に PCR 反応を行いますが、テンプレートの DNA はそれぞれ異なるサンプルで行うことがよくあります。そのためマスターミックスとして、反応液からテンプレート DNA を除いた溶液を作成します。そのマスターミックスを各 PCR チューブに分注し、それぞれに DNA テンプレートを添加して PCR 反応液が完成します。
また、マスターミックスはちょうど必要な本数分の量にするとたいていの場合は分注時に足りなくなりますので、少し多めに作成します。ここでは 10 反応を行う場合、11 本分のマスターミックスを用意する方法を紹介しています。

各溶液および作成した反応液は氷上に置きます。

ここで紹介しているカタログ番号 D1806 Taq DNA ポリメラーゼに付属の 10x PCR バッファーは塩化マグネシウム $MgCl_2$ があらかじめ含まれています。$MgCl_2$ は Taq DNA ポリメラーゼの反応に必要で、この濃度によって PCR 反応の結果が異なることがあります。$MgCl_2$ が含まれていない Taq DNA ポリメラーゼを使う場合は $MgCl_2$ を添加する必要があり、いくつかの濃度を試して最適な $MgCl_2$ 濃度を決めておきます。

50 µLのPCR反応を10本のサンプルで行う場合のマスターミックス　作成例

量（11本分）	成分	メモ	最終濃度
456.5 µL※	水（DNase フリーの水）	カタログ番号 W4502 ※ 50 µL からその他の溶液量を差し引いた量。 分注後に DNA テンプレートを 1 µL 添加する例ですので、DNA の添加量が異なる場合は水の量も変わります。	
55 µL	10x PCR バッファー（塩化マグネシウム含有）	カタログ番号 D1806 に付属	
11 µL	10 mM dNTP 溶液	カタログ番号 D7295	200 µM
5.5 µL	50 µM フォワードプライマー溶液	ここでは 50 µM 濃度の溶液を使用する例です。異なる濃度の場合、添加する量を変えます。	0.5 µM
5.5 µL	50 µM リバースプライマー溶液	ここでは 50 µM 濃度の溶液を使用する例です。異なる濃度の場合、添加する量を変えます。	0.5 µM
5.5 µL	Taq DNA ポリメラーゼ	カタログ番号 D1806	0.05 units/mL
539 µL	合計（テンプレート DNA を除いた量）	1 サンプルにテンプレート DNA を 1 µL 入れるため、1 サンプル用の反応液は 49 µL。11 本分のマスターミックスは 539 µL 必要になります。	

作成したマスターミックスを穏やかにボルテックスして混ぜ、軽く遠心してチューブの底に溶液を集めます。
マスターミックスを各 PCR チューブに分注（この例では 49 µL）し、それぞれ DNA テンプレートを 1 µL 添加します。穏やかにボルテックスして混ぜ、軽く遠心してチューブの底に溶液を集めます。

分注したマスターミックスに添加するテンプレートDNA

量	成分	コメント	最終濃度
1 µL	10 ng/µL テンプレート DNA 溶液	一般的に 10 ng 程度使用。DNA 溶液の濃度が異なる場合は、10 ng になるように量を変えて添加します。	200 pg/µL

チューブをサーマルサイクラーに入れ、下記のサイクルで PCR 反応を行います。
反応の温度や時間、サイクル数はプライマー、増幅する配列の長さ、サーマルサイクラーによって異なることがありますので最適な条件を検討して行います。

PCRサイクルの例		
以下を25〜30サイクル		
変性	94°C	1 分間
アニーリング	55°C	2 分間
伸長	72°C	3 分間

PCR サイクルが終了したら 4°Cで保持することができます。

ホットスタート PCR

PCR 反応液の調製中にプライマーがテンプレート DNA に結合して非特異的な増幅が起きたり、プライマー同士が結合してしまうことがあります。これを防ぐため PCR の反応前に DNA ポリメラーゼの活性を抑えておく方法が考案され、その方法のひとつとしてホットスタート PCR 法がよく用いられています。

Taq DNA ポリメラーゼを用いたホットスタート PCR では、DNA ポリメラーゼに対する抗体（または化合物）を結合させておくことで、熱処理前の Taq DNA ポリメラーゼは不活性化を保っています。JumpStart ™ Taq DNA ポリメラーゼ（シグマ アルドリッチ）は抗体によって不活性化され、PCR サイクル初期の熱変性ステップによって抗体が変性して DNA ポリメラーゼから離れることで DNA ポリメラーゼが活性化状態に戻り、PCR 反応が進みます。このことによって高い特異性のある PCR 産物が得られます。

ここでは JumpStart ™ Taq DNA ポリメラーゼ（シグマ アルドリッチ D9307）を用いて 10 サンプルの PCR 反応を行う例を紹介しています。

50 µLのPCR反応を10本のサンプルで行う場合のマスターミックス　作成例

量（11本分）	成分	メモ	最終濃度
451 µL※	水（DNase フリーの水）	カタログ番号 W4502 ※ 50 µL からその他の溶液量を差し引いた量。 分注後に DNA テンプレートを 1 µL 添加する例ですので、DNA の添加量が異なる場合は水の量も変わります。	
55 µL	10x PCR バッファー（塩化マグネシウム含有）	カタログ番号 D9307 に付属	
11 µL	10 mM dNTP 溶液	カタログ番号 D7295	200 µM
5.5 µL	50 µM フォワードプライマー溶液	ここでは 50 µM 濃度の溶液を使用する例です。異なる濃度の場合、添加する量を変えます。	0.5 µM
5.5 µL	50 µM リバースプライマー溶液	ここでは 50 µM 濃度の溶液を使用する例です。異なる濃度の場合、添加する量を変えます。	0.5 µM
11 µL	JumpStart Taq DNA ポリメラーゼ	カタログ番号 D9307	0.05 units/mL
539 µL	合計（テンプレート DNA を除いた量）	1 サンプルにテンプレート DNA を 1 µL 入れるため、1 サンプル用の反応液は 49 µL。11 本分のマスターミックスは 539 µL 必要になります。	

作成したマスターミックスを穏やかにボルテックスして混ぜ、軽く遠心してチューブの底に溶液を集めます。
マスターミックスを各 PCR チューブに分注（この例では 49 µL）し、それぞれ DNA テンプレートを 1 µL 添加します。穏やかにボルテックスして混ぜ、軽く遠心してチューブの底に溶液を集めます。

分注したマスターミックスに添加するテンプレートDNA

量	成分	コメント	最終濃度
1 µL	10 ng/µL テンプレート DNA 溶液	一般的に 10 ng 程度使用。DNA 溶液の濃度が異なる場合は、10 ng になるように量を変えて添加します。	200 pg/µL

チューブをサーマルサイクラーに入れ、下記のサイクルで PCR 反応を行います。
反応の温度や時間、サイクル数はプライマー、増幅する配列の長さ、サーマルサイクラーによって異なることがありますので最適な条件を検討して行います。

PCRサイクルの例

初期の変性	**94°C**	**1分間**
25〜35サイクル		
変性	94°C	30 秒間
アニーリング	55 〜 68°C	30 秒間
伸長	72°C	1 分間※
最後の伸長	72°C	1 分間※
保持	4°C	∞

※ 伸長時間は最低 1 分間で増幅する DNA のサイズ 1 kb ごとに 1 分間長く行います。

PCR 反応後の DNA 精製

PCR により増幅した DNA 溶液（PCR 産物）を用いてシークエンスを行う場合、PCR 反応液に含まれるプライマーや dNTP などシークエンス反応に影響を与える物質を除去するため、PCR 産物の精製が行われます。

PCR 後の DNA 精製方法としてシリカメンブレンカラムを用いたキットがよく使われています。また、ピペッティングだけで精製できる特殊なチップ Diffinity RapidTip（シグマ アルドリッチ）は非常に手軽で好評を得ています。

シリカメンブレンカラムによる PCR 産物の精製キット

GenElute ™ PCR クリーンアップキット（カタログ番号 NA1020（70 回分））
DNA フラグメントを含むアガロースゲルを溶かし、シリカメンブレンカラムを用いて遠心によって DNA を精製
PCR 反応後のプライマー、dNTP、DNA ポリメラーゼなどを除去
10 µg までの DNA を精製（回収率最大 95%）
精製した DNA はシークエンス、クローニング、制限酵素処理、マイクロアレイなどに利用可能

ピペッティングによる PCR 産物の精製チップ

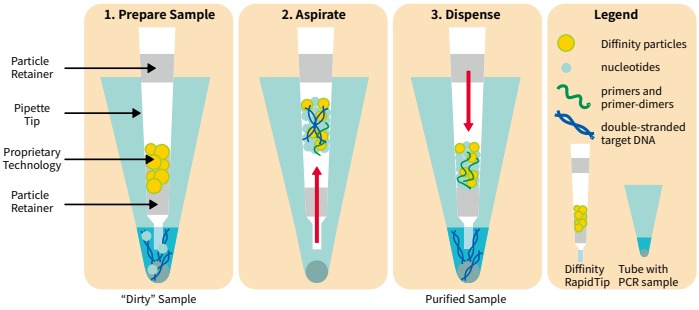
Diffinity RapidTip を用いると約 1 分間のピペッティング操作だけで PCR 産物から DNA を精製することができます。
精製した DNA の用途に応じて 2 タイプのチップがあります。また一般的なピペッターに使用できるチップと、Rainin LTS ピペット用のチップもあります。

Diffinity RapidTip

dNTP やプライマーおよびプライマーダイマーを除去
25 µL の PCR 反応液から 100 bp ～ 10 kb の DNA フラグメントを抽出（回収率 90% 以上）
精製した DNA はシークエンス、SNP 解析、マイクロアレイなどに利用可能

Diffinity RapidTip2

DNA ポリメラーゼ、dNTP やプライマーおよびプライマーダイマーを除去
50 µL の PCR 反応液から 100 bp ～ 10 kb の DNA フラグメントを抽出（回収率 90% 以上）



精製した DNA はシークエンス、SNP 解析、マイクロアレイ、TA クローニングなどに利用可能

Dinity RapidTip

精製	精製後の用途	適合するピペット	内容量	カタログ番号
プライマー、ダイマー、ssDNA、dNTP を除去	シークエンス、SNP 解析、マイクロアレイなど	一般的なマイクロピペット	8 本	D1947-8RXN
			48 本	D1947-48RXN
			96 本	D1947-96RXN
		Rainin LTS™ ピペット	8 本	D1947L-8RXN
			48 本	D1947L-48RXN
			96 本	D1947L-96RXN

Dinity RapidTip2

精製	精製後の用途	適合するピペット	内容量	カタログ番号
プライマー、ダイマー、ssDNA、dNTP、DNA ポリメラーゼを除去	シークエンス、SNP 解析、マイクロアレイ、TA クローニングなど	一般的なマイクロピペット	8 本	D2947-8RXN
			48 本	D2947-48RXN
			96 本	D2947-96RXN
		Rainin LTS® ピペット	8 本	D2947L-8RXN
			48 本	D2947L-48RXN
			96 本	D2947L-96RXN

サンプルからのダイレクト PCR

Extract-N-Amp（XNA）シリーズ

一般的に、生体サンプルからターゲットの遺伝子を PCR で増幅するとき、生体サンプルを酵素や界面活性剤、物理的な処理などでライセートの状態にしてからゲノム DNA を抽出し、得られた DNA をテンプレートとして PCR が行われます。サンプルがマウスの尾や植物、種子など溶解しにくい材質の場合はライセート化と DNA 抽出に数時間から一晩かかることがあり、ステップが多く時間がかかる作業です。この時間と手間を軽減するため、サンプルから抽出した DNA をそのまま PCR を行うことができるキット Extract-N-Amp（XNA）シリーズが開発されました。例えばマウスの尾から DNA を抽出する場合、従来の方法ではプロテイナーゼ K（ProK）で約 8 時間から一晩かかりますが、XNA シリーズを用いるとわずか 10 分で抽出が完了し、3 分間の熱処理後そのまま PCR 反応のテンプレートとして使用できます。

XNA シリーズは迅速にサンプルからの DNA 抽出と PCR 反応液の作成ができるため、多数の検体で PCR を行うジェノタイピングで特に有用です。哺乳動物組織用、血液用、植物用、種子用があり、多くの研究者に利用されています。

各キットの標準操作

※ 組織・細胞用キットのサンプル量
マウス尾（0.5〜1 cm）、体毛（1本）、
動物細胞（2〜10 mg）、
唾液or口腔粘膜組織（10 µL）

サンプルからのダイレクト PCR

XNA シリーズのキットは抽出溶液、中和溶液、Taq DNA ポリメラーゼを含む 2x PCR 反応ミックスから構成され、製品の種類によってその他の試薬も含まれています。キットに付属する PCR 反応ミックスは通常の透明なタイプ（Extract-N-Amp PCR Reaction Mix）と赤い色素が含まれたタイプ（REDExtract-N-Amp PCR Reaction Mix）から選べます。赤い色素はアガロースゲル電気泳動のトラッキング用色素で、PCR 反応後に電気泳動を行うときに便利です。

さらに、組織用と植物用に SYBR Green が PCR 反応ミックスに含有しているキットがあり、リアルタイム PCR に適しています。

キットまたは単品でご利用いただけます。

キットの名称	付属するPCR反応液	反応液の内容
Extract-N-Amp	Extract-N-Amp PCR Reaction Mix	通常の 2x PCR 反応ミックス
REDExtract-N-Amp	REDExtract-N-Amp PCR Reaction Mix	トラッキング用の赤色素が入った 2x PCR 反応ミックス
SYBR Green Extract-N-Amp	SYBR Green Extract-N-Amp PCR ReadyMix	リアルタイム PCR 用の SYBR Green が入った 2x PCR 反応ミックス

XNA シリーズ　キット製品リスト

対象サンプル	キットの名称	カタログ番号	使用回数
哺乳動物組織用	Extract-N-Amp	XNAT2-1KT	抽出　100 回、PCR 100 回
		XNAT2R-1KT	抽出 1000 回、PCR1000 回
	REDExtract-N-Amp	XNAT-100RXN	抽出　100 回、PCR 100 回
		XNAT-1000RXN	抽出 1000 回、PCR1000 回
	SYBR Green Extract-N-Amp	XNATG-1KT	抽出　100 回、PCR 100 回
		XNATRG-1KT	抽出 1000 回、PCR1000 回
血液用	Extract-N-Amp	XNAB2-1KT	抽出　100 回、PCR 100 回
		XNAB2R-1KT	抽出 1000 回、PCR1000 回
	REDExtract-N-Amp	XNABS-1KT	抽出　10 回、PCR　10 回
		XNAB-1KT	抽出　100 回、PCR 100 回
		XNABE-1KT	抽出　100 回、PCR 500 回
		XNABR-1KT	抽出 1000 回、PCR1000 回
植物用	Extract-N-Amp	XNAP2-1KT	抽出　100 回、PCR 100 回
		XNAP2E-1KT	抽出　100 回、PCR 500 回
	REDExtract-N-Amp	XNAPS-1KT	抽出　10 回、PCR　10 回
		XNAP-1KT	抽出　100 回、PCR 100 回
		XNAPE-1KT	抽出　100 回、PCR 500 回
		XNAPR-1KT	抽出 1000 回、PCR1000 回
	SYBR Green Extract-N-Amp	XNAPG-1KT	抽出　100 回、PCR 100 回
植物種子用	Extract-N-Amp	XNAS2-1KT	抽出　100 回、PCR 100 回
	REDExtract-N-Amp	XNASS-1KT	抽出　10 回、PCR　10 回
		XNAS-1KT	抽出　100 回、PCR 100 回
		XNASR-1KT	抽出 1000 回、PCR1000 回

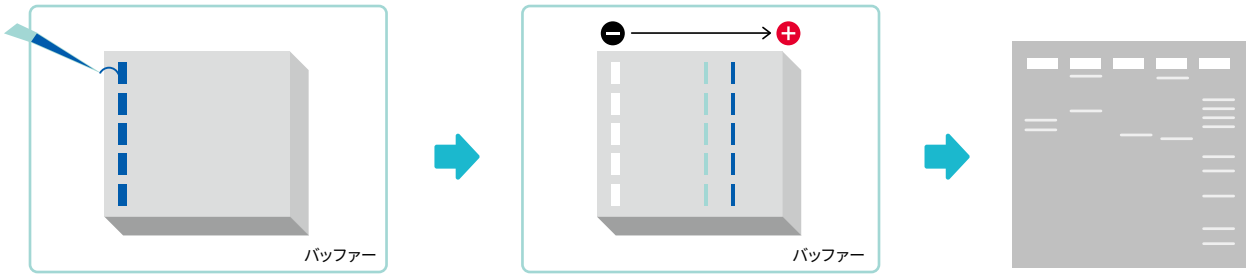
XNA シリーズ　単品リスト

PCR反応液	カタログ番号	反応液の内容
Extract-N-Amp PCR Reaction Mix	E3004	通常の 2x PCR 反応ミックス
REDExtract-N-Amp PCR Reaction Mix	R4775	トラッキング用の赤色素が入った 2x PCR 反応ミックス
SYBR Green Extract-N-Amp PCR ReadyMix	S4320	リアルタイム PCR 用の SYBR GREEN が入った 2x PCR 反応ミックス
Extract-N-Amp PCR ReadyMix for Blood	P8115	血液サンプル用。通常の 2x PCR 反応ミックス

核酸のアガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動は DNA や RNA といった核酸を分離・精製するために用いられる方法です。核酸はリン酸基を持つため負の電荷を帯び、陽極に引き寄せられます。また、アガロースは海藻から得られるポリサッカリドで、一般的に 0.5 ～ 2.0% の濃度で DNA や RNA の電気泳動のゲルとして利用されます。アガロースゲルは核酸の移動に適した孔径の格子状構造をしていて、電気泳動によって核酸はサイズが小さいものほど早く陽極に移動します。



DNAまたはRNAサンプル、分子量マーカーを電気泳動槽にセットしたアガロースゲルにロード

電気泳動槽に電流を流し泳動を行う

エチジウムブロミド（臭化エチジウム）などで染色して観察

必要な試薬

アガロース

- **電気泳動用または分子生物学用グレードのアガロース**（カタログ番号 A9539 など）

1xTAE バッファーまたは 1xTBE バッファー

- **10xTAE バッファー（10x 濃度 トリス - 酢酸 -EDTA バッファー、**カタログ番号 T9650）**を純水で 10 倍希釈**
- **10xTBE バッファー（10x 濃度 トリス - ホウ酸 -EDTA バッファー、**カタログ番号 T4415）**を純水で 10 倍希釈**

ローディングバッファー

- **ローディングバッファー**（カタログ番号 G2526）
  泳動時にサンプルに対して 1:3 ～ 1:6 になるように添加します。

臭化エチジウム（EtBr）溶液（または他の染色用試薬）

- **10 mg/mL 溶液**（カタログ番号 E1510）
  アガロースゲルに臭化エチジウムを入れる場合に便利です。
- **0.5 mg/mL 溶液**（カタログ番号 E1385）

※ 一般的に TAE バッファーは分子量の大きな DNA に適し、TBE バッファーは比較的分子量の小さな DNA の分離に適しています。

アガロースゲルの作成方法例

必要な量のアガロースを秤量します。

ビーカーまたはフラスコに必要量の 1xTAE バッファーを入れ、秤量したアガロースを加えます。
【例】1% アガロースゲルを 200 mL 作成する場合
200 mL の 1xTAE バッファーをフラスコに入れ、2 g のアガロースを加えて軽く混和

アガロースゲルに臭化エチジウム（EtBr）を入れる場合は、最終濃度が 0.5 µg/mL になるように EtBr を添加します。
【例】200 mL のゲル溶液に 10 mg/mL の EtBr 溶液（カタログ番号 E1510 ）を 10 µL 添加

