

プロトコール1 人全血 2.4ml*からの抽出

(正常人全血 白血球数 4,000-11,000/ul)

注意：①採血時に抗凝固剤による血液の前処理（0.5M の EDTA 0.24ml を全血 2.16ml に加え転倒混和、全血の EDTA 濃度を 50mM とします。）へパリンは絶対に使用不可

②保存は-20C で凍結

③①で処理した全血に Genomix Solution1 を 4.8ml 加えて混和、これを-20C で凍結保存することがもっとも望ましい保存法です。

*新鮮血を使う場合は抗凝固剤を使用しないでよい。その場合、2.4ml の全血を使用して同じく、以下のプロトコルを展開します。

1. 解凍

①の凍結サンプルの解凍は 37C のインキュベーターで溶解するまで暖める。解けた後は 30-35C で抽出ステップに備える。

2. 室温下の Solution 1 (Lysing) を 4.8ml 加え、十分に転倒混和

3. 68C で 5 分間恒温（ヒートブロックの場合、使用する試験管との密着性がよく溶液が隠れる深さのサイズを選択、交換熱容量の高いものを使用すること。ウォーターバスも良い）

4. 直ちに、室温下のクロロフォルム 7.2ml を加え、すばやく、多くの回数、転倒混和、二層が解消し混ざり合うようにする。ここが黄金ポイント

5. 4から時間を置くことなく、直ちに遠心機にかけ、2,600 x G で 15 分間、遠心分離。

6. 試験管最上部の透明で粘度のある溶液を他の 15ml の試験管へ注ぎ移す、血餅上に残った液はピペット（先端部径の大きなチップを使用）で回収できる。

7. 室温下の Solution 2 を 8ml、回収液の試験管へ加え、柔らかく転倒混和、泡を発生させずに、現れる DNA フィラメントが十分に得られるよう続ける。

8. 1200 x G で 5 分間、遠心分離、DNA をペレット化する。

9. 上澄み液をデカンテーションで、できるだけ多くの量を捨て去る。

10. 室温下の Solution 3 を 4ml 加え、転倒混和、DNA を溶解。溶けない場合は 35C で加温。

11. 溶解後、無水エタノール 8ml を加え転倒混和、DNA を再沈殿させる。

12. 1,000 x G で 5 分間、遠心、ペレット化する。DNA が見えなくなってしまった場合は、チューブを氷で十分 [30 分] 冷やし沈澱を得る。その後、2,600 x G で 10 分間遠心。

13. 液相をデカンテーションで捨て去る。ペレットは形状が保たれるように注意。

14. 2ml の 70%エタノールでペレットを洗浄。液相を捨て去り、チューブをろ紙上に逆さまに立て、エタノールを蒸発させる。（ペレットが乾燥しないように注意）

15. 適量の TE [0.3-1ml] で DNA ペレットを溶解する。