

# Contents

---

<b>Chapter 1 Foreword .....</b>	<b>1-1</b>
Commercial Product Introduction.....	1-2
Principle and Process of Extraction.....	1-5
How to use this Application Guide.....	1-6
<b>Chapter 2 Index .....</b>	<b>2-1</b>
DNA.....	2-2
RNA.....	2-3
<b>Chapter 3 Protocol .....</b>	<b>3-1</b>
3-I Before the experiment.....	3-I-1
<b>DNA</b>	
3-II-i 動物血液からのゲノム DNA 抽出.....	3-II-i-1
3-II-ii 動物組織からのゲノム DNA 抽出.....	3-II-ii-1
3-II-iii 他の動物サンプルからのゲノム DNA 抽出 .....	3-II-iii-1
3-III 植物組織からのゲノム DNA 抽出.....	3-III-1
3-IV 食品からのゲノム DNA 抽出 .....	3-IV-1
3-V 魚および貝からのゲノム DNA 抽出.....	3-V-1
3-VI 昆虫からのゲノム DNA 抽出 .....	3-VI-1
3-VII 細菌からのゲノム・プラスミド DNA 抽出 .....	3-VII-1
3-VIII 培養細胞からのゲノム DNA 抽出.....	3-VIII-1
3-IX ウイルスからのゲノム DNA 抽出.....	3-IX-1
<b>RNA</b>	
3-XI-i 動物血液からの total RNA 抽出 .....	3-XI-i-1
3-XI-ii 動物組織からの total RNA 抽出 .....	3-XI-ii-1
3-XII 植物組織からの total RNA 抽出 .....	3-XII-1
3-XIV 魚および貝からの total RNA 抽出 .....	3-XIV-1
3-XV 昆虫からの total RNA 抽出 .....	3-XV-1
3-XVI 細菌からの total RNA 抽出 .....	3-XVI-1
3-XVII 培養細胞からの total RNA 抽出 .....	3-XVII-1
3-XVIII ウイルスからの total RNA 抽出 .....	3-XVIII-1
<b>Chapter 4 Extraction Protocol .....</b>	<b>4-1</b>
QuickGene-810/QuickGene-800 .....	4-2
QuickGene-Mini80 .....	4-9
QuickGene SP kit.....	4-16

<b>Chapter 5</b>	<b>Troubleshooting .....</b>	<b>5-1</b>
<b>Chapter 6</b>	<b>Appendix .....</b>	<b>6-1</b>
	Reagent Information.....	6-2
	Examples of the Data.....	6-21
	Reference.....	6-36
	Preparation Method of Reagents.....	6-37
	Method for Recovering DNA/RNA from Clogged Cartridge .....	6-39
	Subsequent protocol.....	6-48
	General Information.....	6-50
	Trademark and exclusion item.....	6-55
<b>Chapter 7</b>	<b>Product List .....</b>	<b>7-1</b>