三角フラスコの口を耐熱性のあるラップで覆い、ラップには数箇所穴を開けます。

電子レンジで数分間温め、フラスコを揺すって撹拌します（溶液が泡立たないよう、フラスコを机の上にそって回転させるように揺すります）。
注意）フラスコおよび溶液は非常に熱いので取り扱いには注意してください。

もう一度電子レンジで 1 ～ 2 分間温め、フラスコを揺すって撹拌します。
補足）溶液が透明になるまで繰り返します。

自然に冷まし、50 ～ 55°Cになったらゲル作成用のトレーに静かに流し入れ、コームを挿します。
補足）ゲル溶液の表面に気泡が生じた場合は、マイクロチップやキムワイプの先端で吸い取ります。

ゲルが固まるまで室温で静置します（通常 30 分間～ 1 時間程度）。

固まったゲルはすぐに使用するか、保存する場合は溶媒（この場合は TAE バッファー）と同じ溶液中に一時的に保存します。

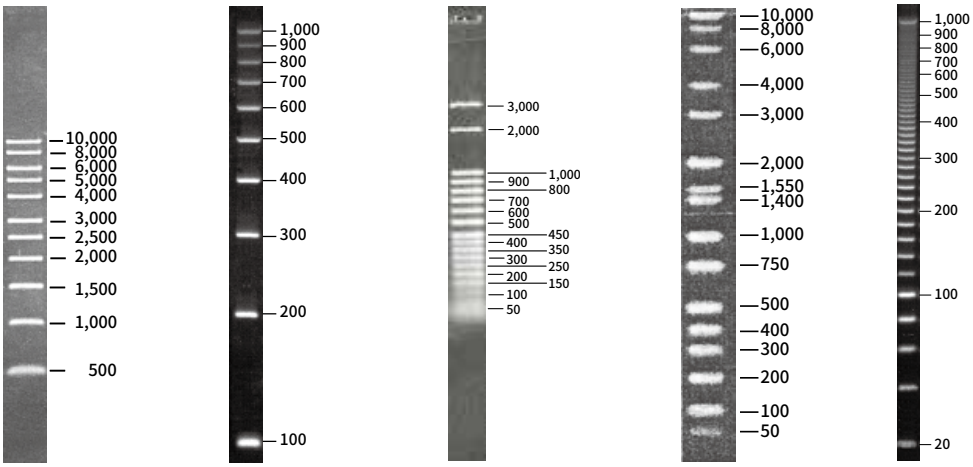
アガロースゲル電気泳動分子量マーカー

アガロースゲル電気泳動では核酸が分子量によって分離され、その分子量を推定するため目的のサンプルと並行してあらかじめ分子量が分かっている分子量マーカーを泳動します。分子量マーカーとしてλ DNA などバクテリオファージ DNA を制限酵素で切断した DNA や 100 bp, 1 kb といった特定のサイズの DNA が複数混合されたもの（ラダーマーカー）が一般的に用いられます。

目的のサンプル DNA の予想されるサイズに応じて DNA 分子量マーカーを選択します。

分子量マーカー	カタログ番号	内容量
1 kb ラダーマーカー	D3937	約 100 回分
100 bp ラダーマーカー	D3687	約 75 回分
50 bp ラダーマーカー	D3812	約 100 回分
広範囲用ラダーマーカー	D7058	約 100 回分
20 bp ラダーマーカー	P1598	約 80 回分

20 bp ラダーマーカーは色素およびローディングバッファー不含の溶液です。
その他のラダーマーカーはそのままローディングできる調製済み溶液です。



アガロースゲル電気泳動後の DNA 抽出

アガロースゲル電気泳動を行った DNA はゲルから回収してクローニングや制限酵素処理などに使用することがあります。
DNA フラグメントを抽出する方法として、シリカメンブレンカラムを利用したキットによる高純度な DNA の精製法やアガロースゲルからスピンカラムによる簡易的な方法があります。

シリカメンブレンカラムによる抽出キット

GenElute™ ゲル抽出キット（カタログ番号 NA1111（70 回分））
- DNA フラグメントを含むアガロースゲルを溶かし、シリカメンブレンカラムを用いて遠心によって DNA を精製
- 通常のアガロースまたは低融点アガロースに使用可能
- 10 µg までの DNA を精製
- 精製した DNA はシークエンス、クローニング、制限酵素処理、ラベリングなどに利用可能

アガロースゲルからの DNA 抽出用スピンカラム

GenElute™ アガローススピンカラム（カタログ番号 56500（70 回分））
GenElute™ マイナス EtBr スピンカラム（カタログ番号 56501（70 回分））
- DNA フラグメントを含むアガロースを切り出し、遠心によって DNA を抽出
- マイナス EtBr スピンカラムは臭化エチジウムを含んだアガロースから臭化エチジウムを除去して DNA を分離
- 100 bp ～ 10 kb の DNA フラグメントを抽出
- 精製した DNA は、クローニング、制限酵素処理、ラベリングなどに利用可能

x-tracta Gel Extraction Tool
カタログ番号 Z722390-100EA（100 個入り）

RNAi

siRNA または miRNA のトランスフェクション

RNAi（RNA 干渉）は自然界で見られる生体メカニズムで、二本鎖 RNA が遺伝子発現を強力に阻害します。RNAi を引き起こす 21 ～ 23 mer の短い二本鎖 RNA 断片は siRNA と呼ばれます。
特定の遺伝子をターゲットにした人工的に作成した siRNA または siRNA が作り出される shRNA（ヘアピン型 RNA）を細胞内に入れることで、結果的にターゲット遺伝子がノックダウンされタンパク質発現の減少が起こります。siRNA の細胞への導入にトランスフェクション試薬が用いられ、shRNA はプラスミドの形でトランスフェクションを行うかウイルス粒子に入れてトランスフェクションを行います。
ここでは siRNA のトランスフェクションのプロトコールを紹介します。shRNA については後のページを参照してください。

使用する試薬

MISSION® siRNA Transfection Reagent（カタログ番号 S1452）

付着細胞へのトランスフェクション（フォワードトランスフェクション法）プロトコール

事前の準備

トランスフェクションの前日に細胞を 30 ～ 50% コンフルエントにする必要があります。
24 ウェルプレートの場合、一般的に 15,000 ～ 35,000 個の細胞をトランスフェクションの 24 時間前に撒きます。
その他の場合の目安は表 1 をご覧ください。

使用する siRNA の最適濃度を決めるために、最終濃度として 1 ～ 30 nM の範囲でテストすることが推奨されます。
24 ウェルプレートの場合、siRNA が 10 nM 以下ではトランスフェクション試薬は 1 ～ 3 µL、siRNA が 10 nM より高濃度ではトランスフェクション試薬は 2 ～ 4 µL が推奨されます。その他の場合の目安は表 1 をご覧ください。

以下は 24 ウェルプレートで最終濃度 5 nM の siRNA を用いるときのプロトコールです。1 ウェルあたりの量を示しています。

1. まず 3 ピコモルの siRNA duplex を血清を含まない培地 100 µL で希釈します。
2. トランスフェクション試薬（カタログ番号 S1452）2 µL を手順 **1** の siRNA 溶液 100 µL に添加し、すぐに混ぜます。
3. 混ぜてから 10 ～ 15 分間、室温でインキュベートします。（1 時間以内に手順 **5** に進んでください）
4. インキュベーション中に前培養した細胞から培地を除去し、あらかじめ温めた新しい培地（血清を含む）を 500 µL 入れてください。トランスフェクション時に抗生物質が含まれていても構いません。
5. 手順 **3** で準備したトランスフェクション試薬と siRNA の混合液を **4** の細胞に添加し、穏やかに揺り動かすようにして混ぜます。ここで最終液量は 600 µL になります。
6. トランスフェクションした細胞を細胞培養用インキュベーターでインキュベートします。一般的にトランスフェクションから 24 ～ 96 時間後に遺伝子発現抑制の効果を測定します。
7. より長時間インキュベートする場合は、適宜培地を交換します。

表 1. 付着細胞のトランスフェクション条件

プレートのウェル数	前培養時の播種細胞数	前培養の培地量	siRNA duplex（ピコモル）	トランスフェクション試薬（siRNA 1～10 nM の場合）	トランスフェクション試薬（siRNA >10 nM の場合）	トランスフェクション混合液の量	トランスフェクション時に入れる培地量
384	1,250-3,750	0.1 mL	0.5	0.25-0.6 µL	0.35-0.75 µL	25 µL	63 µL
96	2,500-7,500	0.2 mL	1	0.5-1.2 µL	0.7-1.5 µL	50 µL	125 µL
24	15,000-35,000	1 mL	3	1-3 µL	2-4 µL	100 µL	500 µL
12	30,000-70,000	2 mL	7	2-6 µL	4-8 µL	200 µL	1 mL
6	100,000-200,000	4 mL	12	6-10 µL	8-16 µL	200 µL	2 mL

付着細胞へのトランスフェクション（リバーストランスフェクション法）プロトコール

リバーストランスフェクション法ではトランスフェクションと細胞播種は同じ日に行います。siRNA とトランスフェクション試薬の混合液を準備し、細胞を入れる前の各ウェルに分注します。細胞は希望する濃度に希釈して、siRNA とトランスフェクション試薬の混合液が入っているウェルに添加します。それぞれの細胞数とプレートサイズは表 2 をご覧ください。

以下は 96 ウェルプレートで siRNA の最終濃度 10 nM でトランスフェクションする場合のプロトコールです。

1. トランスフェクション試薬（カタログ番号 S1452）1 µL を各ウェルに入れます。
   オートディスペンサーを用いる場合、トランスフェクション試薬と水を 1:5 で希釈し、各ウェルに 5 µL 入れます。
   希釈したトランスフェクション試薬は 24 時間以内に使用してください。
2. 次に 150 ピコモルの siRNA duplex を血清を含まない培地 5 mL で希釈してマスターミックスを準備します。
3. 手順 **2** のマスターミックス 50 µL を手順 **1** の各ウェルに添加します。
4. ボルテックスして 10 秒間混ぜ、10 ～ 15 分間インキュベートします。（1 時間以内に手順 **5** に進んでください）
5. 細胞を 7,500 個含んでいる完全培地 100 µL を手順 **4** の各ウェルに添加し、プレートを穏やかに揺り動かすように混ぜます。
   ここで 1 ウェルあたり 150 µL で siRNA の最終濃度は 10 nM になります。
6. トランスフェクションした細胞を細胞培養用インキュベーターでインキュベートします。一般的にトランスフェクションから 24 ～ 96 時間後に遺伝子発現抑制の効果を測定します。より長時間インキュベートする場合は、適宜培地を交換します。

表 2. 付着細胞のトランスフェクション条件（リバーストランスフェクション法）

プレートのウェル数	細胞数	培地量
384	1,500-2,500	50 µL
96	5,000-10,000	125 µL
48	10,000-20,000	250 µL
24	30,000-50,000	500 µL

siRNA の配列について

ターゲットの遺伝子のノックダウンは siRNA の配列によって効率が異なります。
配列を決めてカスタムの RNA をオーダーして作成することもできますが、あらかじめ理論的にノックダウン効率の高い配列がデザインされた siRNA が市販されています。

siRNA の配列

自分で決めた配列の siRNA を使いたい → **カスタム RNA をオーダー**
www.sigmaaldrich.com/japan/lifescience/custom-products/custom-oligos.html

デザインされた siRNA を使いたい → **カタログ品から選んでオーダー**
www.sigmaaldrich.com/missionsirna-jp

MISSION プレデザイン siRNA
（ヒト、マウス、ラットの遺伝子から検索できます）

shRNA レンチウイルスによるノックダウン

ヘアピン型 RNA（shRNA）発現プラスミドベクターは導入された細胞内で解離して siRNA となり、ターゲット特異的な遺伝子の発現を抑制します。shRNA ベクターはプラスミド DNA の形状でも細胞にトランスフェクションすることができますが、ウイルス粒子（ウイルスパーティクル）に封入することで細胞への導入効率が向上し、siRNA の安定発現を行うこともできます。

MISSION® shRNA（Sgima）は各ターゲット特異的にデザインされた配列を持ち、レンチウイルスパーティクルに封入された shRNA も利用することができます。

shRNA レンチウイルスパーティクルによるノックダウンプロトコール

1 日目

1. トランスフェクションの 24 時間前に哺乳動物細胞をプレートに撒いて培養。
2. トランスフェクションは 50 ～ 80%コンフルエントで行います。

2 日目

1. ウイルスパーティクルストックを氷上に出してゆっくり解凍。
2. Hexadimethrine bromide※を細胞に添加（最終濃度 8 µg/mL）して振とう。
   ※ トランスフェクション効率を高めるために加えます。（ただし、神経細胞の初代培養などには不適）
3. 適した量（MOI）のウイルスパーティクルを添加※して振とう。
   ※ 初めての場合は、いくつかの Multiplicity Of Infection（MOI）を試します（MOI = 0.5 ～ 20 など）
   ※ MOI：細胞に対するウイルス粒子の個数
   （1 ウェル中の全細胞数）x（目的の MOI）=（必要な TU）
   （必要な TU）/（CoA に書かれている TU/mL） =（1 ウェルあたりのレンチウイルス shRNA 溶液の添加量）
4. 37℃で一晩インキュベート。
   ※ 一晩のインキュベートで細胞毒性が生じる場合は、4 時間インキュベーションを行った後に培地交換。

3 日目

1. ウイルスパーティクルを含む培地を除去。
2. 新しい培地に交換。

4 日目

a. トランジェント（一過性発現）で実験する場合：
   細胞を回収して qRT-PCR などでノックダウン効率を検証します。
b. ステーブル（安定発現）で実験する場合：
   培地を適当量のピューロマイシンを含む培地に交換。（方法は下記）
   細胞により至適濃度は異なりますが、1 ～ 10 µg/mL が標準的です。

5 日目以降（ステーブルの場合のみ）

3 ～ 4 日ごとに培地を適当量のピューロマイシンを含む培地に交換。（一般的に 10 ～ 12 日後くらいでクローンが確立）
5 クローン以上をピックしてノックダウン効果を検証します。

ピューロマイシンによるセレクション

1. 96 穴プレート各ウェルに $1.6x10^4$ 細胞 と 120 µL の培地を用意します。
2. 次の日に 1 ～ 10 µg/mL となるようピューロマイシンを分注します。
3. 2 日後に生細胞を調べます。
4. 3 日間ごとにピューロマイシン入りの培地に交換し、3 ～ 14 日間培養し、最適な選択期間を検討します。

抗生物質（ピューロマイシン）濃度の最適化

MISSION shRNA ベクターはピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んであるため、shRNA が導入された細胞をピューロマイシンでセレクションすることができます。
使用する細胞により最適な抗生物質の濃度は異なります。初めて使用する細胞などで適切な抗生物質濃度が分からない場合は、本実験前にタイトレーションによる検討を行い、細胞ストレスを低減するためにできる限り低濃度で、かつ効率の高い抗生物質濃度を決定しておく必要があります。多くの場合、shRNA ベクターが導入されていない細胞は 1 ～ 10 µg/mL の濃度で死滅します。

必要な試薬と機器

- **ピューロマイシン溶液**（カタログ番号 P9620）
- **DMEM + 10% FCS など各々の細胞に適した培地**
- **培養用インキュベーター**
- **6 ウェルプレート**

プロトコール

前日

1. プレートの各ウェルへ、24 時間後に細胞密度が 50%コンフルエントになるよう細胞を播種。（例 2 x 10^5 cell/well）
2. 一晩インキュベートします。

1 日目

3. 培地を 37°Cに温めておきます。
4. ピューロマイシンの希釈系列を、培地を用いて調製します。
   （例 それぞれ 0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 µg/mL の濃度になるようにピューロマイシンを培地に添加します）
5. 前日から培養している細胞の培地を上記で用意したピューロマイシンを含む培地（選択培地）に交換。
6. それぞれのウェルの生細胞数を測定します。

3 ～ 10 日目

7. 2日ごとに選択培地に交換し、死細胞を除去。
8. 2日ごとに生細胞数を測定します。

10 日目

9. 細胞の死滅曲線を描き、選択培地で培養した 7 ～ 10 日の間に細胞が 100%死滅したピューロマイシン濃度を調べます。

備考

- ピューロマイシン溶液の凍結融解は最小限にとどめ、選択培地は用事調製します。
- 10 µg/mL 以上のピューロマイシン濃度が必要であった場合、ピューロマイシンの使用期限を確認。

参考　各細胞に対するピューロマイシン濃度の使用例

HeLa 細胞：	3 µg/mL
HEK293 細胞：	3 µg/mL
B16 細胞：	1 ～ 3 µg/mL
PC1.0 細胞：	10 µg/mL
A431 細胞：	1 µg/mL
Jurkat 細胞：	4 µg/mL

shRNA レンチウイルスの感染効率評価方法

使用する細胞によりレンチウイルスの感染効率は異なるため、初めて使用する細胞などで適切な条件が分からない場合は、本実験前にタイトレーションによる条件検討を行い、最適な感染多重度 Multiplicity Of Infection（MOI）を決定しておく必要があります。MISSION TurboGFP ™ レンチウイルスコントロール（カタログ番号 SHC003V）を用いることで、簡便に最適な MOI を決定することが可能です。

TurboGFP コントロールで用いられている CMV プロモーターは、幹細胞、リンパ球、初代神経細胞などで発現活性があまり高くないことが知られていて、これらの細胞から得られる GFP シグナルが減少するため、感染効率を実際よりも低く見積もってしまう場合があります。この場合、限外希釈法を用いる必要があります。

必要な試薬と機器

- **TurboGFP レンチウイルスコントロール**（カタログ番号：SHC003V）
- **臭化ヘキサジメトリン**（カタログ番号：H9268）**または硫酸プロタミン**（カタログ番号：P3369）
- **培地**
- **培養用インキュベーター**
- **蛍光顕微鏡および GFP 用フィルター**

プロトコール

前日

1. プレートの各ウェルへ、24 時間後に細胞密度が 50%コンフルエントとなるよう細胞を播種。
2. 一晩インキュベートします。

1 日目

3. TurboGFP レンチウイルスコントロール（カタログ番号 SHC003V）を室温にて溶解。
4. チューブを指で軽く弾いて混ぜ、氷上に置きます。
5. コントロールの段階希釈系列（10 倍希釈）を調製し、各ウェルへ添加し振とうして混ぜます。
6. 臭化ヘキサジメトリンまたは硫酸プロタミンを最終濃度 8 µg/mL となるように添加し振とうして混ぜます。
7. 18 ～ 20 時間インキュベート。

2 日目

8. 培養している細胞の培地を交換し、ウイルスを含む培地を除去。
9. さらに 24 ～ 48 時間インキュベートし、GFP を十分発現させます。多くの場合、TurboGFP は感染後 72 時間後に強い発現が見られます。

3 ～ 5 日目

10. 蛍光顕微鏡下で観察し、TurboGFP 発現細胞の割合が最も高い条件を決定します。

感染多重度 Multiplicity Of Infection（MOI）算出式

$$\text{MOI} = \frac{\text{ウイルスタイター（TU/mL）} \times \text{容量（mL）}}{\text{細胞数}}$$

その他プロトコール
sigma.com/shrnaprotocol-jp

microRNA 抽出

マイクロ RNA（microRNA, miRNA）はおよそ 21 のヌクレオチドの RNA のことを示し、翻訳抑制や mRNA 切断、脱アデニル化などによって遺伝子発現を抑制します。

ここでは便利なキットを用いた哺乳動物の細胞培養からの miRNA 抽出方法を紹介します。動物組織や植物、酵母、微生物からの抽出は弊社ウェブ上の製品プロトコール（BULLETIN）でご覧いただけます。

mirPremier ™ microRNA Isolation Kit

細胞や組織から短時間でシンプルに高品質の miRNA を得ることができ、多くの研究に使用されます。
- 多くの動物種から高品質の miRNA を抽出可能
- 短時間（約 30 分）で抽出
- 有害な有機溶媒は不要

