

JAS 分析試験ハンドブック

# 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル

改訂第 2 版

## 分析試薬調製編

平成 14 年 6 月 20 日



独立行政法人 農林水産消費技術センター

## はじめに

試薬の調製に当たっては、以下の注意を守ること。

- ・ 特別の指定のある試薬はそれに従い、その他については JIS 特級試薬（あるいは同等グレード）を用いること。
- ・ 使用する純水は、電気伝導率 0.0056 mS/m (25 )以下になるように脱イオン化されたもの（いわゆる超純水）を用いること。
- ・ 調製試薬には試薬名（試薬内容）、濃度、調製者、調製日を明示しておくこと。
- ・ 専用試薬はその旨明示すること。
- ・ 不要となった試薬あるいはコンタミネーションを起こした試薬は速やかに処分すること。
- ・ 試薬の調製は、基本的な量を示しているので、使用量にあわせて適宜量を調製すること。
- ・ 試薬によっては、結晶水の数が違うものもあるので調製の際は十分確認するとともに、採取量を変えることで溶液の調製ができるようにしておくこと。
- ・ 滅菌した試薬は、クリーンベンチ以外の場所で開いた場合には、内部の滅菌状態は破れていることになるので、必要なら再度滅菌する。
- ・ 試薬の調製は、ほとんどの場合、大幅に濃度、pH が違わなければそれほど厳密に行う必要はない。分析の内容をよく理解して必要な精度で試薬の調製を行えばよい。

その他、一般的な化学常識に従うこと。

## 調製試薬一覧

- ( 1 ) 滅菌水
- ( 2 ) 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)
- ( 3 ) 1 mol/L Tris-HCl
- ( 4 ) 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)
- ( 5 ) 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)
- ( 6 ) TE
- ( 7 ) CTAB (セチルトリメチルアンモニウムブロミド) 抽出液
- ( 8 ) CIA
- ( 9 ) PCI  
平衡化中性フェノール
- ( 10 ) ゲルローディング緩衝液(ブルージュース)
- ( 11 ) TAE
- ( 12 ) TBE
- ( 13 ) DNA 分子量マーカー
- ( 14 ) プライマーの使用方法
- ( 15 ) プロテイナーゼ K

( 1 ) 滅菌水

純水を 121℃, 15 分以上オートクレーブで処理したもの。調製後、ガラスビン中で室温保存する。

滅菌水はコンタミネーションの原因となり易いので、できるだけ使用量に見合う分ずつ小分けして、一度開封したものは再使用しないようにする。

( 2 ) 0.5mol/LEDTA (pH8.0)

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

この試薬は種々の使い方をするので、滅菌したものとししないものを作っておくと便利である。

EDTA・2Na・2H <sub>2</sub> O	試薬特級	46.5 g
純水		200mL + a
pH 調整用		
NaOH ( 粒状 )	試薬特級	約 5 g
5 mol/L NaOH		適宜
全量		250mL

ビーカーなどの広口の容器に純水を入れ、スターラーで混ぜながら EDTA を入れる。

粒状の NaOH を加え、EDTA を溶かす。( pH を上げないと EDTA は溶けない )

pH メーターで測りながら 5 mol/L NaOH を加え pH を調整する。

最終液量まで純水を加え、メスアップする。

オートクレーブ滅菌する。室温で保存可能。

( 3 ) 1 mol/L Tris-HCl

Tris : トリス〔ヒドロキシメチル〕アミノメタン

この試薬は種々の使い方をするのでコンタミネーションに注意する。

種々の pH のものが用いられるが、pH 8.0 のものを主に用いる。

Tris	試薬特級	30.3 g
純水		200 mL + a
pH 調整用		
HCl	試薬特級	約 10 mL
全量		250 mL

ビーカーなどの広口の容器に純水を入れ、スターラーで混ぜながら Tris を加え、溶かす。pH メーターで測定しながら HCl を加えていき、pH を調整する。

溶液が室温に戻るまで冷ます。さらに HCl を加えて pH を調整し直す。

最終液量まで純水を加え、メスアップする。

オートクレーブ滅菌する。室温で保存可能。

Tris 溶液の pH は、温度が 1 あがるごとに 0.03 減少する。  
 温度も同時に測定しながら次の計算式により求めた補正值に pH を合わせても良い。  
 ( pH の補正值 ) = ( 指示された pH ) - { ( 現在の液温 ) - 20 } × 0.03