# Chapter 2

## Index

## DNA

サンプル名	種類	番号	ページ
小豆	-	DB-4	3-III-8
アマランサス	-	DB-3	3-III-6
アマランサス種子	-	DB-2	3-III-4
ES細胞	マウス	DG-3	3-VIII-6
ウスバアオノリ	-	DB-12	3-III-21
鱗	-	DD-7	3-V-12
鱗	魚	DD-8	3-V-13
海洋生物	-	DD-4	3-V-7
肝臓	マウス	DA-b-4	3-II-ii-6
牛肉の脂肪	-	DA-b-2	3-II-ii-3
筋肉	魚	DD-10	3-V-15
筋肉	フグ	DD-5	3-V-9
毛	ブタ	DA-c-2	3-II-iii-3
血斑	-	DA-c-1	3-II-iii-2
コイヘルペスウイルス (KHV)	魚の鰓	DH-1	3-IX-2
口腔スワブ	-	DA-c-3	3-II-iii-4
硬組織 (歯、骨)	-	DA-c-6	3-II-iii-8
酵母	-	DF-12	3-VII-21
酵母 (ビーズ破砕法)	-	DF-13	3-VII-22
枯草菌	-	DF-6	3-VII-10
骨髓液	-	DA-a-1	3-II-i-2
小麦粉	-	DC-1	3-IV-2
米	-	DC-2	3-IV-3
細菌	糞便	DF-1	3-VII-2
サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染細胞	-	DH-5	3-IX-9
シジミ	-	DD-3	3-V-5
糸状菌	-	DF-4	3-VII-7
歯髄	-	DA-c-4	3-II-iii-5
植物プランクトン	-	DB-8	3-III-15
シラミ	-	DE-1	3-VI-2
シロイヌナズナ	-	DB-11	3-III-19
腎臓	マウス	DA-b-3	3-II-ii-4
精子	マウス	DA-c-10	3-II-iii-16
成葉	イネ	DB-1	3-III-2
全血	イヌ	DA-a-5	3-II-i-7
全血	トリ	DA-a-3	3-II-i-4
全血	ヒト	DA-a-4	3-II-i-5
ソバ葉	-	DB-9	3-III-16
唾液	-	DA-c-9	3-II-iii-14
ダニ	-	DE-2	3-VI-3
卵	魚	DD-9	3-V-14
単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) ウイルス	ヒト	DH-2	3-IX-4
稚魚	-	DD-1	3-V-2
稚仔	アカイカ	DD-6	3-V-10
爪	-	DA-c-7	3-II-iii-9
TNES-6M 尿素緩衝液中で長期保存された血液	マサバ	DD-2	3-V-3
トウガラシ葉	-	DB-5	3-III-10
豆腐	-	DC-3	3-IV-4
動物組織 (迅速法)	-	DA-b-1	3-II-ii-2
肺	マウス	DA-b-5	3-II-ii-8
パピローマウイルス (HPV)	ヒト	DH-4	3-IX-7
パフィーコート	-	DA-a-2	3-II-i-3
パラフィン包埋サンプル	-	DA-c-8	3-II-iii-12
バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)	-	DF-11	3-VII-19
尾 (破砕法)	マウス	DA-b-6	3-II-ii-10
尾	マウス	DA-b-7	3-II-ii-11
B型肝炎ウイルス (HBV)	血清	DH-3	3-IX-6
PC-12細胞	ラット	DG-4	3-VIII-7
Huh6細胞	ヒト	DG-2	3-VIII-4
ヒラタケ	-	DB-7	3-III-14
ピロリ菌	-	DF-7	3-VII-11
ピロリ菌	ヒト糞便	DF-14	3-VII-24
フォスミド	大腸菌	DF-2	3-VII-5
プラスミド	大腸菌	DF-15	3-VII-26
HepG2細胞	ヒト	DG-1	3-VIII-2
ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP)	-	DF-9	3-VII-15
放線菌	-	DF-3	3-VII-6
ホウレン草	-	DB-10	3-III-17
メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)	-	DF-8	3-VII-13
毛根	-	DA-c-5	3-II-iii-7
緑膿菌	-	DF-10	3-VII-17
淋菌	-	DF-5	3-VII-8
レタス	-	DB-6	3-III-12