哺乳動物の培養細胞からのマイクロ RNA 抽出プロトコール

キット mirPremier ™ microRNA Isolation Kit

カタログ番号 SNC10　10 回分
カタログ番号 SNC50　50 回分

キット以外に必要な試薬

2- メルカプトエタノール（カタログ番号 M3148）
100% エタノール
2 mL マイクロ遠心チューブ
（オプション On-Column DNase I Digestion Set（カタログ番号 DNASE10, DNASE70））
（オプション DNase I, Amplification Grade（カタログ番号 AMPD1））

事前の準備

キットの Wash Solution 2 Concentrate を 100% エタノールで希釈します。SNC10 キットの場合、エタノール 10 mL で希釈、SNC50 キットの場合、エタノール 60 mL で希釈。

手順

1. キットの microRNA Lysis Buffer（カタログ番号 M1070）700 µL と Binding Solution（カタログ番号 L8042）300 µL を新しいチューブに入れて混ぜます。さらに 10 µL の 2- メルカプトエタノール（別売）を添加して混ぜます。混合液は室温に置き、当日中に使用します。microRNA Lysis Buffer と Binding Solution を 5:5 で混ぜると付着細胞で収率が向上することがあります。

2. 細胞の種類によって手順を選んでください。

   【浮遊細胞の場合】
   300 x g 以上で 5 分間遠心してペレット化して上清を捨てます。再び軽く遠心して上清をできるだけ完全に取り除きます。

   【付着細胞の場合】
   培地を除去し、ハンクス緩衝塩溶液で細胞を洗浄します。洗浄した溶液はできるだけ完全に取り除きます。

3. 細胞の種類によって手順を選んでください。

   【浮遊細胞の場合】
   細胞数に応じて表 2 に書かれた量のリシス混合液（手順 **1** で調製した混合液）を用います。準備した細胞を 1 ～ 2 秒間ボルテックスして緩めてから、表 2 の量のリシス混合液を添加し、すぐに穏やかに 2 ～ 3 秒間ボルテックスします。5 分以上経過後、2 ～ 3 回穏やかにシェイクして混合します。ゲノム DNA が混ざる可能性があるのでボルテックスは行わないでください。細胞溶解液を新しい 2 mL マイクロ遠心チューブ（別売）に移し入れます。

   【付着細胞の場合】
   培養サイズに応じて表 2 に書かれた量のリシス混合液（手順 **1** で調製した混合液）を用います。リシス混合液を細胞サンプルに添加し、溶液が細胞表面にいきわたるように揺らします。 5 分以上経過後、2 ～ 3 回穏やかに揺り動かして混合します。細胞溶解液を新しい 2 mL マイクロ遠心チューブ（別売）に移し入れます。細胞の破片が混ざっていても構いません。

表 2. リシス溶液の量

サンプル	細胞数または培養容器	用いるリシス混合液の量
浮遊細胞のペレット	0.1-0.5 x 10^6	50-100 µL
	0.6-1 x 10^6	200 µL
	2 x 110^6	250 µL
	3 x 10^6	300 µL
	4 x 10^6	400 µL
	5 x 10^6	500 µL
	6 x 10^6	600 µL
	7 x 10^6	700 µL
付着細胞	24 well プレート	150 µL/well
	12 well プレート	200 µL/well
	6 well プレート	300 µL/well
	25 cm^2 フラスコ、<50% コンフルエント	500 µL/ フラスコ
	25 cm^2 フラスコ、50-70% コンフルエント	600 µL/ フラスコ
	25 cm^2 フラスコ、80-100% コンフルエント	700 µL/ フラスコ

4. 手順 **3** で回収した細胞溶解液を最大速度（14,000 ～ 16,000 x g）で 5 分間遠心し、細胞破片やゲノム DNA、ラージ RNA をペレット状にします。ペレットを崩さないようにしながら上清を新しい 2 mL Collection Tube（付属）に移します。ペレットが緩い場合はさらに 3 ～ 5 分間遠心するか、キットの Filtration Column で上清をろ過します。

5. 手順 **4** で得た上清の液量をピペットで測り、細胞溶解液の 1.1 倍量の 100% エタノールを添加（例 溶解液が 500 µL の場合、100% エタノールを 550 µL 添加）し、すぐにボルテックスまたは転倒して完全に混合します。HeLa 細胞の場合、エタノールを 1.5 倍量にすると収量が向上します。

6. 手順 **5** の混合液 700 µL をキットの Binding Column（赤色リング）に入れ、最大速度（14,000 ～ 16,000 x g）で 30 秒間遠心します。流出液はデカントして捨てます。残りの混合液も同じカラムで同様に行います。

7. カラムに 100% エタノールを 700 µL 入れ、最大速度（14,000 ～ 16,000 x g）で 30 秒間遠心します。

8. カラムを新しい Collection Tube（付属）に差し込み、事前に準備したエタノール希釈の Wash Solution 2 を 500 µL カラムに入れ、最大速度（14,000 ～ 16,000 x g）で 30 秒間遠心します。流出液を捨てて、同じ Collection Tube をまたカラムに差し込みます。

9. また同様にエタノール希釈の Wash Solution 2 を 500 µL カラムに入れ、最大速度（14,000 ～ 16,000 x g）で 30 秒間遠心します。流出液を捨てて、同じ Collection Tube をまたカラムに差し込みます。

10. カラムを最大速度（14,000 ～ 16,000 x g）で 1 分間遠心して乾かします。コレクションチューブに付いている流出液がカラムに付かないよう気をつけながらカラムをチューブから外します。

11. カラムを新しい Collection Tube（付属）に差し込み、50 µL の Elution Solution（付属）をカラム内のフィルター中央付近に落とし入れます。もし使用した細胞が少ない場合や高濃度で回収したい場合は Elution Solution を 20 ～ 30 µL に減らします。フタを閉めて最大速度（14,000 ～ 16,000 x g）で 1 分間遠心して溶出します。溶出液をピペットで回収し、それを再び同様にカラムに入れます。フタを閉めて最大速度（14,000 ～ 16,000 x g）で 1 分間遠心してさらに溶出します。この溶出液に精製された RNA が含まれています。すぐに使用するか -20°Cで短期間保存、または -70°Cで長期間保存できます。

microRNA 定量の流れ

microRNA の定量では、cDNA に変換して、その cDNA をリアルタイム PCR（qPCR）で測定する方法が一般的に行われています。

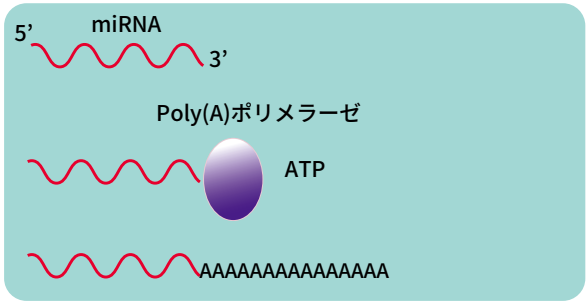
生体サンプルから得られる microRNA は通常ポリアデニル化されていないため、poly（A）ポリメラーゼで microRNA に poly（A）を付加します。次に、poly（A）に対して oligo-dT アダプタープライマーを用いて microRNA にポリ A 鎖とアダプターを付加した cDNA を合成します。合成した cDNA をリアルタイム PCR で測定します。その際、付加した oligo-dT アダプタープライマーはリアルタイム PCR でリバースプライマーが結合する場所として利用されます。

目的の microRNA に対するプライマーと付加した oligo-dT アダプタープライマーに対するプライマーを用いてリアルタイム PCR 反応を行ってターゲットの microRNA の定量を行います。

シグマ アルドリッチの MystiCq™ microRNA cDNA Synthesis Mix（カタログ番号 MIRRT）は microRNA からの一本鎖 cDNA 合成および、その cDNA に対するリアルタイム PCR 反応用の試薬が含まれています（ターゲット microRNA のプライマーは別売）。

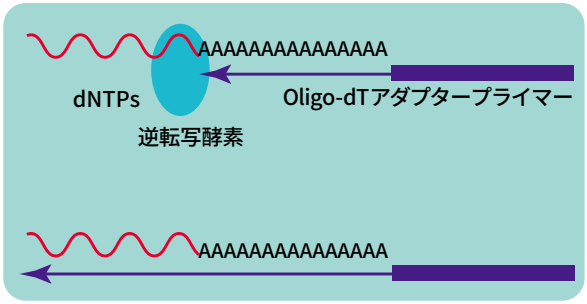
1. microRNA（miRNA）抽出し、Poly-A を付加

必要なキット
mirPremier ™ microRNA Isolation Kit（カタログ番号 SNC10、SNC50）



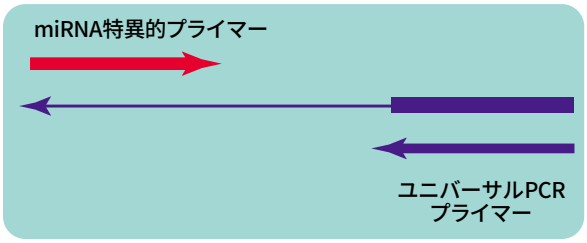
2. アダプターが付いた olig-dT プライマーと逆転写酵素で cDNA 作成

必要なキット
MystiCq™ microRNA cDNA Synthesis Mix（カタログ番号 MIRRT）



3. ターゲット miRNA を定量（リアルタイム PCR）

必要な試薬
ターゲットの microRNA に対するプライマー
MystiCQ Universal PCR primer（カタログ番号 MIRRT キットに付属）
MystiCq™ microRNA ™ SYBR® qPCRReadyMix ™（カタログ番号 MIRRT キットに付属）



microRNA の定量

microRNA の定量　cDNA の合成からリアルタイム PCR

MystiCq™ microRNA cDNA Synthesis Mix（カタログ番号 MIRRT）は microRNA からの一本鎖 cDNA 合成および、その cDNA に対するリアルタイム PCR 反応用の試薬が含まれているキットです（ターゲット microRNA のフォワードプライマーは別売）。

MystiCq™ microRNA cDNA Synthesis Mix（カタログ番号 MIRRT）に含まれている試薬
- Poly（A）Tailing Buffer（5X）, MIRRT01
- Human Positive Control Primer, MIRRT02
- Nuclease-free water, MIRRT03
- MystiCq Universal PCR Primer, MIRRT04（または単品としてカタログ番号 MIRUP）
- Poly（A）Polymerase, MIRRT05
- MystiCq microRNA cDNA Reaction Mix, MIRRT06
- ReadyScript Reverse Transcriptase, MIRRT07

本キットに使用する目的の microRNA に対するプライマーは MystiCq microRNA qPCR Assay Primer シリーズとして各 microRNA 特異的にデザインしたプライマーを販売しています。

cDNA の合成プロトコール

Poly（A）鎖の付加

1. キットの Poly（A）Tailing Buffer（5X）、Nuclease-free water と目的の RNA（total RNA または mincrRNA が多く含まれる RNA サンプル）を融解し氷上に置きます。
   各溶液はタッピングなどで混ぜて、軽く遠心してチューブの底に溶液を集めておきます。
2. 下表の量を 0.2 mL マイクロチューブまたは 96 ウェルプレートに入れます。

試薬	量
Poly（A）Tailing Buffer（5X）	2 µL
RNA（1 µg 以下）	7 µL 以下
Nuclease-free water	合計 10 µL になる量
Poly（A）Polymerase	1 µL
合計	**10 µL**

3. フタを閉め、穏やかにボルテックスして混ぜて、軽く遠心してチューブまたはウェルの底に溶液を集めておきます。
4. 37°Cで 60 分間※、続けて 70°Cで 5 分間インキュベートします。
   ※ Total RNA が 100 ng 以下の場合、37°Cのインキュベーション時間を 20 分間に変更します。
5. 軽く遠心してチューブまたはウェルの底に溶液を集めておきます。次に行う cDNA 合成反応まで氷上に静置します。

一本鎖 cDNA 合成

下表の量を調製します。

試薬	量
Poly（A）付加したサンプル RNA（上記手順で得た反応液）	10 µL
MystiCq microRNA cDNA Reaction Mix	9.0 µL
ReadyScript Reverse Transcriptase	1.0 µL
合計	**20 µL**

6. フタを閉め、穏やかにボルテックスして混ぜて、軽く遠心してチューブまたはウェルの底に溶液を集めておきます。
7. 42°Cで 20 分間※、続けて 85°Cで 5 分間インキュベートします。
   ※ RT 反応はセンシティビティを落とさずバックグランドを低減させるため 45°Cで行うこともできます。
8. 必要に応じて得られた cDNA サンプルを水または長期保存する場合は TE バッファーで希釈します。希釈した cDNA 溶液は 4°Cで数ヶ月、-20°Cで長期間保存可能です。

リアルタイム PCR

前述の手順で microRNA から合成した cDNA について、目的の microRNA のプライマーと MystiCq ユニバーサル PCR プライマーを用いてリアルタイム SYBR® Green RT-qPCR 反応によって目的の microRNA の定量を行います。
目的の microRNA に対するプライマーは MystiCq microRNA qPCR Assay Primer シリーズとして各 microRNA 特異的にデザインしたプライマーを販売しています。本キット（MystiCq microRNA cDNA Synthesis Mix　カタログ番号 MIRRT）に付属している MystiCq Universal PCR Primer は cDNA 合成の際に付加した oligo-dT アダプターに特異的に結合します。

リアルタイム SYBR Green RT-qPCR 反応は上記のプライマー各 200 nM を用い、使用している装置に応じて本キットに付属している MystiCq microRNA SYBR Green qPCR ReadyMix を利用することができます。装置によって適切な酵素は異なりますので、下表をご参照ください。

本キットに付属している MystiCq microRNA SYBR Green qPCR ReadyMix はポリメラーゼに抗体が結合したホットスタート用 Taq DNA ポリメラーゼを使用しているため PCR 反応の最初の変性ステップ前に酵素を不活性化した状態を保てます。熱処理（95°C、2 分間）によって抗体が非可逆的に変性して、ポリメラーゼ活性が得られます。このことによって PCR 反応液の調製（プライマーを混合）が常温で行うことができます。

プライマーについて

SYBR Green I 色素によるリアルタイム PCR では高い特異性を持つようデザインされたプライマーを使うことが成功につながります。シグマ アルドリッチでは様々な microRNA に特異的にデザインされたプライマーをご用意しています。

製品	カタログ番号	製品情報
MystiCq microRNA qPCR assay primer	MIRAP00001 から MIRAP01434※	ヒト、マウス、ラットの各 microRNA に特異的な配列（種間でクロス反応の可能性あり）
MystiCq microRNA qPCR control primer	MIRCP00001 から MIRCP00016	コントロール用
MystiCq Universal PCR primer	MIRUP	cDNA 合成時に付加されたアダプターに結合

※ ウェブサイト sigma.com/mysticq で全製品のリストをご覧いただけます

増幅サイズについて

MystiCq™ microRNA™ SYBR® Green qPCR ReadyMix ™は 400 ～ 500 bp までのフラグメントを増幅することができますが、最も良い結果が得られるのは 80 ～ 200 bp です。
最適なプライマー濃度は 100 ～ 500 nM です。各プライマーの最終濃度 300 nM が最も効果的な結果が得られます。

反応液の準備について

反応液のカクテル（マスターミックス）を準備することでピペッティングによるエラーを低減し、正確なアッセイを行うことができます。サンプル DNA テンプレート（cDNA またはゲノム DNA）以外の必要なコンポーネントを混ぜた反応液カクテルを作成し、各反応用のチューブに分注します。分注したチューブにサンプル DNA を添加し、反応に進みます。添加するサンプル DNA を 5 ～ 10 µL にすると正確にアッセイされやすくなります。

サンプル DNA テンプレートについて

推奨されるテンプレートの使用量
cDNA の場合　スタートの total RNA として 1 ～ 100 ng
ゲノム DNA の場合 100 pg ～ 100 ng

リアルタイム PCR プロトコール

下表の組成で反応液ミックスを作成します。添加する cDNA の量は microRNA の発現レベルに応じて調節します。まずは total RNA として 1 ng から行うことが推奨されます。あらかじめ microRNA の発現レベルが低い場合は 10 ng の total RNA に相当する量を用います。
1 反応あたりの反応液ミックス使用量は 20 ～ 25 µL です。下表の量を参考にして必要な量を算出してください。
各溶液をチューブに入れ、フタを閉めてから穏やかにボルテックスして混ぜます。軽く遠心して溶液をチューブの底に集めます。

反応液ミックス

試薬	量
MystiCq microRNA SYBR Green qPCR ReadyMix（2X）	25 µL
MystiCq microRNA qPCR Assay Primer（10 µM）	1.0 µL
MystiCq Universal PCR Primer（10 µM）	1.0 µL
microRNA から作成した cDNA（0.1 – 10 ng）	必要量
Nuclease-free water	合計 50 µL になるように調製
合計	**50 µL**

下記の 2 ステップまたは 3 ステップの PCR パラメーターで PCR を行います。

2 ステップ法（推奨）

活性化	95°C	2 分間
以下を 40 サイクル		
変性	95°C	5 秒間
アニール	60°C	30 秒間

3 ステップ法（オプション）

活性化	95°C	2 分間
以下を 40 サイクル		
変性	95°C	5 秒間
アニール	60°C	15 秒間
伸長	70°C	15 秒間

2 ステップ法でやや高いアニーリング温度（63°C）で行うと特異性が向上することがあります。融解曲線分析を行うこともあります。多くの microRNA RT qPCR 反応は、2 種類の遺伝子特異的プライマーを用いるのと比べ、poly（A）鎖内でのわずかなヘテロジェネティによってややブロードの融解ピークが見られることがあります。

リアルタイム PCR 用の酵素反応液適合表

	MystiCq™ microRNA™ SYBR® qPCR ReadyMix™	MystiCq™ microRNA™ SYBR qPCR ReadyMix Low ROX™	MystiCq™ microRNA™ SYBR qPCR ReadyMix™ with ROX™	MystiCq™ microRNA™ SYBR qPCR ReadyMix™
	カタログ番号 MIRRM00	カタログ番号 MIRRM01	カタログ番号 MIRRM02	カタログ番号 MIRRM03
Applied Biosystems 5700			○	
Applied Biosystems 7000			○	
Applied Biosystems 7300			○	
Applied Biosystems 7500		○		
Applied Biosystems 7500 Fast		○		
Applied Biosystems 7700			○	
Applied Biosystems 7900			○	
Applied Biosystems 7900 HT Fast			○	
Applied Biosystems 7900HT			○	
Applied Biosystems StepOnePlus ™			○	
Applied Biosystems StepOne ™			○	
Applied Biosystems ViiA 7		○		
Bio-Rad CFX384 ™	○			
Bio-Rad CFX96 ™	○			
BioRad iCycler iQ ™				○
BioRad iQ ™ 5				○
Bio-Rad MiniOpticon ™	○			
BioRad MyiQ ™				○
Bio-Rad/MJ Chromo4 ™	○			
Bio-Rad/MJ Opticon 2	○			
Bio-Rad/MJ Opticon®	○			
Cepheid SmartCycler®	○			
Eppendorf Mastercycler® ep realplex	○			
Eppendorf Mastercycler® ep realplex2 s	○			
Illumina Eco qPCR	○			
Qiagen/Corbett Rotor-Gene® 3000	○			
Qiagen/Corbett Rotor-Gene® 6000	○			
Qiagen/Corbett Rotor-Gene® Q	○			
Roche LightCycler® 480	○			
Stratagene Mx3000P ™		○		
Stratagene Mx3005P ™		○		
Stratagene Mx4000 ™		○		

遺伝子導入

プラスミドの選択

分子生物学では細胞に遺伝子を導入するためのツールとしてプラスミドベクターが用いられています。遺伝子過剰発現あるいはノックダウン、ノックアウトを行うベクターや組み換えタンパク質発現用のベクターなど用途に応じて様々なベクターが開発されてきました。ここでは組み換えタンパク質発現に関するプラスミドベクターについて紹介します。

