

## レタスからのPCRプロトコール

### DNA抽出 (Edwards法)

※ Edwards 法 : Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Research 19(6): 1349

※ Edwards' DNA extraction buffer

1M Tris-HCl(pH8.0)	10.0 ml (final 0.2M)
5M NaCl	2.5 ml (final 0.25M)
0.5M EDTA(pH8.0)	2.5 ml (final 0.025M)
10% SDS	2.5 ml (final 0.5%)
H2O	32.5 ml
	<hr/>
	50.0 ml

上記のバッファーを、使用する量だけ取り、適当量の Antifoam A (SIGMA 製品)を加える(泡立ちを防ぐため)。

※手順

レタス切片を取りチューブに入れる。

ステンレス球(直径 3mm)、extraction buffer/Antifoam A(0.3ml)を加え、QIAGEN の細胞破碎装置で破碎する。

遠心(4.8K rpm、10min.)

上清を 0.2ml だけ新しいエッペン(容量 1.5ml)に入れる。

Isopropanol を 0.2ml 加え、2min.静置

遠心(4.8K rpm、15 min.)

ppt : 70% Ethanol で洗う。

Dry up

0.1ml の TE を加え、ピペッティングする。

4℃で一晩静置。

遠心(4.8K rpm、5 min.)

上清を PCR に用いる。

### PCR

※PCR 反応液

水	2.095
2X Ampdirect Plus	2.5
50 $\mu$ M primer (forward)	0.04
50 $\mu$ M primer (reverse)	0.04
粗抽出 DNA	0.3
NovaTaq (HS)	0.025
total	<hr/>
	5 $\mu$ L

※ PCR サイクル (PCR 装置 : Veriti 96-Well サーマルサイクラー, 0.2mL (アプライドバイオシステムズ))

(i) 95℃で 2 分、(ii) 94℃で 30 秒、60℃で 30 秒、72℃で 1 分、(iii) 72℃で 2 分。(ii)は 35 サイクル。