**RNA**

サンプル名	種類	番号	ページ
RSウイルス ( <i>Respiratory Syncytial</i> ) 液	-	RH-7	3-XVIII-14
アマランサス種	-	RB-9	3-XII-14
胃	ヒト	RA-b-17	3-XI-ii-33
胃	マウス	RA-b-18	3-XI-ii-34
ES細胞	-	RG-3	3-XVII-8
インフルエンザウイルス液	-	RH-4	3-XVIII-9
ウイルス性神経壊死症 (VNN)	アマダイ	RH-10	3-XVIII-20
HL60細胞 (~ 1 × 10 <sup>6</sup> 個)	-	RG-8	3-XVII-23
HL60細胞 (6cm または 10cm ディッシュ)	-	RG-14	3-XVII-30
NIH/3T3細胞 (~ 1 × 10 <sup>6</sup> 個)	-	RG-11	3-XVII-26
NIH/3T3細胞 (6cm または 10cm ディッシュ)	-	RG-15	3-XVII-34
MCF-7細胞 (ディッシュ溶解法)	-	RG-18	3-XVII-41
オオムギ葉	-	RB-2	3-XII-3
蚊	-	RE-2	3-XV-3
花卉	-	RB-5	3-XII-8
肝臓	マウス	RA-b-11	3-XI-ii-21
肝臓	メダカ	RD-3	3-XIV-4
キク葉	-	RB-4	3-XII-7
キノア葉	-	RB-3	3-XII-5
胸腺	マウス	RA-b-21	3-XI-ii-37
筋肉	ラット	RA-b-14	3-XI-ii-28
血管	ウサギ	RA-b-4	3-XI-ii-7
COS-7細胞 (~ 1 × 10 <sup>6</sup> 個)	-	RG-1	3-XVII-2
COS-7細胞 (6cm または 10cm ディッシュ)	-	RG-2	3-XVII-4
コムギ葉	-	RB-8	3-XII-12
SARS コロナウイルス (SARS-CoV) 感染細胞	-	RH-8	3-XVIII-16
サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染細胞	-	RH-9	3-XVIII-18
C型肝炎ウイルス (HCV)	血清	RH-1	3-XVIII-2
歯根膜細胞 (ディッシュ溶解法)	-	RG-12	3-XVII-28
脂肪細胞 (ディッシュ溶解法)	ブタ	RG-13	3-XVII-29
脂肪組織	イヌ	RA-b-1	3-XI-ii-2
脂肪組織	ネコ	RA-b-2	3-XI-ii-4
小腸	マウス	RA-b-15	3-XI-ii-29
植物	-	RB-6	3-XII-9
植物ウイルス	-	RH-6	3-XVIII-13
脂肪初代培養細胞	イヌ	RG-16	3-XVII-38
シロイヌナズナ	-	RB-1	3-XII-2
心臓	マウス	RA-b-9	3-XI-ii-15
腎臓	マウス	RA-b-10	3-XI-ii-18
水晶体上皮細胞 (ディッシュ溶解法)	-	RG-9	3-XVII-24
精巣	マウス	RA-b-20	3-XI-ii-36
組織 (DNA チップ“ジェノパール” <sup>®</sup> ※)	マウス	RA-b-22	3-XI-ii-40
体腔液	魚	RD-1	3-XIV-2
大腸	マウス	RA-b-7	3-XI-ii-12
大腸菌	-	RF-1	3-XVI-2
タバコ葉 ( <i>N.benthamiana</i> )	-	RB-10	3-XII-15
腸	ネコ	RA-b-5	3-XI-ii-8
トマト葉	-	RB-7	3-XII-10
脳	マウス	RA-b-6	3-XI-ii-9
ノロウイルス	糞便	RH-2	3-XVIII-4
肺	マウス	RA-b-12	3-XI-ii-24
培養細胞 (DNA チップ“ジェノパール” <sup>®</sup> ※)	-	RG-21	3-XVII-44
白血球	-	RA-a-1	3-XI-i-2
尾	マウス	RA-b-19	3-XI-ii-35
PC12細胞 (ディッシュ溶解法)	-	RG-19	3-XVII-42
HeLa細胞 (~ 1 × 10 <sup>6</sup> 個)	-	RG-6	3-XVII-17
HeLa細胞 (6cm または 10cm ディッシュ)	-	RG-7	3-XVII-19
脾臓	マウス	RA-b-16	3-XI-ii-30
ヒト免疫不全ウイルス (HIV)	ヒト血清	RH-3	3-XVIII-6
皮膚	イヌ	RA-b-8	3-XI-ii-13
HuH-7細胞 (ディッシュ溶解法)	-	RG-17	3-XVII-40
ヒレ	メダカ	RD-2	3-XIV-3
副腎	マウス	RA-b-3	3-XI-ii-6
平滑筋細胞 (ディッシュ溶解法)	-	RG-20	3-XVII-43
HEK293細胞 (~ 1 × 10 <sup>6</sup> 個)	-	RG-4	3-XVII-9
HEK293細胞 (6cm または 10cm ディッシュ)	-	RG-5	3-XVII-11
麻疹ウイルス液	-	RH-5	3-XVIII-11
ユスリ蚊	-	RE-1	3-XV-2
リンパ細胞	-	RG-10	3-XVII-25
リンパ節	マウス	RA-b-13	3-XI-ii-27