組み換えタンパク質発現はベクターの種類だけではなく、導入する細胞も様々な生物で確立されています。大腸菌などのバクテリア、酵母、昆虫、哺乳動物細胞といった発現系システムがあり、細胞の培養や維持のしやすさ、成長速度、また発現させるタンパク質の量によってプラスミドベクターと使用する細胞の種類を考える必要があります。また哺乳動物のタンパク質は翻訳後修飾を受けているため、目的の組み換えタンパク質に翻訳後修飾が必要かどうかも考慮します。

発現システム	メリット	デメリット
大腸菌 E. coli	迅速な増殖と発現 安価 スケールアップしやすい 遺伝子的知見が多い	真核細胞で見られる翻訳後修飾がない タンパク質によって正しい立体構造を取らない 分泌されるタンパク質が少ない
酵母 S. cerevisiae	比較的迅速な増殖と発現 分泌タンパク質、細胞内タンパク質に利用できる 安価 多くのタンパク質は立体構造を取り、翻訳後修飾される	N- 結合型グリカンの特性が一般的な哺乳動物タンパク質と比較しにくい 酵母の分泌シグナルペプチドが必要 安全性に注意が必要
バキュロウイルス - 昆虫細胞	比較的迅速な増殖と発現 分泌タンパク質、膜タンパク質、細胞内タンパク質に利用できる 多くのタンパク質は立体構造を取り、翻訳後修飾される	N- 結合型グリカンの特性が一般的な哺乳動物タンパク質と比較しにくい 高価 安全性に注意が必要 スケールアップが難しい
哺乳動物細胞（一過性発現）	比較的迅速な増殖と発現 分泌タンパク質、膜タンパク質に利用できる ほぼすべてのタンパク質は立体構造を取り、翻訳後修飾される	高価 細胞内タンパク質発現の収量が低い スケールアップが難しい
哺乳動物細胞（安定発現）	分泌タンパク質、膜タンパク質に利用できる ほぼすべてのタンパク質は立体構造を取り、翻訳後修飾される	高価 細胞内タンパク質発現の収量が低い スケールアップが難しい 発現までの時間が長い

発現させる組み換えタンパク質の検出や精製を行うため、組み換えタンパク質にタグを付けて発現させることが一般的に行われます。目的の遺伝子の前後あるいは中にタグの遺伝子配列を組み込んだプラスミドベクターを発現することでタグを融合させたタンパク質発現が起こります。タンパク質発現用のタグとして FLAG やポリヒスチジン（6xHis など）、HA、GST、蛍光タンパク質の GFP など様々なタグが市販されています。

その中でも FLAG タグは 8 アミノ酸残基があり、検出や精製の特異性が高いことなどから組み換えタンパク質の精製によく用いられます。FLAG タグ発現のベクターとして大腸菌、哺乳動物用のプラスミドベクターをシグマ アルドリッチでは以前から取り扱っています。さらにその他のタグのタンパク質発現用のベクターの取り扱いを始めました。

遺伝子組み換えタンパク質を用いた研究では、目的の遺伝子を複数の種類のプラスミドベクターに組み込んで検討や実験を行うことがよくあります。多くの場合、他のプラスミドベクターに移すときそれらの骨格の違いによって制限酵素サイトが異なるなど、目的の遺伝子の一部を変更する作業が必要になりコストもかかります。もし目的の遺伝子配列をそのまま他のプラスミドベクターに入れ換えることができれば効率的に実験を進められます。

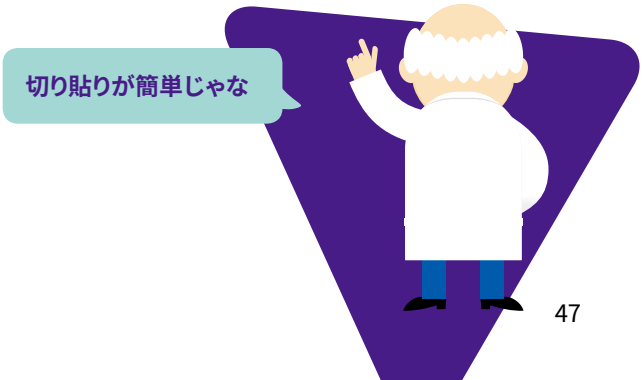
SnapFast ™プラスミドベクターシリーズ（Oxford Genetics 社）は約 1000 種類以上のベクターが用意されていますが、それらのコアの骨格が同様なため、SnapFast ベクターに導入した目的の遺伝子配列を同じ制限酵素で切断し、そのまま他の SnapFast ベクターに移し入れることができます。

入れ換え簡単 SnapFast ベクター

よく使われるタンパク質発現用プラスミドベクター　SnapFast ™ プラスミドベクターシリーズ

製品名	カタログ番号	特長
哺乳動物細胞用 タンパク質発現プラスミドベクター		
pSF-CMV-Puro-NH2-10His-EKT	OGS1157	N 末端 10xHis タグ、ETK（エンテロキナーゼ）切断部位あり
pSF-CMV-Puro-NH2-FLAG®-6His-EKT	OGS1175	N 末端 FLAG タグ、6xHis タグ、ETK 切断部位あり
pSF-CMV-Puro-COOH-TEV-10His	OGS1120	C 末端 10xHis タグ、TEV 切断部位あり
pSF-CMV-Puro-COOH-TEV-FLAG-6His	OGS1232	C 末端 FLAG タグ、6xHis タグ、TEV 切断部位あり
Mammalian FLAG Tag Pack	PP2393	4 種類の FLAG タグ発現ベクター（N 末端、C 末端、TEV 切断部位あり、なし）のセット
大腸菌用 タンパク質発現プラスミドベクター		
pSF-OXB20-NH2-10His-EKT	OGS2806	N 末端 10xHis タグ、ETK（エンテロキナーゼ）切断部位あり
pSF-OXB20-NH2-FLAG-6His-EKT	OGS2828	N 末端 FLAG タグ、6xHis タグ、ETK 切断部位あり
pSF-OXB20-COOH-TEV-10His	OGS2767	C 末端 10xHis タグ、TEV 切断部位あり
pSF-OXB20-COOH-TEV-FLAG-6His	OGS2891	C 末端 FLAG タグ、6xHis タグ、TEV 切断部位あり
Bacterial FLAG Tag Pack	PP2394	4 種類の FLAG タグ発現ベクター（N 末端、C 末端、TEV 切断部位あり、なし）のセット
酵母用タンパク質発現プラスミドベクター		
pSF-TEF1-NH2-10His-EKT	OGS1649	N 末端 10xHis タグ、ETK（エンテロキナーゼ）切断部位あり
pSF-TEF1-NH2-FLAG-6His-EKT	OGS1658	N 末端 FLAG タグ、6xHis タグ、ETK 切断部位あり
pSF-TEF1-COOH-TEV-10His	OGS1913	C 末端 10xHis タグ、TEV 切断部位あり
pSF-TEF1-COOH-TEV-FLAG®-6His	OGS1969	C 末端 FLAG タグ、6xHis タグ、TEV 切断部位あり

上記以外にも各種プロモーター、レポーター遺伝子や分泌シグナルなどを組み込んだ 1000 種類以上のプラスミドベクターが用意されています。ウェブサイトをご覧ください。



プラスミドのトランスフェクション

DNA や RNA を真核細胞に導入するトランスフェクションは多くの研究に利用されています。トランスフェクションは遺伝子機能の解析やタンパク質合成、細胞増殖、発生など様々なツールとして用いられています。細胞内の研究に有用なだけでなく、創薬研究にも応用されています。トランスフェクションには物理的な方法や化学的な方法、生物的な方法があります。これらの方法は一過性または安定的に細胞へ核酸を導入するために用いられます。

一過性トランスフェクション（transient transfection）は DNA を細胞に導入しますが、細胞の染色体には融合されません。この方法は高い効率で行え、遺伝子転写は 1 ～ 4 日起こります。哺乳動物細胞へのラージスケールの一過性遺伝子発現（TGE）はポリエチレンイミン（PEI）やリン酸カルシウム（CaPi）などが使用されます。

安定的トランスフェクション（stable transfection）はトランスフェクションした DNA が染色体に融合するかエピソームを形成することでもたらされます。安定性トランスフェクション細胞は DHFR や HPH、ADA などのマーカーを用いてセレクションすることができます。一般的なトランスフォーメーションはリン酸化カルシウム沈殿法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法やウイルス輸送法などがあります。また 2 種類の異なる核酸を同じ細胞に導入するコトランスフェクション法も利用されています。

ユニバーサルトランスフェクション試薬について

シグマ アルドリッチの Universal Transfection Reagent（カタログ番号 T0956）は特殊な組成のポリマーがブレンドされたトランスフェクション試薬です。多くの真核細胞系や通常はトランスフェクションが難しい初代細胞において一過性と安定的トランスフェクションに使用されます。血清の有無にかかわらず迅速、簡単に行えます。

Universal Transfection Reagent カタログ番号 T0956

1 mL 入り（10 cm ディッシュで 40 回、6cm ディッシュで 65 回、3.5 cm ディッシュで 110 回のトランスフェクションが可能）

プロトコール

ここでは 1 µg/ µL の DNA プラスミドを用い一般的な細胞にトランスフェクションする方法を紹介しています。

トランスフェクションする細胞は細胞のタイプに応じて血清を含む培地または無血清培地で培養してください。血清および抗生物質はトランスフェクションを阻害せず、場合によってはトランスフェクション効率が増加することがあります。

エタノール沈殿して滅菌済みの分子生物学用グレードの水で 1 µg/ µL に調製した高純度の DNA プラスミドを使用してください。

細胞によって Universal Transfection Reagent の適量は異なりますが、一般的に 1 µg のプラスミド DNA あたりトランスフェクション試薬は 1 ～ 3 µL 使用します。細胞の密度や DNA の量、インキュベーション時間を変えることでトランスフェクションがさらに効果的になる場合がありますので、実験条件の検討も重要です。

付着細胞用プロトコール

1 日目 プレート培養

トランスフェクションを行う 18 ～ 24 時間前に細胞をプレートに撒きます。トランスフェクション時に細胞が 90 ～ 95% コンフルエントになることが理想的です。使用する細胞に応じて血清が含まれている培地または無血清培地で培養してください。

2 日目 トランスフェクション

ここでは 24 ウェルプレートを用いた 1 ウェル分の量を記しています。その他のプレートを用いる場合は下の表 1 の量を参照ください。

トランスフェクションの 30 ～ 60 分前に、培養した細胞の培地を捨て新しい培地を各 0.8 mL 入れます。

チューブ A（DNA 溶液）: 50 µL の DMEM（高グルコース、血清を含まない）に 1 µg のプラスミド DNA を入れて、穏やかにボルテックスします。

チューブ B（トランスフェクション試薬）: 50 µL の DMEM（高グルコース、血清を含まない）に 3 µL の Universal Transfection Reagent（以下、トランスフェクション試薬）を入れて、穏やかにボルテックスします。

チューブ A にチューブ B の溶液を素早く入れます（逆には行わないでください）。ただちに穏やかにボルテックスし、軽くスピンダウンします。室温で 15 ～ 20 分間静置して DNA とトランスフェクション試薬が複合体を形成するのを待ちます（20 分以上行わないでください）。

100 µL の混合液を培養細胞が入ったウェルに滴下します。水平に揺するようにして穏やかに混ぜます。

表 1.

	チューブA			チューブB	
培養する容器	培地	DNA（1 µg/ µL 溶液）	希釈に使用する DMEM	トランスフェクション試薬	希釈に使用する DMEM
96 ウェルプレート	0.2 mL	0.2 µL	10 µL	0.6 µL	10 µL
48 ウェルプレート	0.5 mL	0.5 µL	20 µL	1.5 µL	20 µL
24 ウェルプレート	0.8 mL	1 µL	50 µL	3 µL	50 µL
12 ウェルプレート	1 mL	1.5 µL	100 µL	4.5 µL	100 µL
6 ウェルプレート	2 mL	2 µL	150 µL	6 µL	150 µL
3.5 cm ディッシュ	2 mL	3 µL	100 µL	9 µL	100 µL
6 cm ディッシュ	3 mL	5 µL	250 µL	15 µL	250 µL
10 cm ディッシュ	6 mL	8 µL	500 µL	24 µL	500 µL
T-75 フラスコ	10 mL	18 ～ 36 µL	750 µL	54 ～ 108 µL	750 µL

3 日目 培地交換（センシティブな細胞のみ）

センシティブな細胞の場合はトランスフェクションの 5 ～ 24 時間後に培地を交換します。多くの細胞ではこの培地交換はこの時点の培地交換は必要なく、下記に書かれた 48 時間後の培地交換を行います。

4 日目 培地交換とトランスフェクション効率の確認

トランスフェクションから 48 時間後に培地を交換します。トランスフェクションから 24 ～ 48 時間の間にトランスフェクション効率の測定、細胞を回収して他のアプリケーションに使用、細胞のセレクションを行います。

浮遊細胞用プロトコール

1 日目 前培養

トランスフェクションを行う 18 ～ 24 時間前に密度が 0.5 ～ 1.0 x 10^6 cells/mL の細胞を用いて前培養します。前培養に必要な細胞量は使用する培養容器によって異なります（表 2）。使用する細胞に応じて血清が含まれている培地または無血清培地で培養してください。

2 日目 トランスフェクション

ここでは 6 ウェルプレートを用いた 1 ウェル分の量を記しています。その他の場合は試薬の使用量を変更してください。
トランスフェクションの 30 ～ 60 分前に、培養した細胞の培地を 0.5 mL の新しい培地に交換し、37°Cのウオーターバスで温めます。培地は血清や抗生物質が入っていても構いません。
チューブ A（DNA 溶液）: 100 µL の DMEM（高グルコース、血清を含まない）に 2 µg のプラスミド DNA を入れて、穏やかにボルテックスします。
チューブ B（トランスフェクション試薬）: 100 µL の DMEM（高グルコース、血清を含まない）に 6 µL の Universal Transfection Reagent（以下、トランスフェクション試薬）を入れて、穏やかにボルテックスします。

チューブ A にチューブ B の溶液を素早く入れます（逆には行わないでください）。ただちに穏やかにボルテックスし、軽くスピンダウンします。室温で 15 ～ 20 分間静置して DNA とトランスフェクション試薬が複合体を形成するのを待ちます（20 分以上行わないでください）。
200 µL の混合液を培養細胞が入ったウェルに滴下します。水平に揺するようにして穏やかに混ぜます。

3 日目 培地交換とトランスフェクション効率の確認

トランスフェクションから 48 時間後に培地を交換します。トランスフェクションから 24 ～ 48 時間の間にトランスフェクション効率の測定、細胞を回収して他のアプリケーションに使用、細胞のセレクションを行います。

表 2.

培養する容器	前培養に用いる細胞数
96 ウェルプレート	2 x 10^4 ～ 5 x 10^4
48 ウェルプレート	5 x 10^4 ～ 1 x 10^5
24 ウェルプレート	1 x 10^5 ～ 2 x 10^5
6 ウェルプレート	2 x 10^5 ～ 5 x 10^5
3.5 cm ディッシュ	5 x 10^5 ～ 2 x 10^6
6 cm ディッシュ	2 x 10^6 ～ 5 x 10^6
10 cm ディッシュ	5 x 10^6 ～ 1 x 10^7

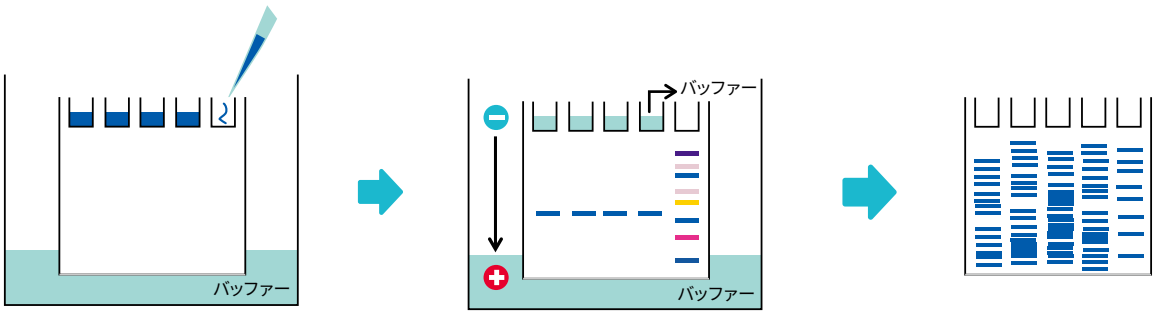
参考

Universal Transfection Reagent（カタログ番号 T0956）の適用細胞例

効果が高い細胞	使用できる細胞		
BHK-21	3LL	CV-1	SAOS-2
CHO	6CSFME	D 407	SHEP
CHOK1	ATT20B16-F0	HUVEC	SiHa
HEK293	B16-F10	L929	SKOV3
HeLa	BAEC	MCF-7	初代細胞
NIH3T3	Ca Ski	MDCK	
	COS-7	Neuro2A	

タンパク質の電気泳動

ポリアクリルアミドゲルはアクリルアミドとビスアクリルアミド（N,N’-methylenebisacrylamide）から形成される高度に架橋したゲルマトリクスです。このゲルは電荷によって移動するタンパク質のふるいとしての役割を果たします。ネイティブのタンパク質は全体として正または負の電荷を帯びているため電荷が釣り合う等電点まで移動します。変性したタンパク質は一律に負の電荷を帯びているため、正の電極に向かって移動し、それぞれのサイズに応じて分離します。



サンプル、マーカーをローディング　　電流によってサンプルが移動　　泳動後に染色

必要な試薬

30% アクリルアミド / ビスアクリルアミド 29:1 溶液（カタログ番号 A3574）
自作する場合は下記の組成で調製
アクリルアミド（A8887）29.2 g
ビスアクリルアミド（M7279）0.8 g
脱イオン水で 100 mL に溶解

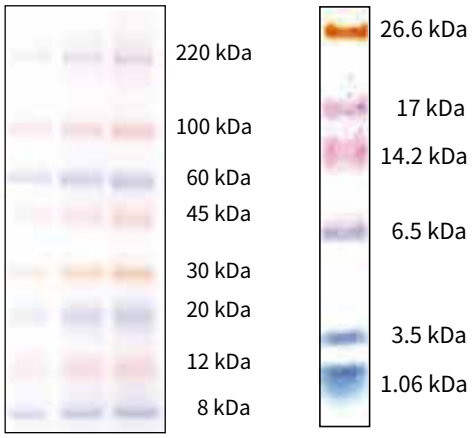
分離ゲル作成用バッファー 1.5M トリス塩酸バッファー（Tris-HCl バッファー）pH 8.8
18.15 g のトリス塩基（Trizma base カタログ番号 T6066）を 80 mL の脱イオン水に溶解します。6N の塩酸で pH 8.8 に調整してから脱イオン水で 100 mL にメスアップします。

濃縮ゲル作成用バッファー 0.5M トリス塩酸バッファー（Tris-HCl バッファー）pH 6.8
6 g トリス塩基（Trizma base カタログ番号 T6066）を 80 mL の脱イオン水に溶解します。6N の塩酸で pH 6.8 に調整してから脱イオン水で 100 mL にメスアップします。

2x LaemmLi サンプルバッファー（調製済み製品の場合 S3401）
ブロモフェノールブルー（B8026）0.004%
2- メルカプトエタノール（M3148）10%
グリセロール（G5516）20%
SDS（L3771）4%
トリス塩酸バッファー pH 6.8 0.125 M

10x 泳動バッファー（調製済み製品の場合 T7777）
Tris-HCl バッファー 25 mM
グリシン（G8898）200 mM
SDS（L3771）0.1%（w/v）