( 4 ) 0.5mol/LTris-HCl (pH 8.0)

この試薬はもっぱらフェノール平衡化用に用いるが、フェノール平衡化用はフェノール蒸気によるフェノール混入の可能性があるので専用試薬として用いる必要がある。

簡単に作製するのであれば、1 mol/L Tris-HCl を滅菌水により 2 倍に希釈すればよい。

Tris	試薬特級	15.1 g
純水		200 mL + a
pH 調整用		
HCl	試薬特級	約 5 mL
全量		250 mL

調製方法は 1 mol/LTris-HCl と同じ。

( 5 ) 0.1mol/LTris-HCl (pH 8.0)

この試薬はもっぱらフェノール平衡化用に用いるが、フェノール平衡化用はフェノール蒸気によるフェノール混入の可能性があるので専用試薬として用いる必要がある。

使用量が少ないので、簡単に作製するのであれば、1 mol/L Tris-HCl を滅菌水により 10 倍に希釈すればよい。

Tris	試薬特級	3.0 g
純水		200 mL + a
pH 調整用		
HCl	試薬特級	約 1 mL
全量		250 mL

調製方法は 1 mol/LTris-HCl と同じ。

( 6 ) TE

10mmol/LTris-HCl (pH8.0); 1 mmol/LEDTA(pH8.0)

1mol/LTris-HCl (pH8.0)	2 mL
0.5 mol/LEDTA(pH8.0)	0.4 mL
滅菌水 (または純水)	約 200mL
全量	200mL

2 mL の 1mol/L Tris-HCl と 0.4 mL の 0.5 mol/L EDTA を採取し、滅菌水により 200 mL にメスアップする。

本来なら正確にメスアップするのであるが、TE の使用方法からみて、滅菌水を 200mL 加えても問題はない。

( 必要ならオートクレーブする ) 室温で保存可能である。

#### ( 7 ) CTAB 抽出液

0.1 mol/L Tris-HCl; 0.02 mol/L EDTA; 1.4mol/L NaCl; 2% CTAB; 1% ポリビニルピロリドン K30; 0.2% 2-メルカプトエタノール

CTAB : Cetyltrimethylammonium bromide; Hexadecyltrimethylammomium ( シグマ社製を用いる )

1mol/L Tris-HCl	10mL
0.5mol/L EDTA	4mL
NaCl	8.18 g
CTAB ( シグマ社製 )	2 g
ポリビニルピロリドン K30 ( 注 )	1 g
2-メルカプトエタノール	200 $\mu$ L
純水	約 80mL+a
全量	100mL

10mL の 1 mol/L Tris-HCl ( pH8.0 )、4 mL の 0.5mol/L EDTA、8.18 g の塩化ナトリウム、2 g の CTAB、1 g のポリビニルピロリドンを温めながら全量 100mL に溶かし、オートクレーブ滅菌の後、冷めたら 200  $\mu$ L のメルカプトエタノールを加える。

( 注 ) ポリビニルピロリドンをを用いると DNA の回収率が落ちる場合がある。

#### ( 8 ) CIA

クロロホルム : イソアミルアルコール = ( 24 : 1 )

クロロホルム	48 mL
イソアミルアルコール	2 mL

ガラスの容器にクロロホルムとイソアミルアルコールを指定された量ずつ入れて混ぜる。遮光して室温で保存する。

#### ( 9 ) PCI

フェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール = ( 25 : 24 : 1 )

ガラスの容器に平衡化済みフェノールと CIA ( 24 : 1 ) を等量ずつ入れて混ぜる。

アルミ箔で覆い、4℃で保存する。4℃で約一ヶ月保存可能である。

#### 中性化フェノールの作製法

フェノールは、強力なタンパク質変性作用を持つ試薬で、腐食性が強く、皮膚については薬品性の火傷を起こすので、取り扱いには十分注意をしなければならない。もし皮膚についてしまった場合は、速やかに大量の流水と石けんで洗い流すこと。核酸抽出用として販売されているフェノールは、無色の結晶である。

フェノールは吸水性があるので、あらかじめ緩衝液で飽和しておく必要がある。また、DNAは酸性条件下ではフェノール層に分配されてしまうため、弱酸性のフェノールはそのままではDNAの抽出に用いることができない。そこで、通常は、フェノールの液性をTris緩衝液などで中性に調整する。