※ “ジェノパール”<sup>®</sup> は、三菱レイヨン株式会社の登録商標です。



# Chapter 3

## Protocol



## 3-II-i 章

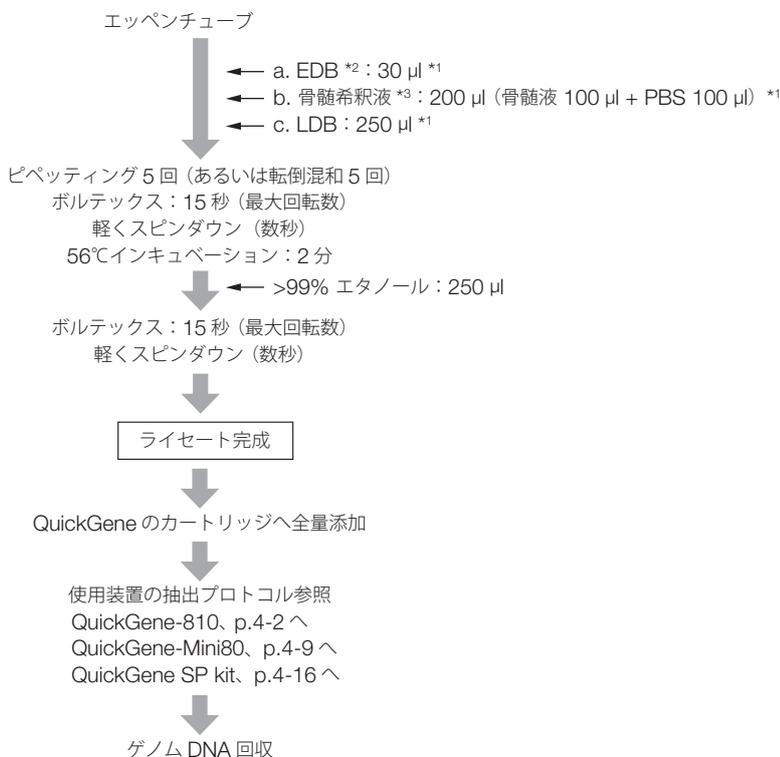
### 動物血液からのゲノム DNA抽出

---

DA-a-1

骨髓液からのゲノム DNA 抽出

プロトコル



\*1 a, b, c の順序に必ず従ってください。

\*2 EDB は、ヌクレアーゼフリー水を注入混和後、室温で 30 分静置し、完全に溶解してからお使いください。

\*3 骨髓液は、あらかじめ PBS で 2 倍希釈してください。骨髓液 100  $\mu$ l に PBS 100  $\mu$ l を加え、よく混合してから添加してください。