10% SDS 溶液（71736）
10% 過硫酸アンモニウム溶液（A3678）
TEMED（T9281）



4–20% Tris-Glycine
C1992　　C6210

取り扱い注意
アクリルアミドとビスアクリルアミドは神経毒性があります。
グローブなど適切な保護具を用いてお取扱いください。

製品	容量・使用回数	カタログ番号
着色済み広範囲マーカー	500 µL（約 50 回分）	C1992-1VL
着色済み超低分子量マーカー	200 µL（約 20 回分）	C6210-1VL

ゲルの準備

ゲル作成用のプレートは脱イオン水とエタノールで洗浄してから使用します。
平らで安定した台の上でプレートをセットします。
下表から目的のゲル濃度の溶液を準備します。
下記は分離ゲル 10 mL 用の容量です。必要なゲルに応じて変更してください。

ゲル濃度	水 (mL)	30%アクリルアミドゲル (mL)	1.5Mトリス塩酸バッファー (mL)	10% SDS (µL)	10% 過流酸アンモニウム (µL)	TEMED (µL)
8%	4.6	2.6	2.6	100	100	10
10%	3.8	3.4	2.6	100	100	10
12%	3.2	4	2.6	100	100	10
15%	2.2	5	2.6	100	100	10

セットしたプレートに上記の溶液を流し入れます。
流し入れた溶液の上に水またはイソプロパノールを重層します。
室温で 20 ～ 30 分静置して分離ゲルが固まるのを待ちます。

下記の組成で濃縮ゲルの溶液を準備します。分離ゲル 10 mL 用の容量です。必要なゲルに応じて変更してください。

ゲル濃度	水 (mL)	30%アクリルアミドゲル (mL)	1.5Mトリス塩酸バッファー (mL)	10% SDS (µL)	10% 過流酸アンモニウム (µL)	TEMED (µL)
5%	5.86	1.34	2.6	100	100	10

サンプルの準備

タンパク質サンプル溶液に等量のサンプルバッファー（2x LaemmLi サンプルバッファー）を加えます。
95°Cで 5 分間ボイルして、16,000 x g で 5 分間遠心します。
そのまま電気泳動に使用するか、-20°Cで保存可能です。

電気泳動

使用している電気泳動槽のマニュアルに従って電気泳動を行います。

ゲルの染色（クマシー染色）

SDS-PAGE 後のタンパク質の染色には Coomassie Brilliant Blue R が一般的によく用いられています。

必要な試薬
固定液（500 mL）
メタノール 250 mL
酢酸 50 mL
水 200 mL

染色液（調製済み溶液の場合 カタログ番号 B8647**）**
Coomassie Brilliant Blue R（B0149）0.1%
メタノール 40%
酢酸 10%
水
溶解後に Whatman® grade 1 フィルターペーパーでろ過

脱染色溶液
メタノール 50 mL
酢酸 35 mL

ゲル保存用液
酢酸 25 mL
水 475 mL

染色プロトコール

1. SDS-PAGE 後、ゲルを取り出し、適量の固定液を入れたプラスチックトレイに入れます。
2. 30 分以上揺り動かしてタンパク質を固定します。
3. 固定液を除去し、染色液を入れ、揺り動かして染色します。
4. 染色後、数回脱イオン水ですすぎ、余分な染色を取り除きます。
5. 脱染色液を入れ、バンドがクリアに見えるまで約 4 時間揺り動かして脱色します。
6. 脱染色後、ゲル保存用液に入れて保存することができます。

SDS-PAGE 用プレキャストゲル

前述のように SDS ポリアクリルアミドゲルは作成することができますが、複数の溶液が必要なうえ、有害性のあるアクリルアミドの粉末を取り扱わなければなりません。そこであらかじめ作成されたゲル（プレキャストゲル) が市販されています。SDS-PAGE 用プレキャストゲル TruPAGE の使用方法を紹介します。

専用のバッファーや試薬を用いる以外、一般的な SDS-PAGE 法・ブロッティング法と同様です。

泳動バッファー（ランニングバッファー）の準備

TruPAGE 用 TEA-Tricine SDS または TEA-MOPS SDS Express 泳動バッファーを 20 倍に希釈。
（800 mL 泳動槽の場合、40 mL の 20x バッファーに超純水 760 mL を加えます）
必要に応じて TruPAGE 用 酸化防止剤を添加。
（800 mL の泳動バッファーあたり 800x 酸化防止剤 1 mL）

サンプルの準備

泳動直前に下表の量でサンプルを調製。

試薬（単位 µL）	還元	非還元
タンパク質サンプル	a	a
4x サンプルバッファー	2.5	2.5
10x 還元剤	1	なし
超純水	6.5 - a	7.5 - a
合計	**10**	**10**

70°C で 10 分間処理（沸騰させません）。
ゲルのウェルを超純水でリンス。
準備した 1x 泳動バッファーを泳動槽を入れます。
サンプルをゲルにローディング。
（12 ウェルゲルは 20 µL、17 ウェルゲルは 35 µL まで）

泳動

サンプルをロードし泳動槽をバッファーで満たした後、180V の電圧をかけて色素がゲルカセットの下部に来るまで泳動します。
TEA-Tricine SDS 泳動バッファーの場合 30 ～ 70 分
TEA-MOPS SDS Express 泳動バッファーの場合 20 ～ 60 分

ブロッティング・転写

ニトロセルロース膜または 100% メタノールに浸した PVDF 膜を用意。
転写直前に下表の量で 1x 転写バッファーを調製し 5 ～ 10 分間冷やします。

試薬（単位 mL）	ニトロセルロース	PVDF
20x 転写バッファー	50	50
メタノール	200	100
超純水	750	850
合計	**1,000**	**1,000**

ブロッティング装置のマニュアルに沿って転写を行います。

転写条件の例	Trans-Blot®	XCell II™
電圧（V）	50-100	50
転写時間（時）	0.5-4	1-1.5
予想される電流（mA）	250	200

※ 以下は使用例です

ゲルの染色

TruPAGE は一般的な染色法で染色することができます。

染色剤の例
Coomassie Brilliant Blue
EZBlue™ ゲル染色試薬（カタログ番号 G1041）
SYPRO™ Ruby タンパク質ゲル染色（カタログ番号 S4942）

詳細は製品のデータシート（Product Information Sheet）をご覧ください。

TruPAGE プレキャストゲル 製品リスト

12 ウェルは 35 µL、17 ウェルは 20 µL のローディングができます。

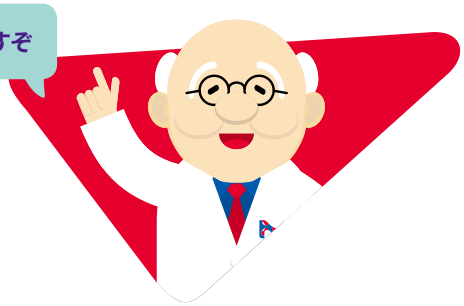
均一ゲル				
ゲル濃度	サイズ	ウェル数	包装	カタログ番号
10%	10 x 10 cm	12	10 枚	PCG2001-10EA
12%	10 x 10 cm	12	10 枚	PCG2002-10EA
10%	10 x 10 cm	17	10 枚	PCG2005-10EA
12%	10 x 10 cm	17	10 枚	PCG2006-10EA
10%	10 x 8 cm	12	10 枚	PCG2009-10EA
12%	10 x 8 cm	12	10 枚	PCG2010-10EA
10%	10 x 8 cm	17	10 枚	PCG2013-10EA
12%	10 x 8 cm	17	10 枚	PCG2014-10EA

グラジエントゲル				
ゲル濃度	サイズ	ウェル数	包装	カタログ番号
4-12%	10 x 10 cm	12	10 枚	PCG2003-10EA
4-20%	10 x 10 cm	12	10 枚	PCG2004-10EA
4-12%	10 x 10 cm	17	10 枚	PCG2007-10EA
4-20%	10 x 10 cm	17	10 枚	PCG2008-10EA
4-12%	10 x 8 cm	12	10 枚	PCG2011-10EA
4-20%	10 x 8 cm	12	10 枚	PCG2012-10EA
4-12%	10 x 8 cm	17	10 枚	PCG2015-10EA
4-20%	10 x 8 cm	17	10 枚	PCG2016-10EA

TruPAGE 専用バッファー・試薬リスト

製品名	濃度	容量	カタログ番号
TruPAGE 用 LDS サンプルバッファー	4x 溶液	10 mL	PCG3009-10ML
TruPAGE 用 DTT サンプル還元剤	10x 溶液	1 mL	PCG3005-1ML
TruPAGE 用 TEA-Tricine SDS 泳動バッファー	20x 溶液	500 mL	PCG3001-500ML
TruPAGE 用 TEA-MOPS SDS Express 泳動バッファー	20x 溶液	500 mL	PCG3003-500ML
TruPAGE 用 泳動中の酸化防止剤	800x 溶液	10 mL	PCG3007-10ML
TruPAGE 用 転写バッファー	20x 溶液	500 mL	PCG3011-500ML

ハカセに質問！



▶ TruPAGE とは？

SDS-PAGE（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）用のプレキャストゲルじゃよ。

▶ 使用期限は？

製造から 2 年間経過してもシャープなバンドが確認できるのじゃ。

▶ 普通のポリアクリルアミドゲルと何が違う？

ひとことで言うと TruPAGE は頑丈じゃ。
取り出しやすいパッケージやバンドの解像度が良いなど他にも長所はあるが、
とにかく頑丈じゃ。

▶ 良いことばかりで欠点はない？

TruPAGE 専用のサンプルバッファーと泳動バッファーが必要なのじゃよ。
（詳細は専用試薬を参照）
専用の試薬は面倒じゃが、それ以上のメリットがあると思うがのう。

▶ 使用できる泳動槽は？

一般的な各社の泳動槽で使えると聞いておるよ。
Life Technologies ™ , Bio-Rad®, Lonza®, Hoefer®

▶ 染色はどうするの？

CBB（クマシーブリリアントブルー）や SYPRO ™ など一般的な色素で染色できて便利じゃよ。

TruPAGE 専用試薬

TruPAGE プレキャストゲルに最適化された専用のバッファー・試薬をご利用ください。
以下の TruPAGE 専用バッファー・試薬はそれぞれ単品でご提供しております。

TruPAGE 用 サンプルバッファー（カタログ番号 PCG3009）

TruPAGE 用に調製されたサンプルバッファーです。

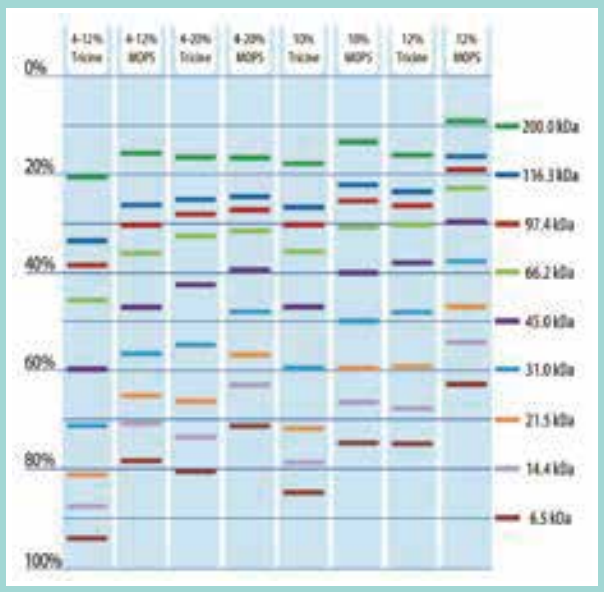
TruPAGE 用 サンプル還元剤（カタログ番号 PCG3005）

サンプルの還元剤
（非還元状態の電気泳動を行う場合は不要）

TruPAGE 用 泳動バッファー

2 種類の専用バッファーをご用意しています。
分離するタンパク質に応じてどちらかをお使いください。

- TEA-Tricine SDS（カタログ番号 PCG3001）
  幅広い分子量のタンパク質の泳動に対応しています。
- TEA-MOPS SDS Express（カタログ番号 PCG3003）
  短時間の泳動ができます。
  低分子タンパク質の分離に適しています。



泳動中の酸化防止剤（カタログ番号 PCG3007）

泳動中の酸化を防ぎます。
還元処理したサンプルのバンドが明瞭になります。

転写バッファー（カタログ番号 PCG3011）

PDVF 膜やニトロセルロース膜に転写する際に用います。

溶液の調製

PBS

PBS（Phosphate Buffered Saline; リン酸緩衝食塩水) は生物学の実験に一般的に使用される緩衝液で、カルシウムおよびマグネシウムを含まない PBS は PBS（-）と表記されます。PBS はダルベッコ PBS（Dulbecco’s PBS, D-PBS）と呼ばれることもあります。
PBS（-）溶液はオートクレーブ可能で、室温で保存可能です。
カルシウム・マグネシウムを含む PBS は PBS（+）と表記され、細胞接着を強める場合などに用いられます。

	カタログ番号	1x, 1 L用 0.01 M PBS	10x, 1 L用 0.1 M PBS
リン酸 2 水素カリウム（KH_2PO_4）	P9791	0.2 g	2.0 g
塩化カリウム（KCl）	P9541	0.2 g	2.0 g
リン酸水素 2 ナトリウム（Na_2HPO_4）	S3264	1.15 g	11.5 g
またはリン酸水素 2 ナトリウム 12 水和物	28-3720	2.90 g	29.0 g
塩化ナトリウム（NaCl）	S3014	8.0 g	80.0 g
【PBS（+）のみ使用】塩化カルシウム 2 水和物	C3306	(0.133 g)	(1.33 g)
【PBS（+）のみ使用】塩化マグネシウム 6 水和物	M2670	(0.1 g)	(1 g)

1xPBS（-）, 1 L 用レシピ

上表 1x 用に記載された量のリン酸 2 水素カリウム、塩化カリウム、リン酸水素 2 ナトリウム、塩化ナトリウムを約 800 mL の純水に溶かし、純水で 1 L にメスアップすると pH 約 7.4 の 1x PBS が調製できます。
補足）リン酸水素 2 ナトリウムの代わりにリン酸水素 2 ナトリウム 12 水和物を使うこともできます。

10xPBS（-）, 1 L 用レシピ

上表 10x 用に記載された量のリン酸 2 水素カリウム、塩化カリウム、リン酸水素 2 ナトリウム、塩化ナトリウムを約 800 mL の純水に溶かし、純水で 1 L にメスアップすると pH 約 7.4 の 10x PBS が調製できます。1x 濃度で正確な pH が必要な場合は、1x 濃度に希釈する際に、pH を調整することが推奨されます。

PBS（+）を作成する場合は塩化カルシウム 2 水和物）および塩化マグネシウム 6 水和物を上表の量加えます。
カルシウム、マグネシウムを含んでいるとオートクレーブできません。
PBS（+）をフィルター滅菌するか、オートクレーブした PBS（-）にフィルター滅菌した塩化カルシウム溶液と塩化マグネシウム溶液を添加します。

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
1x PBS, pH 7.4 粉末（1 袋 =1 L 用)	成分が混合済みの粉末タイプ 分子生物学用グレード	P5368
10x PBS, pH 7.4 溶液	10x 濃度に調製済みの溶液タイプ 分子生物学用グレード	P5493

PBS-T

PBS-T はウエスタンブロットなどの抗体反応においてバックグランドを減少させるために洗浄などで使用されます。
抗体の発色にアルカリフォスファターゼ（AP）を用いる場合は、PBS に含まれるリン酸が影響を与えるので PBS ではなく TBS を使用します。

PBS-T　1L 用レシピ

（最終濃度　0.05% Tween 20）
1 L の 1x PBS に 0.5 mL の Tween 20（カタログ番号 P9416）を加えて混ぜます。
Tween 20 を加えた溶液は当日に使用します。
Tween 20 は粘性が高いので、先端をはさみなどで切り取ったピペットチップを用いると扱いやすくなります。

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
1x PBS-T, pH 7.4 粉末（1 袋 =1 L 用）	成分が混合済みの粉末タイプ 溶解後 0.05% TWEEN 20 を含む 1x PBS（0.01 M PBS）になります	P3563

注意事項
オートクレーブ耐性のある容器（メディウムビンなど）をご使用ください。オートクレーブの際は、圧力によって膨張しますので容器のフタを若干緩めてください。オートクレーブ後は容器および内容物が非常に熱くなりますので、取り扱いには十分注意してください。オートクレーブ後に急に冷やすと容器が破損する恐れがありますので、急冷せず自然に冷ましてください。

トリス塩酸バッファー（Tris-HCl バッファー）

トリス塩酸バッファーはトリスバッファーや Tris-HCl バッファーなどと呼ばれ、様々な生物学的実験系で pH7 ～ 9 のバッファーとして用いられます。

トリス塩基（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、Tris base、Trizma™ Base）を溶解して pH を調整することでトリスバッファーを作成できます。
実験に応じて適した pH が異なるため、よく使用する pH についてそれぞれストック溶液（1 M や 0.5 M 溶液）を調製しておくと便利です。

1M トリス塩酸バッファー 100 mL 用基本レシピ

	製品番号	1 M, 100 mL用
トリス塩基（Trizma base）	T6066	12.1 g
塩酸		10 mL 程度

12.1 g の Trizma Base（トリス塩基）を約 80 mL の純水に溶かします。
スターラーで撹拌しながら塩酸を加え、目的の pH に調整します。
塩酸を加えると発熱が起こるため、pH に変化が生じます。しばらくおいて室温になってから pH を再度測定し、塩酸で調整すると正しい pH のバッファーが得られやすくなります。
トリスの中和には塩酸を大量に使用するので、希塩酸ではなく希釈していない塩酸が適しています。
pH の調整が終わったら、純水で 100 mL にメスアップします。溶液は室温で保存可能です（オートクレーブ可能）。

トリス塩酸バッファー 簡易レシピ 1

塩基性を示すトリス塩基（Trizma Base）と酸性を示すトリス塩酸塩（Trizma HCl）を組み合わせることで、好みの pH のトリス塩酸バッファーを調製することもできます。

1 L用				
最終濃度	pH	Trizma Base 製品番号T6066	Trizma HCl 製品番号T5941	調製方法
0.05 M	7.6	1.39 g	6.06 g	純水に溶かし、1 L にメスアップ
0.05 M	7.8	1.97 g	5.32 g	純水に溶かし、1 L にメスアップ
0.05 M	8.0	2.65 g	4.44 g	純水に溶かし、1 L にメスアップ

その他の pH の場合はカタログまたはウェブサイトでもご覧いただけます（Trizma の項目参照）。
Trizma HCl および Trizma Base は吸湿性があるため、吸湿していると実際の予想される濃度・pH と異なる場合があります。

トリス塩酸バッファー 簡易レシピ 2

Trizma Pre-set crystals（プリセット結晶）シリーズは各 pH になるようにトリス塩基とトリス塩酸塩が混合された製品です。
この 1 種類の製品を純水に溶かすだけでそれぞれの製品に示された pH のトリス塩酸バッファーが作成できます。
Trizma Pre-set crystals シリーズは pH によって混合されているトリス塩基とトリス塩酸塩の比率が異なり、それぞれの製品の平均分子量は異なります。各製品の平均分子量から目的の濃度に必要な量を計算して溶解します。
下記以外の pH 用製品もございます。

Trizma Pre-set crystals（プリセット結晶）シリーズ			
製品番号	製品情報	0.1 M, 1 L調製する場合	調製方法
T7693	pH 7.4, 平均分子量 151.6	15.2 g	純水に溶かし、1 L にメスアップ
T8443	pH 8.0, 平均分子量 141.8	14.2 g	純水に溶かし、1 L にメスアップ

トリス塩酸バッファー 簡易レシピ 3

すでに調製された溶液を使うと溶解や pH 調整の手間がなく便利です。

調製済みトリス塩酸バッファー	製品情報	製品番号
pH 7.0, 1 M 溶液	DNase, RNase, Protease フリー	T2413
pH 7.2, 1 M 溶液	DNase, RNase, Protease フリー	T2538
pH 7.4, 1 M 溶液	DNase, RNase, Protease フリー	T2663
pH 7.6, 1 M 溶液	DNase, RNase, Protease フリー	T2788
pH 8.0, 1 M 溶液	DNase, RNase, Protease フリー	T3038