#### 平衡化中性フェノール

フェノール(核酸抽出用)	40 g
8-ヒドロキシキノリン	0.04 g
2-メルカプトエタノール	90 µL
0.5 mol/L EDTA(pH8.0)	90 µL
<hr/>	
0.5 mol/L Tris-HCl(pH8.0)	60mL 以上(フェノール平衡化専用)
0.1 mol/L Tris-HCl(pH8.0)	60mL 以上(フェノール平衡化専用)

フェノール結晶を50mLのポリプロピレンチューブに採る。

0.04 gの8-ヒドロキシキノリンを加える。

0.5 mol/L Tris-HClをチューブにほぼ一杯になるまで加える。

ふたをして、65℃のウォーターバスに入れてフェノールを溶かす。

5-10分間激しく混合する。

2,000 rpmで5分間遠心して、上層の水層を除く。

もう一度0.5 mol/L Tris-HClを加え、15分間混合した後、遠心して水層を除く。

0.1 mol/L Tris-HClを加えて混合し、遠心して水層を除く。

フェノール層のpHを試験紙で確認し、pH7.8以上になるまでこの操作を続ける。

約10 mLの0.1 mol/L Tris-HClを加え、さらにメルカプトエタノール、0.5 mol/L EDTAを加える。

アルミ箔で覆い、平衡化した日付を明記し、4℃あるいは-20℃で保存する。-20℃で保存すると三ヶ月程度は保存可能である。

#### (10) ゲルローディング緩衝液(ブルージュース)

メーカーによってはDNA分子量マーカーを買い添付されていることがある。

BPB: プロモフェノールブルー

XC: キシレンシアノール FF

1 % BPB	2.5mL
1 % XC	2.5mL
0.5 mol/LEDTA	0.02mL
フィコール 400	1.5 g
滅菌水	+ a
<hr/>	
全量	10 mL

BPB、XC を測り、滅菌水を用いてそれぞれ 1 % の水溶液を 10 mL 作る。

BPB、XC、EDTA 溶液と、フィコールを計量し、容器に入れる。

滅菌水を加え、よく混ぜる。室温で保存する。

#### ( 11 ) TAE

Tris-酢酸、EDTA

電気泳動用の緩衝液である。TAE は数 kb 以上の長い DNA の分離に適する。

		1×	50×
Tris	試薬特級	4.84g	242g
酢酸	試薬特級	1,142 $\mu$ l	57.1 mL
0.5 mol/LEDTA		2 mL	100mL
純水		900 mL + a	700mL + a
<hr/>			
	全量	1,000mL	1,000 mL

それぞれの試薬を測り、ビーカーに入れて溶かす。

最終液量までメスアップする。

#### ( 12 ) TBE

Tris-ホウ酸、EDTA

電気泳動用の緩衝液である。TBE は短い DNA の分離に適するので、PCR 産物の泳動には主にこれを用いる。

		1×	50×
Tris	試薬特級	10.8g	540g
ホウ酸	試薬特級	5.5g	275g
0.5 mol/LEDTA		4 mL	200mL
純水		900 mL + a	600mL + a
<hr/>			
	全量	1,000mL	1,000 mL

それぞれの試薬を測り、ビーカーに入れて溶かす。

最終液量までメスアップする。

TAE と TBE は電気泳動で大量に必要なになるので、50 倍濃度のもの（50× と表示）を用意し、使用時に 50 倍希釈して用いるとよい。

#### （13） DNA 分子量マーカー

電気泳動の際に、DNA のおよその大きさを知るために同時に泳動する標準物質。各種の分子量のものが種々の組み合わせで含まれたものが販売されているので、目的とする DNA サイズにあったものを使用すればよい。

原液の濃度が  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L} = 500 \text{ ng}/\mu\text{L}$  の場合、これを目的の濃度に希釈して用いる。使用濃度は  $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$  なので、前記の場合滅菌水で 50 倍に希釈する。これを、ゲルローディング緩衝液と規定量で混合し冷蔵保存しておく。ただしあまり大量に作っておくと、DNase が混入したときに被害が大きくなる。