結果

- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし
- その他  
データなし

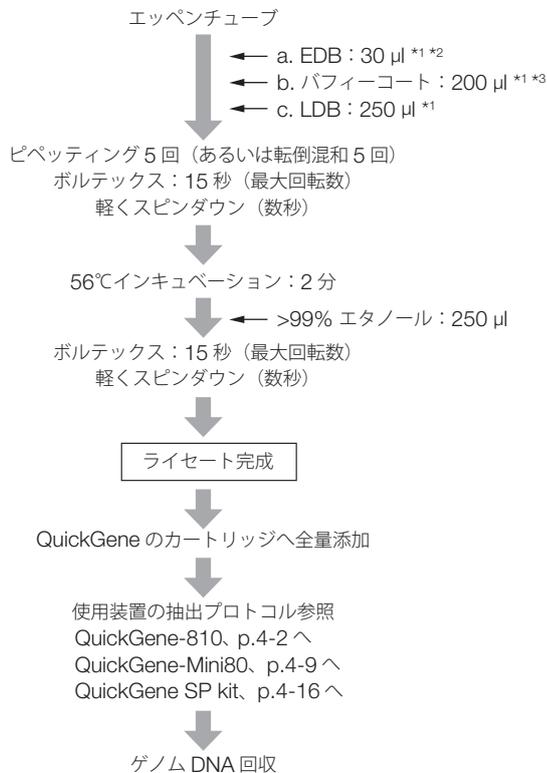
共通プロトコルサンプル

データなし

DA-a-2

パフィーコートからのゲノム DNA 抽出

プロトコル



\*1 a, b, c の順序に必ず従ってください。

\*2 EDB は、ヌクレアーゼフリー水を注入混和後、室温で 30 分静置し、完全に溶解してからお使いください。

\*3  $3 \times 10^6$  個の細胞を PBS/200 µl に懸濁した。

結果

■ 電気泳動図

データなし

■ ゲノム DNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入 : A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

■ その他

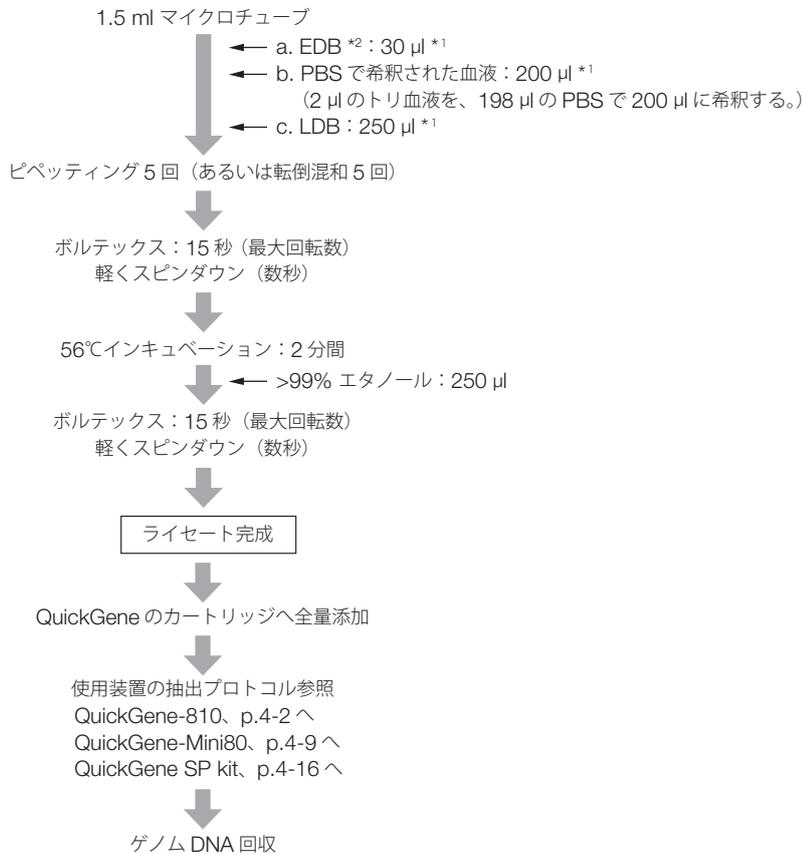
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