TAE バッファー（トリス - 酢酸 -EDTA バッファー）

TAE バッファー（トリス酢酸 EDTA バッファー）は DNA のアガロース電気泳動用のバッファーとして用いられます。
電気泳動でアガロースゲルを作成する際、アガロースの溶解にも用いられます。
頻繁に使用するため、50 x または 10 xのストック溶液を作成しておくと便利です。
ストック溶液は室温で保存可能です。

TAE ストック溶液 1 L 用レシピ

	カタログ番号	50x, 1 L用	10x, 1 L用
トリス塩基（Trizma base）	T6066	242 g	48.4 g
酢酸		57.1 mL	11.4 mL
0.5 M EDTA 二ナトリウム溶液	E7889	100 mL	20 mL
（または　EDTA 二ナトリウム 2 水和物）	E5134	(18.6 g)	(3.7 g)

上表の試薬を適当な量の脱イオン水で溶かして 1 L にメスアップします。
オートクレーブは不要です。

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
10xTAE バッファー	DNase, RNase フリー	T9650

TBE バッファー（トリス - ホウ酸 -EDTA バッファー）

TBE バッファーはアガロースゲル電気泳動や DNA および RNA のポリアクリルアミドゲル電気泳動の泳動バッファーに用いられます。
非変性ゲルまたは変性ゲル（7 M 尿素）に使用され、DNA シークエンス用ゲルにも用いられます。
5x または 10x のストック溶液を作成すると便利です。

TBE ストック溶液 1 L 用レシピ

	カタログ番号	5x, 1 L用
トリス塩基（Trizma base）	T6066	54 g
ホウ酸	B7901	27.5 g
0.5 M EDTA 二ナトリウム溶液	E7889	20 mL
（または　EDTA 二ナトリウム 2 水和物）	E5134	(3.7 g)

上表の試薬を適当な量の脱イオン水で溶かして 1 L にメスアップします。
オートクレーブは不要です。
ストック溶液は室温で保存可能（長期間保存すると沈殿が生じる場合があります）。

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
10xTBE バッファー	DNase, RNase フリー	T4415

HEPES バッファー

HEPES は pH 6.8 ～ 8.2 の範囲で緩衝能があり、細胞培養、組織培養やタンパク質実験など様々な生物学用途に使用されます。
細胞培養に使用する場合は 10 ～ 25 mM の濃度が推奨されています。

1M HEPES バッファー　100 mL 用レシピ

23.8 g の HEPES（分子量 238.30）を約 80 mL の水に溶かします。
pH を測定しながら 5N または 1N 水酸化ナトリウムで目的の pH に調整します（pH が高くなった場合は 1N 塩酸で調整します）。
水で 100 mL にメスアップします。溶解後は 2-8°Cで保存可能です。溶液はオートクレーブ可能です。

	カタログ番号	使用量
HEPES（粉）	H4034	23.8 g
5 N 水酸化ナトリウム溶液	S8263	適量

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
1M HEPES 溶液	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	H3537

MOPS バッファー

MOPS は pH 6.5 ～ 7.9 の範囲で緩衝能があり、哺乳動物細胞の培地やポリアクリルアミドゲル電気泳動の泳動バッファーなどに使用されます。
細胞に使用する場合は 20 mM 以下の濃度が推奨されています。

1 M MOPS バッファー　100 mL 用レシピ

20.9 g の MOPS（分子量 209.26）を約 80 mL の水に溶解します。
pH を測定しながら 5N 水酸化ナトリウム溶液または水酸化カリウム溶液で目的の pH に調整します（pH が高くなった場合は 1N 塩酸で調整します）。
100 mL にメスアップします。
溶解後は 2 ～ 8°Cで保存可能です。

	カタログ番号	使用量
MOPS（粉）	M3183	20.9 g
5 N 水酸化ナトリウム溶液	S8263	適量
滅菌フィルター		オプション

注意事項

MOPS 溶液はオートクレーブを行わないでください。滅菌を行う場合は 0.2 µm のフィルターを使用してろ過滅菌してください。
また、ヌクレアーゼフリーの MOPS を含む溶液を調製したい場合は、MOPS を除いた溶液をオートクレーブしてから MOPS 粉末を加えます。

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
1M MOPS 溶液	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	M1442

EDTA 溶液

EDTA は 2 価のイオンをキレートすることによって金属プロテアーゼおよび金属によって活性化されるプロテアーゼを阻害します。
DNA 分解酵素も阻害するため DNA の溶液によく用いられます。

0.5 M EDTA 溶液（pH 8.0）100 mL 用レシピ

1. 18.6 g の EDTA 二ナトリウム 2 水和物（カタログ番号 E5134）を 80 mL の純水に溶かします。
2. 溶液を撹拌しながら pH を測定し、水酸化ナトリウム（固体）を少しずつ加え、pH を 8.0 付近に近づけます。
3. pH が 8.0 に近づいたら、5N 水酸化ナトリウム溶液を少しずつ加え、pH を 8.0 に合わせます。
4. 純水で 100 mL にメスアップします。

溶液は 2 ～ 8°Cで保存可能です。

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
0.5 M EDTA 溶液	水溶液 DNase、RNase、プロテアーゼフリー	E7889

TE バッファー

TE バッファー（トリス -EDTA バッファー）は DNA の保存用溶媒として用いられます。
組成：10 mM Tris, 1 mM EDTA（pH 約 8.0）

TE バッファー 100 mL 用レシピ

	カタログ番号	100 mL用	最終濃度
トリス塩酸バッファー , pH 8.0, 1 M	T2694	1.0 mL	10 mM
EDTA 溶液 , 0.5 M	E7889	0.2 mL	1 mM

1. 1M トリス塩酸バッファー（pH 8.0）1.0 mL と 0.5 M EDTA（pH 8.0）0.2 mL を DNase フリーの水で 100 mL にメスアップします。
2. 121°Cで 15 分間オートクレーブします。

溶液は 2 ～ 8°Cまたは室温で保存可能です。

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
100xTE バッファー	1M トリス塩酸（pH 約 8.0）、0.1 M EDTA DNase、RNase フリー	T9285

TBS

TBS（Tris Buffered Saline）は PBS と同様に抗体反応などを利用した実験に使用されます。
実験によって適する pH は異なりますので、pH を調整して作成します。

	カタログ番号	1x, 1 L用0.05 M TBS	10x, 1 L用0.5 M TBS	1x溶液中の濃度
トリス塩基	T6066	6.1 g	60.6 g	0.05 M
塩化ナトリウム	S3014	8.1 g	80.6 g	0.138 M
塩化カリウム	P9541	0.2 g	2.0 g	0.0027 M
塩酸		適量	適量	

1xTBS, 1 L 用レシピ

1. 上表 1x 用に記載された試薬を約 800 mL の純水に溶かします。
2. pH を測定しながら塩酸を加え、目的の pH に調整します。
3. 純水で 1 L にメスアップ。
4. 溶液はオートクレーブ滅菌して、2-8°Cまたは室温で保存可能です。

10xTBS, 1 L 用レシピ

1. 上表 10x 用に記載された試薬を約 800 mL の純水に溶かします。
2. pH を測定しながら塩酸を加え、目的の pH に調整します。
3. 純水で 1 L にメスアップ。
4. 溶液はオートクレーブ滅菌して、2 ～ 8°Cまたは室温で保存可能です。

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
1x TBS, pH 8.0 粉末（1 袋 =1 L 用 ）	成分が混合済みの粉末タイプ 水に溶解すると 0.05 M TBS, pH 8.0 になります	T6664

TBS-T

Tween 20 を含む TBS は TBS-T と呼ばれ、ウエスタンブロットなどの抗体反応においてバックグランドを減少させるために洗浄用に使用されます。抗体の発色にアルカリフォスファターゼ（AP）を用いる場合は、PBS に含まれるリン酸が影響を与えるので PBS ではなく TBS を使用します。

1xTBS-T, 1 L 用レシピ

（最終濃度　0.05% Tween 20）
1 L の 1xTBS に 0.5 mL の Tween 20（カタログ番号 P7949）を加えて混ぜます。

Tween 20 を加えた溶液は当日に使用します。
Tween 20 は粘性が高いので、先端をはさみなどで切り取ったマイクロピペットチップを用いると扱いやすくなります。

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
1x PBS-T, pH 7.4 粉末（1 袋 =1 L 用）	成分が混合済みの粉末タイプ 溶解後 0.05% TWEEN 20 を含む 0.05 M TBS, pH 8.0 になります	T9039

中性飽和フェノール（トリスフェノール）溶液

フェノールは核酸の抽出においてタンパク質の分離に用いられます。フェノールは水に溶かすと弱酸性を示しますが、酸性条件で DNA はフェノール層に移ってしまうため、フェノールをトリス塩酸バッファー（pH 8.0）で飽和させることでフェノール溶液を中性に調製します。
RNA 分離用には水で飽和したフェノール（酸性飽和フェノール、水飽和フェノール）を用います。

	カタログ番号	使用量
フェノール（結晶）	P1037	100 g
8- ヒドロキシキノリン	H6878	100 mg
トリス塩酸バッファー（1M 溶液を希釈して使用）	T2694	数 100 mL

中性飽和フェノール レシピ

1. 100 g のフェノール結晶をガラスのメディウムビンに移し、フタを閉めて 65°Cのウォーターバスで溶かします。
2. フェノールが溶けたら、8- ヒドロキシキノリンを 100 mg（最終濃度 0.1%）加えます。
   ※ 8- ヒドロキシキノリンは酸化防止剤として作用します。8- ヒドロキシキノリンを添加しない場合もありますが、添加することでフェノール層が黄色に着色して見やすくなります。
3. 100 mL の 0.5 M トリスバッファー（pH 8.0）を入れ、フタをよく閉めてから 15 分間程度激しくシェイクします。
4. しばらく静置して、2 層に分かれたら上層（水層）を除去します。
5. マイクロピペットなどを用いてフェノール層を少しサンプリングし、pH 試験紙で pH を確認します。
6. pH が 7.8 以上になるまで手順 **3** ～ **5** を繰り返します。
7. 平衡化したフェノールを適量に分注し、それぞれ等量の 0.1 M トリスバッファー（pH 8.0）を加えて、2 層にした状態で保存します。
   平衡化したフェノールは遮光して 2 ～ 8°Cで短期間、-20°Cで長期間保存可能です。
   フェノール層の上に 0.1 M トリス塩酸バッファーの層を重層させることでフェノールが空気と接触するのを避け、酸化防止の作用があります。

フェノールはタンパク質の変成作用がありますので、手袋や保護メガネなどの保護具を着用してください。
フェノールはガラスビンなど耐性がある容器で保存してください。
廃液はフェノールが含まれるので廃棄には注意してください。

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
中性飽和フェノール	10 mM トリス , pH 8.0, 1 mM EDTA	P4557

酸性飽和フェノール（水飽和フェノール）溶液

酸性飽和フェノール レシピ

1. フェノール結晶を適量取り、ガラスのメディウムビンに移してフタを閉めます。
2. 65°Cのウォーターバスでフェノールを溶かします。
3. フェノールが溶けたら、等量の純水を加えてフタをよく閉め、激しく数分間シェイクします。
4. しばらく静置すると 2 層に分離します。遮光して 2 ～ 8°Cまたは -20°Cで保存可能です。

フェノールはタンパク質の変成作用がありますので、手袋や保護メガネなどの保護具を着用してください。
フェノールはガラスビンなど耐性がある容器で保存してください。
廃液はフェノールが含まれるので廃棄には注意してください。

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
酸性飽和フェノール	0.1 M クエン酸バッファー , pH 4.3	P4682

フェノールクロロホルム溶液

フェノールクロロホルム溶液は核酸からタンパク質を除去することで核酸の精製に用いられます。フェノールによってタンパク質が失活して RNase 活性は抑制されますが、イソアミルアルコールを少量混ぜることで RNase 活性がさらに低減します。

DNA の精製はフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール＝ 25:24:1、RNA の精製は 125:24:1 がよく利用されます。

DNA 精製用フェノールクロロホルム溶液　100 mL 用レシピ

DNA精製用	カタログ番号	使用量
クロロホルム	05-3400	49 mL
中性飽和フェノール	P4557	50 mL
3- メチル -1- ブタノール（イソアミルアルコール）	I9392	1 mL

1. 49 mL のクロロホルムに 1 mL のイソアミルアルコールを加えて混ぜます。
2. 1 の混合液 50 mL と中性飽和フェノール（トリス - フェノール）溶液 50 mL を混ぜます。しばらく静置すると 2 層に分離します。

遮光して 2 ～ 8°Cで保存可能です。
下層を核酸の精製に使います。

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
DNA 抽出用フェノールクロロホルム Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1	トリス塩酸バッファーで飽和した調製済み溶液 pH 8.0 のトリス塩酸バッファーを用いていますが実際の pH は約 6.7 一般的な DNA 抽出に使用可能ですがゲノム DNA など大きな DNA の場合は pH を 8 にする必要があります	P3803
DNA 抽出用フェノールクロロホルム Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1	付属のトリス塩酸バッファーで調製が必要 使用直前に調製できるため pH を 8.0 にして使用できます pH を 8.0 に調整した後はおよそ 1 ヶ月間以内に使用します	P2069
RNA 抽出用フェノールクロロホルム Phenol:Chloroform 5:1		P1944

RNase 溶液

抽出したプラスミド DNA サンプルから RNA を除去するため、RNase A がよく用いられます。
また使用した RNase をサンプル中から取り除くために、フェノールクロロホルム抽出やエタノール沈殿が一般的に行われます。

RNase A ストック溶液 10 mL 用レシピ

	カタログ番号	使用量
RNase A	R6513	100 mg
5 M 塩化ナトリウム溶液	S3014	30 µL
1 M トリス塩酸バッファー , pH 7.5		100 µL
滅菌した純水		9.87 mL

1. 100 mg の RNase A に上表の量の 5 M 塩化ナトリウム溶液、トリス塩酸バッファー、水を加えて溶かします。
2. エッペンドルフチューブなどに適当に分注して -20°Cで保存します。

調製後、残存する DNase を失活させるために 100°Cで煮沸することもありますが特に必要ありません。
煮沸した場合、沈殿物が生じることがあります。
RNase を取り扱う際には、周囲に RNA のサンプルがないことを確認してください。

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
RNase A 溶液（ウシ膵臓由来）	濃度 20 ～ 40 mg/mL DNase フリー 50% グリセロール溶液なので -20 度で凍らず、凍結融解による失活が避けられます	R4642

DEPC 処理水

DEPC（Diethyl pyrocarbonate 、ピロ炭酸ジエチル）は核酸分解酵素の阻害作用があり、RNA サンプルの分解を防ぐために DEPC 処理した水が使用されます。一般的な使用濃度は 0.1%（v/v）です。

DEPC 処理水 1 L 用レシピ

使用する物質 DEPC（カタログ番号 D5758）

1. 1 L の純水に 1 mL の DEPC を加え、スターラーなどでよく撹拌します。 DEPC はすぐに溶けないので、数時間～オーバーナイトで撹拌します。
2. DEPC の粒が見えなくなったら、121°Cで 15 分間オートクレーブします。

DEPC は有害性が指摘されているので、手袋などの保護具を着用してください。

	製品情報	カタログ番号
分子生物学用グレード　水	DNase, RNase, プロテアーゼフリー DEPC 処理ではなく 0.1 µm フィルターろ過処理済みの水です	W4502

IPTG 溶液

イソプロピル β -D-1- チオガラクトピラノシド（IPTG）は大腸菌に導入したプラスミドの遺伝子発現誘導などに用いられます。

0.1M IPTG ストック溶液 10 mL 用レシピ

1. IPTG（カタログ番号 I5502）0.24 g に 10 mL の脱イオン水を加え、スターラーなどを用いて完全に溶かします。
2. 0.22 µm または 0.2 µm 径のフィルターを用いてフィルターろ過滅菌します。

0.1 M のストック溶液は分注して冷凍で保存可能です。
大腸菌の遺伝子発現誘導には一般的に最終濃度 0.2 mM 以上で使用されます。

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
IPTG 溶液	200 mM	I1284

X-gal 溶液

5- ブロモ -4- クロロ -3- インドリル β -D- ガラクトピラノシド（X-gal）はプラスミドを導入した大腸菌のブルーホワイトセレクションなどに用いられます。

2% X-gal ストック溶液 10 mL 用レシピ

1. X-gal（カタログ番号 B4252）0.2 g を DMF（ジメチルホルムアミド、カタログ番号 D4551）10 mL で完全に溶かします。
2. 溶液はガラスビンに分注して -20°C（遮光）で 6 ～ 12 ヶ月は保存可能です。

大腸菌のセレクション用には、25 mL の寒天培地あたり 50 µL の 2% X-gal ストック溶液を混ぜるか、プレート入れた寒天培地の表面に 2% X-gal ストック溶液を適量塗ります。
ストック溶液はピンク色に変色したら使用しないでください。オートクレーブ後の培地に添加する場合は、培地が十分に冷えてから（42 ～ 45°C以下）X-gal 溶液を添加してください。

塩化マグネシウム溶液

1M 塩化マグネシウム溶液　100 mL 用レシピ

1. 約 70 mL の脱イオン水をビーカーに入れ、塩化マグネシウム 6 水和物（カタログ番号 M2670）20.3 g を加え、スターラーなどを用いて完全に溶かします。
2. 100 mL になるように脱イオン水でメスアップします。
3. オートクレーブ可能な容器に移し、121°C で 15 分間オートクレーブします。

溶液は室温または冷蔵で保存可能です。

硫酸マグネシウム溶液

1M 硫酸マグネシウム溶液 100 mL 用レシピ

1. 約 70 mL の脱イオン水をビーカーに入れ、硫酸マグネシウム（カタログ番号 M2643）12.0 g を加え、スターラーなどを用いて完全に溶かします。
2. 100 mL になるように脱イオン水でメスアップします。
3. オートクレーブ可能な容器に移し、121°C で 15 分間オートクレーブします。

溶液は室温または冷蔵で保存可能です。

塩化カリウム溶液

1M 塩化カリウム溶液 100 mL 用レシピ

1. 約 70 mL の脱イオン水をビーカーに入れ、塩化カリウム（カタログ番号 P9541）7.5 g を加え、スターラーなどを用いて完全に溶かします。
2. 100 mL になるように脱イオン水でメスアップします。
3. オートクレーブ可能な容器に移し、121°C で 15 分間オートクレーブします。

溶液は室温または冷蔵で保存可能です。

酢酸ナトリウム溶液

3M 酢酸ナトリウム溶液 100 mL 用レシピ

1. 40.8 g の酢酸ナトリウム三水和物（カタログ番号 S7670）を 90 mL の純水に溶かします。
2. 撹拌しながら pH を測定し、酢酸を少しずつ加えて pH を 5.2 に調整します。
3. 純水で 100 mL にメスアップします。 121°C で 15 分間オートクレーブして滅菌します。溶液は室温で保存可能です。

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
3 M 酢酸ナトリウム溶液 pH5.2	DNase, RNase フリー	S7899

グルコース溶液

1M グルコース溶液 100 mL 用レシピ

1. 約 70 mL の脱イオン水をビーカーに入れ、グルコース（カタログ番号 G7528）18.0 g を加え、スターラーなどを用いて完全に溶かします。
2. 100 mL になるように脱イオン水でメスアップします。
3. 0.22 µm または 0.2 µm 径のフィルターを用いてフィルターろ過滅菌します。