#### （14） プライマーの使用法

プライマーは、既製のプライマーを発注するか、必要とする DNA 配列のものを合成することになる。

プライマー溶液のコンタミネーション等の異常は、直接結果に影響を与えるので、取り扱いに当たっては、次の注意事項を厳密に守ること。

- ・希釈に使用する TE および滅菌水は、できるだけ使用の間近に滅菌した未開封のものを使用する。
- ・分注・希釈作業は、他の作業と別に PCR 用クリーンベンチ内で行う。
- ・コンタミネーションを起こした場合は速やかに処分する。
- ・凍結融解を繰り返すとプライマーは劣化するので、できるだけ一本のチューブは早めに使い切るようにする。

##### 既製のプライマーの場合

5' プライマー（ $50 \mu\text{mol}/\text{L}$  調製品）、3' プライマー（ $50 \mu\text{mol}/\text{L}$  調製品）又は、5' プライマー・3' プライマー混合品（各  $25 \mu\text{mol}/\text{L}$  調製品）が、(株)ニッポンジーン又は、(株)ファスマックより販売されている。

##### プライマー対溶液の調製

$500 \mu\text{L}$  チューブ（または  $1.5 \text{ mL}$ ）を用意し、5' プライマー・3' プライマー混合品はそのまま、5' プライマーと 3' プライマーが別々になっている場合は等量混合し、チューブに  $20 \mu\text{L}$  ずつ分注する。チューブの蓋にプライマー名とナンバーを書いたシールを貼る。ナンバーは 1 から順に増やして同じ番号を使わないようにする。チューブを  $-20^\circ\text{C}$  冷蔵庫の所定の箱に保存する。箱の上にプライマーの名前を書いたシールを貼る。

##### 使用中のプライマーについて

使用したプライマー対溶液は、チューブの蓋（シール）に赤でチェックを入れて使用中であることを記す。

##### カスタム合成品の場合

DNA のカスタム合成については種々の試薬会社に取り扱っているため、PCR プライマーとして適当なものを発注すればよい。合成 DNA は凍結乾燥した粉末として入手される場合が多いので、これを希釈して用いる必要がある。この場合、希釈濃度が低いほど、保存中に脱プリン化が起これ、プライマーとしての用をなさなくなることがあるので、希釈に当たっては、保存用のプライマー原液と、当面の使用に供するプライマー溶液の 2 段階希釈とする。

#### プライマー原液の調製

プライマーのチューブ（乾燥品）に TE を加え、200  $\mu\text{mol/L}$  とする。チューブは、-20 冷蔵庫の所定の場所に保存する。

TaKaRa Custum DNA の場合、製品に付随する説明書きに以下のように表示している。  
100pmol/  $\mu\text{L}$  にするために加える Buffer(TE)量：  $\mu\text{L}$  （ は、製品ごとに異なる）  
200  $\mu\text{mol/L}$  に調製するためには、  $\mu\text{L}$  の半量の TE を加えればよい。  
（参考）pmol/ $\mu\text{L}$  =  $\mu\text{mol/L}$

#### プライマー対溶液の調製

500  $\mu\text{L}$  チューブ（または 1.5 mL）を用意し、5' プライマー原液を 25  $\mu\text{L}$  取り、滅菌水 75  $\mu\text{L}$  を加え、全量 100  $\mu\text{L}$ 、濃度 50  $\mu\text{mol/L}$  とする。3' プライマー原液を 25  $\mu\text{L}$  取り、滅菌水 75  $\mu\text{L}$  を加え、全量 100  $\mu\text{L}$ 、濃度 50  $\mu\text{mol/L}$  とする。両溶液を混合し、500  $\mu\text{L}$  チューブに 20  $\mu\text{L}$  ずつ分注する（計 10 本）。チューブの蓋にプライマー名とナンバーを書いたシールを貼る。ナンバーは 1 から順に増やして同じ番号を使わないようにする。チューブを -20 冷蔵庫の所定の箱に保存する。箱の上にプライマーの名前を書いたシールを貼る。

#### 使用中のプライマーについて

使用したプライマー対溶液は、チューブの蓋（シール）に赤でチェックを入れて使用中であることを記す。

（注）当然のことながら、厳密に 20  $\mu\text{L}$  である必要はなく、使用しやすい量に分注すればよい。

#### （15） プロテイナーゼ K

プロテイナーゼ K は、ロシュ・ダイアグノスティックス社製、凍結乾燥品を用いる。滅菌した容器にプロテイナーゼ K を計り取り、滅菌水を加えて 20 mg/mL の溶液を作製する。冷凍保存する。