## トリ全血からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



\*1 a, b, c の順序に必ず従ってください。

\*2 EDB は、ヌクレアーゼフリー水を添加混和後、室温で 30 分静置し、完全に溶解してからお使いください。

### 結果

- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし
- その他  
データなし

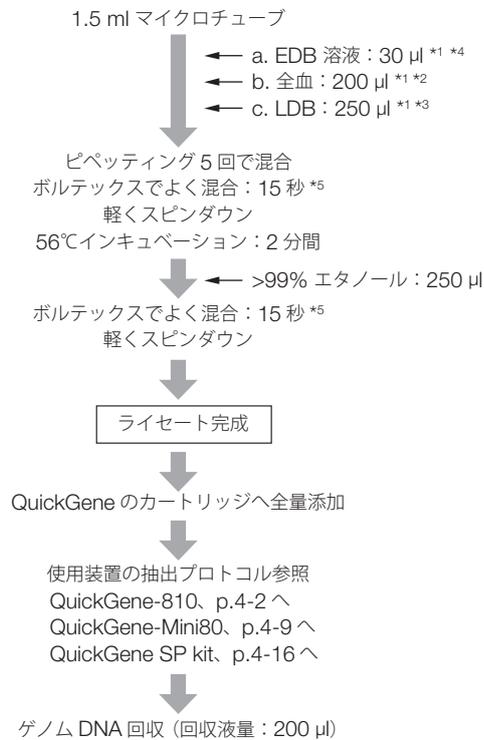
### 共通プロトコルサンプル

データなし

DA-a-4

ヒト全血からのゲノム DNA 抽出

プロトコル

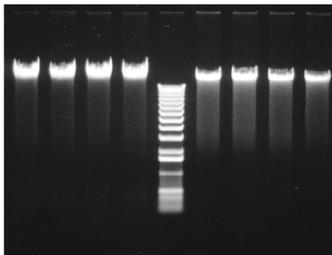


- \*1 a, b, c の順序に必ず従ってください。
- \*2 EDTA-2Na または EDTA-2K またはヘパリンで採血した全血の使用を推奨。
- \*3 全血添加後直ぐに c を行ってください。
- \*4 EDB は、ヌクレアーゼフリー水を添加混合後、室温で 30 分静置し、完全に溶解してからお使いください。
- \*5 ボルテックス (最大回転数) で完全に混合してください。ボルテックスで混合不十分ならば、タッピング、ピペッティングまたは転倒を使用してください。

結果

電気泳動図

1 1 1 1 M 2 2 2 2



M: 1k bp ladder  
1: QuickGene  
2: A社 (スピン法)

ゲノム DNA の収量 (サンプル: 200 μl のヒト全血)

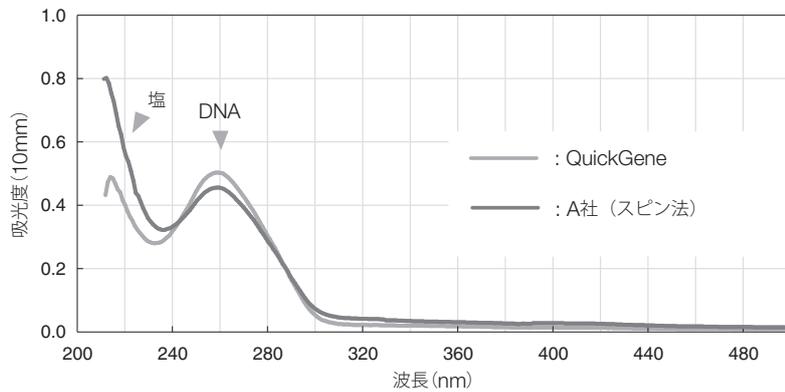
(μg)	平均	サンプル 1	サンプル 2	サンプル 3	サンプル 4	サンプル 5
QuickGene	5.9	7.2	5.3	5.9	5.5	5.5
A社 (スピン法)	4.5	6.3	4.4	5.2	3.2	3.6