溶液はオートクレーブによる滅菌も可能です。
溶液は室温または冷蔵で保存可能です。

70% エタノール

70%（v/v）のエタノール溶液は滅菌や DNA のエタノール沈殿などに使用されます。

70% エタノール 1 L 用 レシピ

700 mL のエタノールに水を加え 1 L にメスアップします。
滅菌用に用いる場合は脱イオン水を使用しますが、DNA のエタノール沈殿における DNA の洗浄などに用いる場合は純水や滅菌した純水を使用します。
オートクレーブやフィルターろ過による滅菌は不要です。

4 L 缶入りエタノール（99.5%）

注ぎ口付属

女性も軽々 4 L

省スペース

縦 × 横 × 高さ : 約 17 × 13 × 25 cm

	製品情報	カタログ番号
エタノール（99.5%）	4 L 缶入り 試薬特級	09-0770-4-4L-J

水酸化ナトリウム溶液

様々なバッファーの pH 調整によく利用されます。5N（5 規定）の濃度の溶液がよく使われます。

5N 水酸化ナトリウム溶液　100 mL 用レシピ

約 70 mL の脱イオン水をビーカーに入れ、水酸化ナトリウム 20.0 g を加えて、スターラーなどを用いて完全に溶かします。
100 mL になるように脱イオン水でメスアップします。
溶液は室温で保存可能です（オートクレーブは必要ありません）。
水酸化ナトリウム溶液は強いアルカリ性になり、腐食性があるので十分に気をつけてお取り扱いください。

調製済み製品の紹介	製品情報	カタログ番号
5.0M 水酸化ナトリウム 溶液	水溶液	S8263

付録

モル濃度の計算

生物学の実験では濃度を表す単位としてモル濃度がよく利用されています。モル（mol）とは物質の量を表していて、生物や化学の反応は物質の量が反応系に関わるためモルが使われます。

物質の量 mol はその物質の分子量と質量から算出することができます。

$$\frac{\text{質量 g}}{\text{分子量}} = \text{モル数 mol}$$

生物学の実験で溶液を扱うとき一般的に用いられるモル濃度の単位は mol/L（M, モーラー）でその物質が含まれる 1 リットルの溶液中に何 mol の物質が含まれているかを示します。

$$\frac{\text{モル数 mol}}{\text{溶液の量 L}} = \text{モル濃度 M（mol/L）}$$

この式からモル濃度とその溶液に含まれる質量の関係は次式になります。

$$\frac{\text{質量 g}}{\text{分子量}} \div \text{溶液の量 L} = \text{モル濃度 M（mol/L）}$$

このことから、あるモル濃度の溶液を作るために必要な質量は次のように求められます。

$$\text{質量 g} = \text{モル濃度 M（mol/L）} \times \text{分子量} \times \text{溶液の量 L}$$

【計算例】　0.5 M 塩化ナトリウム溶液を 100 mL 作成する場合に必要な塩化ナトリウムの量　（塩化ナトリウムの分子量は 58.44）

0.5 M x 分子量 58.44 x 0.1 L = 2.9 g

必要な塩化ナトリウムの量は 2.9 g ということが分かります。

また、プライマー（オリゴ DNA）などマイクログラム単位の微量な物質を取り扱う場合もよくあります。微量な質量でも上記の式に当てはめて濃度の算出などを行うことができます。質量の単位をグラムの 1/1000 であるミリグラムに変えて記述すると、次のようになります。
ミリモル濃度の単位 mmol/L は一般的に mM と書かれます。

$$\frac{\text{質量 mg}}{\text{分子量}} \div \text{溶液の量 L} = \text{モル濃度 mM (mmol/L)}$$

プライマー（オリゴ DNA）の溶液調製では、納品された凍結粉末状態のオリゴ DNA を溶かして目的の濃度に調整したいというケースがよく起こります。上記の式を変換して必要な溶液の量は次のように求められます。

$$\text{溶液の量 L} = \frac{\text{質量 mg}}{\text{分子量}} \div \text{モル濃度 mM (mmol/L)}$$

取り扱う量から考えて溶液の量を L の単位ではなく、mL もしくはそれ以下になると予想されますので、計算を簡易にするため mL に変換すると次のようになります。（左辺を L の 1/1000 単位の mL にしたので、右辺の mg も 1/1000 単位の µg になります）

$$\text{溶液の量 mL} = \frac{\text{質量 µg}}{\text{分子量}} \div \text{モル濃度 mM (mmol/L)}$$

この式を用いれば、入手したある質量のオリゴ DNA を目的の濃度にするために必要な溶液（この場合は一般的に水や TE バッファー）の量が算出できます。

【計算例】 納品されたプライマー（オリゴ DNA）が 520 µg、分子量が 6408※で、このプライマーの 100 µM 溶液を調製したいとき何 µL に溶解すればよいか？

※ 通常購入したオリゴ DNA のラベルにはチューブに入っている質量とそのオリゴ DNA の分子量が記載されています

100 µM = 0.1 mM なので上記の式に当てはめると

520 µg/ 分子量 6408/0.1 mM= 0.811 mL

このことから 0.811 mL = 811 µL に溶解すると 100 µM 溶液になります。

前述のようにモル濃度や質量、溶液の量は計算式によって算出することができますが、自動で計算を行う便利なウェブサイトがあります。
この計算ツールを使うと質量や分子量、溶液の量を入力するだけで濃度の計算を行えます。

じっけんレシピのページ
http://bit.ly/recipe-jp
→その他全般（選択ガイド、便利なツール集）
→バッファー計算

ここでは計算ツールの使い方を紹介します。

例えば前項で「0.5M 塩化ナトリウム溶液を 100 mL 作成する場合に必要な塩化ナトリウムの量」について計算しましたが、この計算ツールを使うと次のように直ちに必要な質量が算出されます。

手順　目的の濃度と溶液の量に必要な質量を求める場合

1. 溶解する物質の分子量を Formula weight の欄に入れます。
2. 作成したい溶液の量を Desired final volume の欄に入れます。L、mL、µL の単位で入力。
3. 目的の濃度を Desired concentration の欄に入れます。濃度は M、mM、nM のいずれかを選べます。
4. “Calculator Mass”ボタンをクリックすると必要な質量が現れます。

また、オリゴ DNA のように、質量と分子量が分かっている物質を目的の濃度に溶かすため、必要な溶液の量を求める場合も同様に計算ツールを利用できます。
この場合、求めたいのは溶液の量なので Desired final volume の欄以外を入力し、“Calculator Mass”をクリックすると算出できます。
計算ツールの質量の単位が g（グラム）、濃度の単位が M になっていますので桁を間違えないよう注意して入力してください。

製品リスト

試薬

製品名	製品情報	容量	カタログ番号
アガロース	DNase, RNase フリー	10 g	A9539-10G
		25 g	A9539-25G
		50 g	A9539-50G
		100 g	A9539-100G
		250 g	A9539-250G
		500 g	A9539-500G
アクリルアミド	電気泳動用	100 g	A8887-100G
		500 g	A8887-500G
		1 kg	A8887-1KG
		2.5 kg	A8887-2.5KG
30% アクリルアミド / ビスアクリルアミド 29:1 溶液	電気泳動用	100 mL	A3574-100ML
		5x100 mL	A3574-5X100ML
		5 L	A3574-5L
ウシ血清アルブミン（BSA）	一般的な用途、タンパク質のブロッティング、免疫染色に使用	10 g	A7906-10G
		50 g	A7906-50G
		100 g	A7906-100G
		500 g	A7906-500G
		1 kg	A7906-1KG
ウシ血清アルブミン（BSA）	サザンブロットに使用されます	1 g	B4287-1G
		5 g	B4287-5G
		25 g	B4287-25G
ウシ由来アセチル化アルブミン（アセチル化 BSA）	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	10 mg	B2518-10MG
		25 mg	B2518-25MG
		100 mg	B2518-100MG
		150 mg	B2518-150MG
		250 mg	B2518-250MG
		500 mg	B2518-500MG
アンピシリンナトリウム塩	細胞培養テスト済み	5 g	A0166-5G
		25 g	A0166-25G
		100 g	A0166-100G
アンピシリンナトリウム塩		5 g	A9518-5G
		25 g	A9518-25G
		100 g	A9518-100G
アンピシリン溶液	100 mg/mL	10 mL	A5354-10ML
3- メチル -1- ブタノール（イソアミルアルコール）	分子生物学用	25 mL	I9392-25ML
		500 mL	I9392-500ML
イソプロパノール（2- プロパノール）	分子生物学用	25 mL	I9516-25ML
		4x25 mL	I9516-4X25ML
		500 mL	I9516-500ML
ウシ腸由来ホスファターゼ（CIP）		500 units	P4978-500UN
		1000 units	P4978-1KU
エタノール	試薬特級	500 mL	09-0770-5-500ML-J
		3 L	09-0770-3-3L-J
		4 L	09-0770-4-4L-J
		18 L	09-0770-8-18L-J
塩化カルシウム 2 水和物	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	100 g	C3306-100G
		250 g	C3306-250G
		500 g	C3306-500G
塩化ナトリウム	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	500 g	S3014-500G
		1 kg	S3014-1KG
		5 kg	S3014-5KG
		10 kg	S3014-10KG
塩化マグネシウム		100 g	M8266-100G
		1 kg	M8266-1KG
塩化マグネシウム 6 水和物		100 g	M2670-100G
		500 g	M2670-500G
		1 kg	M2670-1KG
塩酸		100 mL	H1758-100ML
		500 mL	H1758-500ML
過塩素酸ナトリウム（$NaClO_4$）		100 g	410241-100G
		500 g	410241-500G
過硫酸アンモニウム	電気泳動用	25 g	A3678-25G
		100 g	A3678-100G

続き

製品名	製品情報	容量	カタログ番号
カナマイシン硫酸塩	細胞培養テスト済み	1 g	K1377-1G
		5 g	K1377-5G
		25 g	K1377-25G
カナマイシン硫酸塩	動物成分フリー	1 g	K4000-1G
		5 g	K4000-5G
		25 g	K4000-25G
		50 g	K4000-50G
カルベニシリン溶液	100 mg/mL	1 mL	C1613-1ML
寒天（アガー）	バクテリア培養用	100 g	A1296-100G
		500 g	A1296-500G
		1 kg	A1296-1KG
		5 kg	A1296-5KG
		10 kg	A1296-10KG
		25 kg	A1296-25KG
キシレンシアノール FF		10 g	X4126-10G
グリシン	電気泳動用	500 g	G8898-500G
		1 kg	G8898-1KG
グリセロール	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	100 mL	G5516-100ML
		500 mL	G5516-500ML
		1 L	G5516-1L
		4 L	G5516-4L
グルコース	D-（+）-Glucose	10 mg	G7528-10MG
		250 g	G7528-250G
		1 kg	G7528-1KG
		5 kg	G7528-5KG
クロラムフェニコール		5 g	C0378-5G
		25 g	C0378-25G
		100 g	C0378-100G
		500 g	C0378-500G
		1 kg	C0378-1KG
クロラムフェニコール	植物細胞培養テスト済み	5 g	C1919-5G
		25 g	C1919-25G
		100 g	C1919-100G
クロロホルム		100 mL	288306-100ML
		1 L	288306-1L
クロロホルム	試薬特級	500 mL	05-3400-5-500ML-J
		3 L	05-3400-3-3L-J
ゲルローディング溶液	アガロースゲル電気泳動用	5 mL	G2526-5ML
ゲルローディング溶液	非変性ポリアクリルアミド電気泳動用	5 mL	G7654-5ML
酵母抽出物 Yeast extract	バクテリア培養用	250 g	Y1625-250G
		1 kg	Y1625-1KG
酢酸ナトリウム		250 g	S2889-250G
		1 kg	S2889-1KG
		5 kg	S2889-5KG
酢酸ナトリウム三水和物		250 g	S7670-250G
		500 g	S7670-500G
		1 kg	S7670-1KG
		5 kg	S7670-5KG
2x Laemmli サンプルバッファー	電気泳動用	10x6 mL	S3401-10VL
ジエチルピロカーボネート（DEPC）		5 mL	D5758-5ML
		25 mL	D5758-25ML
		50 mL	D5758-50ML
		100 mL	D5758-100ML
シクロスポリン A		5 mg	C1832-5MG
		10 mg	C1832-10MG
シクロヘキシミド溶液	100 mg/mL	1 mL	C4859-1ML
DL- ジチオトレイトール	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	250 mg	D9779-250MG
		1 g	D9779-1G
		5 g	D9779-5G
		10 g	D9779-10G
		25 g	D9779-25G
		50 g	D9779-50G
ジメチルスルホキシド（DMSO）	DNase, RNase フリー	50 mL	D8418-50ML
		100 mL	D8418-100ML
		250 mL	D8418-250ML
		500 mL	D8418-500ML
		1 L	D8418-1L
ジメチルホルムアミド（DMF）	分子生物学用	250 mL	D4551-250ML
		500 mL	D4551-500ML

続き

製品名	製品情報	容量	カタログ番号
臭化エチジウム（エチジウムブロマイド、EtBr）	電気泳動用	1 g	E7637-1G
		5 g	E7637-5G
		25 g	E7637-25G
臭化エチジウム溶液	0.5 mg/mL（水溶液）	5 mL	E1385-5ML
臭化エチジウム溶液	10 mg/mL（水溶液）	10 mL	E1510-10ML
臭化ヘキサジメトリン		5 g	H9268-5G
		10 g	H9268-10G
		50 g	H9268-50G
		100 g	H9268-100G
水酸化ナトリウム		500 g	S8045-500G
		1 kg	S8045-1KG
水酸化ナトリウム溶液	5M 水溶液	150 mL	S8263-150ML
スクロース（ショ糖）	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	500 g	S0389-500G
ストレプトマイシン		5 g	S6501-5G
		25 g	S6501-25G
		50 g	S6501-50G
		100 g	S6501-100G
		1 kg	S6501-1KG
スペクチノマイシン		5 g	S9007-5G
		25 g	S9007-25G
スペクチノマイシン溶液	100 mg/mL	1 mL	S0692-1ML
スペクチノマイシン硫酸塩		25 g	S9137-25G
		100 g	S9137-100G
10mM dNTP 溶液 （デオキシヌクレオチドミックス）	DNase, RNase フリー	0.2 mL	D7295-.2ML
		0.5 mL	D7295-.5ML
		20x.2 mL	D7295-20X.2ML
		5 mL	D7295-5ML
テトラサイクリン塩酸塩		25 g	87128-25G
		100 g	87128-100G
テトラサイクリン塩酸塩	細胞培養テスト済み	25 g	T7660-25G
ドキシサイクリンハイクレート		1 g	D9891-1G
		5 g	D9891-5G
		10 g	D9891-10G
		25 g	D9891-25G
		100 g	D9891-100G
ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）	電気泳動用、分子生物学用	25 g	L3771-25G
		100 g	L3771-100G
		500 g	L3771-500G
		1 kg	L3771-1KG
ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）溶液	10% 水溶液	100 mL	71736-100ML
		500 mL	71736-500ML
siRNA 用トランスフェクション試薬	siRNA 用トランスフェクション用	100 µL	S1452-100UL
		1 mL	S1452-1ML
10x 泳動バッファー（トリス - グリシン -SDS バッファー）	電気泳動用	1 L	T7777-1L
10x トリス - グリシンバッファー	0.25 M トリス , 1.92 M グリシン , pH 約 8.3	1 L	T4904-1L
トリス塩基（Trizma 塩基）	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	100 g	T6066-100G
		500 g	T6066-500G
		1 kg	T6066-1KG
		5 kg	T6066-5KG
トリス塩酸バッファー 1M 溶液 , pH 7.0	DNase, RNase, プロテアーゼフリー、細胞培養用	100 mL	T1819-100ML
		1 L	T1819-1L
トリス塩酸バッファー 1M 溶液 , pH 7.2	DNase, RNase, プロテアーゼフリー、細胞培養用	100 mL	T2069-100ML
トリス塩酸バッファー 1M 溶液 , pH 7.2	DNase, RNase, プロテアーゼフリー、細胞培養用	1 L	T2069-1L
トリス塩酸バッファー 1M 溶液 , pH 7.4	DNase, RNase, プロテアーゼフリー、細胞培養用	100 mL	T2194-100ML
		1 L	T2194-1L
トリス塩酸バッファー 1M 溶液 , pH 7.4	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	1 L	T2663-1L
トリス塩酸バッファー 1M 溶液 , pH 7.5	DNase, RNase, プロテアーゼフリー、細胞培養用	100 mL	T2319-100ML
		1 L	T2319-1L
トリス塩酸バッファー 1M 溶液 , pH 7.6	DNase, RNase, プロテアーゼフリー、細胞培養用	1 L	T2444-1L
トリス塩酸バッファー 1M 溶液 , pH 7.8	DNase, RNase, プロテアーゼフリー、細胞培養用	100 mL	T2569-100ML
		1 L	T2569-1L
トリス塩酸バッファー 1M 溶液 , pH 8.0	DNase, RNase, プロテアーゼフリー、細胞培養用	100 mL	T2694-100ML
		1 L	T2694-1L
トリス塩酸バッファー 1M 溶液 , pH 8.0	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	1 L	T3038-1L
トリス塩酸バッファー 1M 溶液 , pH 9.0	DNase, RNase, プロテアーゼフリー、細胞培養用	100 mL	T2819-100ML
		1 L	T2819-1L

続き

製品名	製品情報	容量	カタログ番号
トリス塩酸バッファー 2M 溶液 , pH 7.5	DNase, RNase, プロテアーゼフリー、細胞培養用	1 L	T2944-1L
トリス塩酸バッファー 2M 溶液 , pH 8.0	DNase, RNase, プロテアーゼフリー、細胞培養用	100 mL	T3069-100ML
		1 L	T3069-1L
トリス塩酸塩（Trizma HCl）	DNase, RNase, プロテアーゼフリー、細胞培養用	100 g	T5941-100G
		500 g	T5941-500G
		1 kg	T5941-1KG
トリプトン（Tryptone）	バクテリア培養用	250 g	T7293-250G
		1 kg	T7293-1KG
ハイグロマイシン B	細胞培養テスト済み	50 mg	H3274-50MG
		100 mg	H3274-100MG
		250 mg	H3274-250MG
		5x100 mg	H3274-5X100MG
		1 g	H3274-1G
ハイグロマイシン B 溶液	45-60 mg/mL	250 mg	H0654-250MG
		500 mg	H0654-500MG
		1 g	H0654-1G
ビスアクリルアミド	電気泳動用	25 g	M7279-25G
		100 g	M7279-100G
		250 g	M7279-250G
8- ヒドロキシキノリン		25 g	H6878-25G
		100 g	H6878-100G
		500 g	H6878-500G
ピューロマイシン 2 塩酸塩		10 mg	P8833-10MG
		25 mg	P8833-25MG
		100 mg	P8833-100MG
ピューロマイシン溶液	10 mg/mL	10 mL	P9620-10ML
フェノール	結晶、分子生物学用	25 g	P1037-25G
		100 g	P1037-100G
		500 g	P1037-500G
フェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール 25:24:1	別容器で 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA が添付	100 mL	P2069-100ML
		400 mL	P2069-400ML
フェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール 25:24:1	10 mM トリス（pH 8.0, 1 mM EDTA 含有）飽和溶液	100 mL	P3803-100ML
		400 mL	P3803-400ML
フェノールクロロホルム 5:1	RNA 抽出用	100 mL	P1944-100ML
		400 mL	P1944-400ML
中性平衡化中性フェノール		100 mL	P4557-100ML
		400 mL	P4557-400ML
酸性飽和フェノール溶液	0.1M クエン酸バッファー , pH4.3	100 mL	P4682-100ML
		400 mL	P4682-400ML
ブリリアントブルー R		5 g	B0149-5G
		25 g	B0149-25G
		100 g	B0149-100G
		500 g	B0149-500G
ブリリアントブルー R 濃縮液	水で 1 L に希釈して使用（希釈後の組成 0.25% ブリリアントブル -R、40% メタノール、7% 酢酸）	1 L 用	B8647-1EA
プロテイナーゼ K		5 mg	P2308-5MG
		10 mg	P2308-10MG
		25 mg	P2308-25MG
		100 mg	P2308-100MG
		500 mg	P2308-500MG
		1 g	P2308-1G
ブロモフェノールブルー	電気泳動用	5 g	B8026-5G
		25 g	B8026-25G
SDS-PAGE 分子量マーカー	着色済み広範囲マーカー	500 µL (約 50 回分)	C1992-1VL
SDS-PAGE 分子量マーカー	着色済み超低分子量マーカー	200 µL (約 20 回分)	C6210-1VL
アガロースゲル電気泳動用分子量マーカー	1 kb ラダーマーカー	約 100 回分	D3937-1VL
アガロースゲル電気泳動用分子量マーカー	100 bp ラダーマーカー	約 75 回分	D3687-1VL
アガロースゲル電気泳動用分子量マーカー	50 bp ラダーマーカー	約 100 回分	D3812-1VL
アガロースゲル電気泳動用分子量マーカー	広範囲用ラダーマーカー	約 100 回分	D7058-1VL
アガロースゲル電気泳動用分子量マーカー	20 bp ラダーマーカー	約 80 回分	P1598-40UG
ホウ酸	電気泳動用	500 g	B7901-500G
		1 kg	B7901-1KG
水	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	1 L	W4502-1L
		10 L	W4502-10L
メタノール	試薬特級	500 mL	19-2410-5-500ML-J
		3 L	19-2410-3-3L-J
		4 L	19-2410-4-4L-J
		18 L	19-2410-8-14KG-J

