

パラフィン切片からの PCR

060419

■ プロトコールの特徴:

- ・一般的なパラフィン切片からの PCR 方法に比べ、前処理を大幅に簡便化することが可能
- ・DNA 精製操作時のサンプルロスがなくなるため、微量の DNA を検出することに適する

■ 組織溶解液 SNET:

【SNET の組成】	濃度	試薬濃度	50 ml
Tris・HCl pH8.0	20 mM	1 M	1 ml
EDTA	5 mM	0.5 M	0.5 ml
NaCl	400 mM	5 M	4 ml
SDS	0.3 %	10 %	1.5 ml
		DW	43 ml

分注して使用、低温で析出するので、使用時に温めて溶解

■ Proteinase K (10 mg/ml)

■ AmpDirect Plus / Nova Taq Hot Start DNA Polymerase

島津製作所、241-08890-92: 20 µl 反応系で 500 回分

■ 組織溶解

- ① パラフィン切片を使い捨てのカミソリの刃(フェザー剃刃 S 片刃、品番 FAS-10)でスライドグラスから削り、チューブに移す。
・カミソリの刃は検体ごとに替える。滅菌シャーレの上で行う。
- ② キシレンを 1 ml 入れ、転倒混和する。(検体によっては、55°C 5 分程度加熱する)
- ③ 15,000 rpm、5 min 遠心。
- ④ キシレンを組織に触らないようにチップで捨て、さらにキシレン 1 ml を加え、転倒混和。
- ⑤ 15,000 rpm、5 min 遠心。
- ⑥ キシレンを同様に捨て、エタノール 1 ml 加え、転倒混和。
- ⑦ 15,000 rpm、5 min 遠心。
- ⑧ エタノールを捨て、再度スピンドアウンし、エタノールを捨てる。遠心乾燥機を 5 分かけ、検体とする。
- ⑨ SNET と Proteinase K を 100:2 の割合で混合する。
・Proteinase K の終濃度は、200 µg/ml
- ⑩ 検体に上記混合液を 30 µl 加える。
- ⑪ 55°C、1~3 時間インキュベートし、溶解する。(途中で数回転倒混和し、完全に溶解する。組織が溶解しないようであれば、Proteinase K の濃度を倍量程度増やす。)
- ⑫ 1 µl を PCR に使用。検体によっては、10 倍、100 倍希釈し、PCR の鋳型とする。

■ PCR

PCR 反応液

2 × Ampdirect Plus	10 µl
Primer mix (5 pmole/µl)	1 µl
Nova Taq Hot Start	0.1 µl
Template	1 µl
DW	7.9 µl

PCR サイクル

95 °C	10 min	1 cycle
94 °C	30 sec	40 cycle
55 °C	30 sec	
72 °C	60 sec	
72 °C	7 min	1 cycle