タンパク質の混入: A260/280

	平均	サンプル 1	サンプル 2	サンプル 3	サンプル 4	サンプル 5
QuickGene	1.94	1.91	1.94	1.96	1.91	1.96
A社 (スピン法)	1.84	1.86	1.82	1.80	1.87	1.86

カオトロピック塩の混入: A260/230

	平均	サンプル 1	サンプル 2	サンプル 3	サンプル 4	サンプル 5
QuickGene	1.61	1.76	1.69	1.43	1.76	1.42
A社 (スピン法)	1.12	1.21	0.89	1.07	1.24	1.21



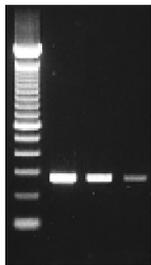
### ヘモグロビンの混入：A400

	平均	サンプル 1	サンプル 2	サンプル 3	サンプル 4	サンプル 5
QuickGene	0.036	0.023	0.032	0.070	0.031	0.025
A社 (スピン法)	0.054	0.076	0.040	0.085	0.026	0.043

### その他

#### ● PCR

M 1 2 3

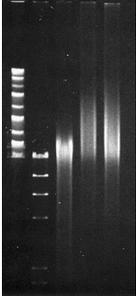


抽出ゲノム DNA を連続的に希釈し、各希釈液を PCR テンプレートに用いて *p53* exon6 遺伝子を増幅した。  
PCR 増幅は 0.1ng/μl ゲノム DNA を用いて成功した。

M : 100bp ladder  
1 : ゲノム DNA 10ng/μl  
2 : ゲノム DNA 1ng/μl  
3 : ゲノム DNA 0.1ng/μl

#### ● パルスフィールド電気泳動

M1 M2 1 2 3

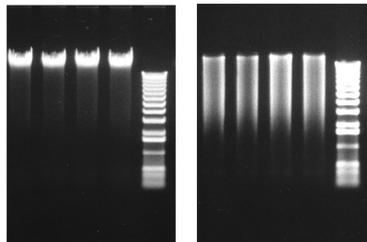


QuickGene-810 (自動核酸抽出システム) と QuickGene DNA whole blood kit S を用いることで、フェノール/クロロホルムを用いるマニュアル法と同様に、長いゲノム DNA の抽出が出来る。

M1 : MidRange PFG マーカー II  
M2 : *Hind* III digest  
1 : スピンカラムを用いる比較法 (<~ 70kb)  
2 : QuickGene 抽出システムと試薬使用 (<~ 140kb)  
3 : フェノール/クロロホルムを用いるマニュアル法 (<~ 140kb)