続き

製品名	製品情報	容量	カタログ番号
2- メルカプトエタノール	電気泳動用	25 mL	M3148-25ML
		100 mL	M3148-100ML
		250 mL	M3148-250ML
リゾチウム溶液、ニワトリ卵白由来	10 mg/mL	10x1 mL	L3790-10X1ML
リゾチウム、ニワトリ卵白由来		5 g	L6876-5G
		10 g	L6876-10G
		25 g	L6876-25G
		100 g	L6876-100G
硫酸プロタミン		10 g	P3369-10G
		100 g	P3369-100G
硫酸マグネシウム		500 g	M2643-500G
		1 kg	M2643-1KG
リン酸 2 水素カリウム（KH_2PO_4）	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	100 g	P9791-100G
		500 g	P9791-500G
		1 kg	P9791-1KG
リン酸水素 2 カリウム（KH_2PO_4）	試薬特級	500 g	24-5240-5-500G-J
リン酸水素 2 ナトリウム 12 水和物（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$）	試薬特級	500 g	28-3720-5-500G-J
リン酸水素二ナトリウム	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	250 g	S3264-250G
		500 g	S3264-500G
		1 kg	S3264-1KG
On-Column DNase I Digestion Set	精製する RNA 中の DNA 分解に用いられます	10 回分	DNASE10-1SET
		70 回分	DNASE70-1SET
EDTA		100 g	E6758-100G
		500 g	E6758-500G
EDTA2 ナトリウム 2 水和物	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	50 g	E5134-50G
		100 g	E5134-100G
		250 g	E5134-250G
		500 g	E5134-500G
		1 kg	E5134-1KG
		5 kg	E5134-5KG
EDTA 溶液	0.5 M 水溶液、分子生物学用	100 mL	E7889-100ML
G418 硫酸塩		1 g	A1720-1G
		5 g	A1720-5G
		25 g	A1720-25G
HEPES	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	25 g	H4034-25G
		100 g	H4034-100G
		500 g	H4034-500G
		1 kg	H4034-1KG
イソプロピル β -D-1- チオガラクトピラノシド（IPTG）		1 g	I5502-1G
		5 g	I5502-5G
		10 g	I5502-10G
IPTG 溶液	200 mM	5 mL	I1284-5ML
LB 培地（Miller）	粉末	1 kg	L3522-1KG
LB 寒天培地（Lennox）	粉末	250 g	L2897-250G
		1 kg	L2897-1KG
LB 寒天培地（Lennox）	錠剤	100 錠	L7025-100TAB
		500 錠	L7025-500TAB
LB 寒天培地（Lennox）	EZMIX 粉末	6x500 mL	L7533-6X500ML
		1 kg	L7533-1KG
LB 寒天培地（Miller）	粉末	250 g	L3147-250G
		1 kg	L3147-1KG
LB 培地（Lennox）	粉末	250 g	L3022-250G
		1 kg	L3022-1KG
LB 培地（Lennox）	錠剤	100 錠	L7275-100TAB
		500 錠	L7275-500TAB
LB 培地（Lennox）	EZMIX 粉末	6x500 mL	L7658-6X500ML
		2x5 L	L7658-2X5L
		1 kg	L7658-1KG
		5 kg	L7658-5KG
LB 培地（Miller）	溶液	500 mL	L2542-500ML
LB 培地（Miller）	粉末	250 g	L3522-250G

続き

製品名	製品情報	容量	カタログ番号
MOPS	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	25 g	M3183-25G
		100 g	M3183-100G
		500 g	M3183-500G
		1 kg	M3183-1KG
MystiCq ™ microRNA cDNA Synthesis Mix	マイクロ RNA からの cDNA 合成用酵素ミックス	25 回分	MIRRT-25RXN
		100 回分	MIRRT-100RXN
MystiCq™ Universal PCR primer	マイクロ RNA からの cDNA 合成用ユニバーサルプライマー	500 回分	MIRUP-500RXN
PIPES	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	25 g	P1851-25G
		100 g	P1851-100G
		500 g	P1851-500G
		1 kg	P1851-1KG
RNAlater ™	RNA 抽出用サンプルの保存液	5 mL	R0901-5ML
		100 mL	R0901-100ML
		500 mL	R0901-500ML
リボヌクレアーゼ A（RNase A）	粉、ウシ膵臓由来	10 mg	R6513-10MG
		50 mg	R6513-50MG
		250 mg	R6513-250MG
		500 mg	R6513-500MG
		1 g	R6513-1G
リボヌクレアーゼ A（RNase A）溶液	20-40 mg/mL、ウシ膵臓由来	10 mg	R4642-10MG
		50 mg	R4642-50MG
		250 mg	R4642-250MG
		1 g	R4642-1G
RNaseZAP ™	RNase 除去用の溶液	250 mL	R2020-250ML
		6x250 mL	R2020-6X250ML
SOB 培地	粉	500 g	H8032-500G
SOC 培地	溶液	10x5 mL	S1797-10X5ML
		100 mL	S1797-100ML
SYBR® グリーン II RNA ゲル染色試薬	10,000x 溶液	0.5 mL	S9305-.5ML
SYBR® グリーン I 核酸ゲル染色試薬	10,000x 溶液	0.5 mL	S9430-.5ML
		1 mL	S9430-1ML
10xTAE バッファー	電気泳動用	1 L	T9650-1L
		4 L	T9650-4L
Taq DNA ポリメラーゼ		250units	D1806-250UN
		1500units	D1806-1.5KU
		5000units	D1806-5KU
JumpStart ™ Taq DNA ポリメラーゼ	ホットスタート用 DNA ポリメラーゼ	50units	D9307-50UN
		250units	D9307-250UN
		1500units	D9307-1.5KU
REDTaq ™ ReadyMix ™ PCR Reaction Mix with $MgCl_2$		20 回分	R2523-20RXN
		100 回分	R2523-100RXN
10x TBE バッファー	DNase, RNase フリー	1 L	T4415-1L
		4 L	T4415-4L
		10 L	T4415-10L
TB 培地	粉末	250 g	T0918-250G
		1 kg	T0918-1KG
TB 培地	溶液	500 mL	T5574-500ML
TB 培地	EZMIX 粉末	6x500 mL	T9179-6X500ML
		2x5 L	T9179-2X5L
		1 kg	T9179-1KG
TEMED	電気泳動用	25 mL	T9281-25ML
		50 mL	T9281-50ML
		100 mL	T9281-100ML
TES	DNase, RNase, プロテアーゼフリー	25 g	T5691-25G
		100 g	T5691-100G
		500 g	T5691-500G
100x TE バッファー	DNase, RNase フリー	100 mL	T9285-100ML
TRI Reagent ™	一般サンプル用 RNA 単離用液	25 mL	T9424-25ML
		100 mL	T9424-100ML
		200 mL	T9424-200ML
TRI Reagent® BD	血液サンプル用 RNA 単離用液	25 mL	T3809-25ML
		100 mL	T3809-100ML
		200 mL	T3809-200ML
TRI Reagent® LS	液体サンプル用 RNA 単離用液	100 mL	T3934-100ML
		200 mL	T3934-200ML

続き

製品名	製品情報	容量	カタログ番号
Triton X 100	分子生物学用	50 mL	T8787-50ML
		100 mL	T8787-100ML
		250 mL	T8787-250ML
Trizma Pre-set crystals	pH 7.4, 平均分子量 151.6	100 g	T7693-100G
		250 g	T7693-250G
TruPAGE プレキャストゲル グラジエントゲル 4-12%	10 x 10 cm, 12 ウェル	10 枚	PCG2003-10EA
TruPAGE プレキャストゲル グラジエントゲル 4-12%	10 x 10 cm, 17 ウェル	10 枚	PCG2007-10EA
TruPAGE プレキャストゲル グラジエントゲル 4-12%	10 x 8 cm, 12 ウェル	10 枚	PCG2011-10EA
TruPAGE プレキャストゲル グラジエントゲル 4-12%	10 x 8 cm, 17 ウェル	10 枚	PCG2015-10EA
TruPAGE プレキャストゲル グラジエントゲル 4-20%	10 x 10 cm, 12 ウェル	10 枚	PCG2004-10EA
TruPAGE プレキャストゲル グラジエントゲル 4-20%	10 x 10 cm, 17 ウェル	10 枚	PCG2008-10EA
TruPAGE プレキャストゲル グラジエントゲル 4-20%	10 x 8 cm, 12 ウェル	10 枚	PCG2012-10EA
TruPAGE プレキャストゲル グラジエントゲル 4-20%	10 x 8 cm, 17 ウェル	10 枚	PCG2016-10EA
TruPAGE プレキャストゲル 均一ゲル 10%	10 x 10 cm, 12 ウェル	10 枚	PCG2001-10EA
TruPAGE プレキャストゲル 均一ゲル 10%	10 x 10 cm, 17 ウェル	10 枚	PCG2005-10EA
TruPAGE プレキャストゲル 均一ゲル 10%	10 x 8 cm, 12 ウェル	10 枚	PCG2009-10EA
TruPAGE プレキャストゲル 均一ゲル 10%	10 x 8 cm, 17 ウェル	10 枚	PCG2013-10EA
TruPAGE プレキャストゲル 均一ゲル 12%	10 x 10 cm, 12 ウェル	10 枚	PCG2002-10EA
TruPAGE プレキャストゲル 均一ゲル 12%	10 x 10 cm, 17 ウェル	10 枚	PCG2006-10EA
TruPAGE プレキャストゲル 均一ゲル 12%	10 x 8 cm, 12 ウェル	10 枚	PCG2010-10EA
TruPAGE プレキャストゲル 均一ゲル 12%	10 x 8 cm, 17 ウェル	10 枚	PCG2014-10EA
TruPAGE 用 LDS サンプルバッファー	4x 溶液	10 mL	PCG3009-10ML
TruPAGE 用 TEA-MOPS SDS Express 泳動バッファー	20x 溶液	500 mL	PCG3003-500ML
TruPAGE 用 TEA-Tricine SDS 泳動バッファー	20x 溶液	500 mL	PCG3001-500ML
TruPAGE 用 DTT サンプル還元剤	10x 溶液	1 mL	PCG3005-1ML
TruPAGE 用 泳動中の酸化防止剤	800x 溶液	10 mL	PCG3007-10ML
TruPAGE 用 転写バッファー	20x 溶液	500 mL	PCG3011-500ML
Tween 20	DNase, RNase フリー	50 mL	P9416-50ML
		100 mL	P9416-100ML
X-gal		50 mg	B4252-50MG
		100 mg	B4252-100MG
		250 mg	B4252-250MG
		500 mg	B4252-500MG
		1 g	B4252-1G
		5 g	B4252-5G

キット

プラスミド精製

製品名	使用回数	カタログ番号
プラスミド精製キット　5 分間ミニプレップ	10 回分	PFM10-1KT
	50 回分	PFM50-1KT
	250 回分	PFM250-1KT
プラスミド精製キット　ミニプレップ	70 回分	PLN70-1KT
	350 回分	PLN350-1KT
プラスミド精製キット　HP ミニプレップ	70 回分	NA0150-1KT
	350 回分	NA0160-1KT
プラスミド精製キット　ミディプレップ	35 回分	PLD35-1KT
プラスミド精製キット　HP ミディプレップ	25 回分	NA0200-1KT
プラスミド精製キット　マキシプレップ	15 回分	PLX15-1KT
プラスミド精製キット　HP マキシプレップ	4 回分	NA0300S-1KT
	10 回分	NA0300-1KT
	25 回分	NA0310-1KT
プラスミド精製キット　HP メガプレップ	5 回分	NA0500-1KT
エンドトキシンフリープラスミド精製キット　ミディプレップ	35 回分	PLED35-1KT
エンドトキシンフリープラスミド精製キット　マキシプレップ	15 回分	PLEX15-1KT
エンドトキシンフリープラスミド精製キット　HP マキシプレップ	4 回分	NA0400S-1KT
	10 回分	NA0400-1KT
	25 回分	NA0410-1KT
エンドトキシンフリープラスミド精製キット　HP メガプレップ	5 回分	NA0600-1KT
エンドトキシンフリープラスミド精製キット　HP ギガプレップ	5 回分	NA0800-1KT

RNA精製

製品名	使用回数	カタログ番号
哺乳動物用 Total RNA ミニプレップキット	10 回分	RTN10-1KT
	70 回分	RTN70-1KT
	350 回分	RTN350-1KT
植物用 Total RNA ミニプレップキット	10 回分	STRN10-1KT
	50 回分	STRN50-1KT
	250 回分	STRN250-1KT
mRNA Miniprep Kit	10 回分	MRN10-1KT
	70 回分	MRN70-1KT
Direct mRNA Miniprep Kits	10 回分	DMN10-1KT
	70 回分	DMN70-1KT
microRNA 精製キット	10 回分	SNC10-1KT
	50 回分	SNC50-1KT

ゲノムDNA精製

製品名	使用回数	カタログ番号
哺乳動物用 ゲノム DNA ミニプレップキット	10 回分	G1N10-1KT
	70 回分	G1N70-1KT
	350 回分	G1N350-1KT
植物用 ゲノム DNA ミニプレップキット	70 回分	G2N70-1KT
血液用 ゲノム DNA ミニプレップキット	70 回分	NA2010-1KT
バクテリア用 ゲノム DNA ミニプレップキット	10 回分	NA2100-1KT
	70 回分	NA2110-1KT
	350 回分	NA2120-1KT

ダイレクトPCR

製品名	使用回数	カタログ番号
哺乳動物組織用　Extract-N-Amp	抽出　100 回、PCR 100 回	XNAT2-1KT
	抽出 1000 回、PCR1000 回	XNAT2R-1KT
哺乳動物組織用　REDExtract-N-Amp	抽出　100 回、PCR 100 回	XNAT-100RXN
	抽出 1000 回、PCR1000 回	XNAT-1000RXN
哺乳動物組織用　SYBR Green Extract-N-Amp	抽出　100 回、PCR 100 回	XNATG-1KT
	抽出 1000 回、PCR1000 回	XNATRG-1KT

製品リスト

続き

製品名	使用回数	カタログ番号
血液用　Extract-N-Amp	抽出　100 回、PCR 100 回	XNAB2-1KT
	抽出 1000 回、PCR1000 回	XNAB2R-1KT
血液用　REDExtract-N-Amp	抽出　10 回、PCR　10 回	XNABS-1KT
	抽出　100 回、PCR 100 回	XNAB-1KT
	抽出　100 回、PCR 500 回	XNABE-1KT
	抽出 1000 回、PCR1000 回	XNABR-1KT
植物用　Extract-N-Amp	抽出　100 回、PCR 100 回	XNAP2-1KT
	抽出　100 回、PCR 500 回	XNAP2E-1KT
植物用　REDExtract-N-Amp	抽出　10 回、PCR　10 回	XNAPS-1KT
	抽出　100 回、PCR 100 回	XNAP-1KT
	抽出　100 回、PCR 500 回	XNAPE-1KT
	抽出 1000 回、PCR1000 回	XNAPR-1KT
植物用　SYBR Green Extract-N-Amp	抽出　100 回、PCR 100 回	XNAPG-1KT
植物種子用　Extract-N-Amp	抽出　100 回、PCR 100 回	XNAS2-1KT
植物種子用　REDExtract-N-Amp	抽出　10 回、PCR　10 回	XNASS-1KT
	抽出　100 回、PCR 100 回	XNAS-1KT
	抽出 1000 回、PCR1000 回	XNASR-1KT

ダイレクトPCR単品

製品名	使用回数	カタログ番号
Extract-N-Amp PCR Reaction Mix	1.2 mL	E3004-1.2ML
	12 mL	E3004-12ML
	125 mL	E3004-125ML
REDExtract-N-Amp PCR Reaction Mix	1.2 mL	R4775-1.2ML
	12 mL	R4775-12ML
	125 mL	R4775-125ML
SYBR Green Extract-N-Amp PCR ReadyMix	1.2 mL	S4320-1.2ML
	12 mL	S4320-12ML
血液サンプル用　Extract-N-Amp PCR ReadyMix	12 mL	P8115-12ML

PCR産物精製

製品名	使用回数	カタログ番号
Diffinity RapidTip	8 本	D1947-8RXN
	96 本	D1947-96RXN
Diffinity RapidTip（LTS ピペット用）	8 本	D1947L-8RXN
	48 本	D1947L-48RXN
	96 本	D1947L-96RXN
Diffinity RapidTip2（LTS ピペット用）	8 本	D2947L-8RXN

アガロースゲルからのDNA抽出

製品名	使用回数	カタログ番号
アガロースゲルからの DNA 抽出キット	70 回分	NA1111-1KT
アガロースゲルからの DNA 抽出スピンカラム（EtBr 除去）	70 回分	56501-70EA

器具

カテゴリ	製品名	入数	カタログ番号
アガロースゲルからの切り出し	x-tracta Gel Extraction Tool	100 個入り	Z722390-100EA
微生物培養用	Greiner dishes（ペトリ皿）	480 枚入り	Z617636-480EA
細胞培養用プラスチック品	細胞培養 60 mm ディッシュ（細胞培養プレート）	500 枚（20 枚 / 包）	SIAL0166-500EA
	細胞培養用 12 ウェルプレート（平底）	50 枚（個別包装）	SIAL0513-50EA
	細胞培養用 24 ウェルプレート（平底）	50 枚（個別包装）	SIAL0526-50EA
	細胞培養用 96 ウェルプレート（平底）	50 枚（個別包装）	SIAL0596-50EA
	細胞培養用 10 mL ピペット	200 本（個別包装）	SIAL1488-200EA

サイエンス系
お役立ちメディア
M-hub

かんたんカタログ検索
カタログ
ファインダー

メルク ライフサイエンス - メールニュース
www.merckmillipore.com/wm

メルク ライフサイエンス公式
SNS、動画コンテンツをご覧ください。

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格（税別）です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2020年12月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

シグマ アルドリッチ ジャパン リサーチ事業部

〒 153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.sigmaaldrich.com/japan

製品に関するお問い合わせは、テクニカルサービスへ
E-mail: jpts@merckgroup.com Tel: 03-6756-8245

在庫照会・ご注文に関するお問い合わせは、カスタマーサービスへ
E-mail: sialjpcs@merckgroup.com Tel: 03-6756-8275 Fax: 03-6756-8301

シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社はメルクのグループ会社です。

RBM209-2012-PDF-H