#### ● 制限酵素切断

1 1 1 1 M 2 2 2 2 M



溶出されたゲノム DNA サンプルを、*EcoR* I を用いて切断した。  
酵素切断の成功がレーン 1 と 2 の比較で示される。

M : 1k bp ladder  
1 : 切断前  
2 : *EcoR* I を用いる切断後

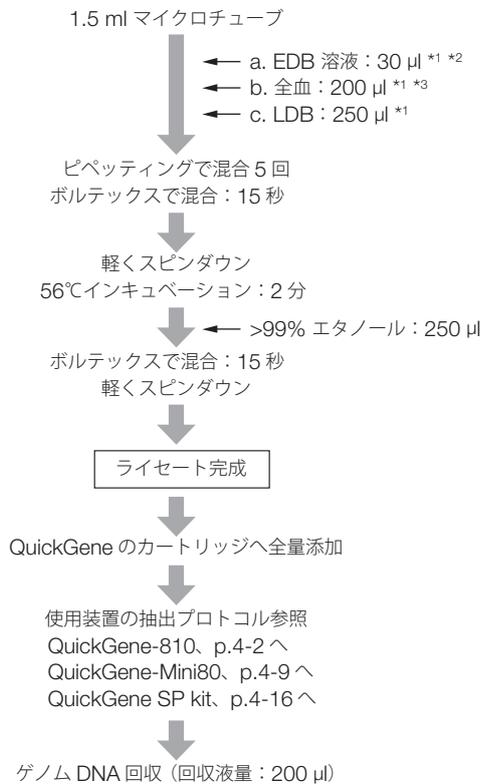
## 共通プロトコルサンプル

イヌ全血

DA-a-5

イヌ全血からのゲノム DNA 抽出

プロトコル



\*1 a から c の順を厳密に。LDB を EDB 添加直後に加えないでください。

\*2 EDB は、ヌクレアーゼフリー水を添加混合後、室温で 30 分静置し、完全に溶解してからお使いください。

\*3 フィブリンが多く含まれているため、新鮮血でも凝固する場合があります。全血が凝固してしまった場合は、抗凝固剤を使用して、再度採血を行ってください。

結果

電気泳動図

データなし

ゲノム DNA の収量

全血量	収量 (µg)
200 µl	2.52

タンパク質の混入：A260/280

全血量	A260/280
200 µl	1.68

カオトロピック塩の混入：A260/230

全血量	A260/230
200 µl	0.61

その他

データなし

共通プロトコルサンプル

ヒト全血



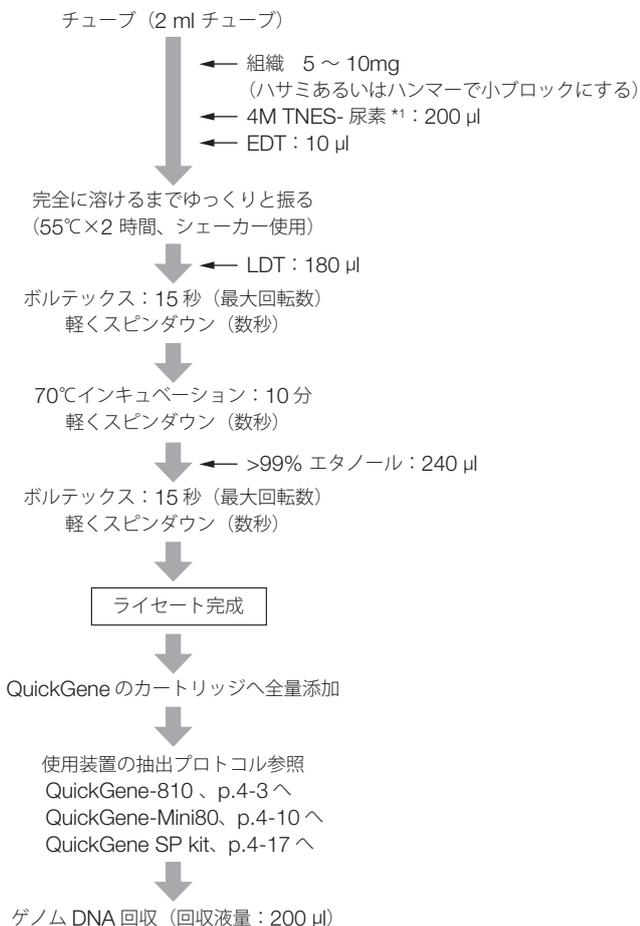
## 3-II-ii 章

### 動物組織からのゲノム DNA抽出

---

## 動物組織からのゲノム DNA 抽出 (迅速法)

### プロトコル



\*1 <4M TNES-尿素>  
10 mM トリス塩酸 pH7.5  
125 mM 塩化ナトリウム (NaCl)  
10 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)  
1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)  
4M 尿素  
サンプルが溶けにくいとき、8M を使用してください。

### 結果

- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入: A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入: A260/230  
データなし
- その他  
データなし

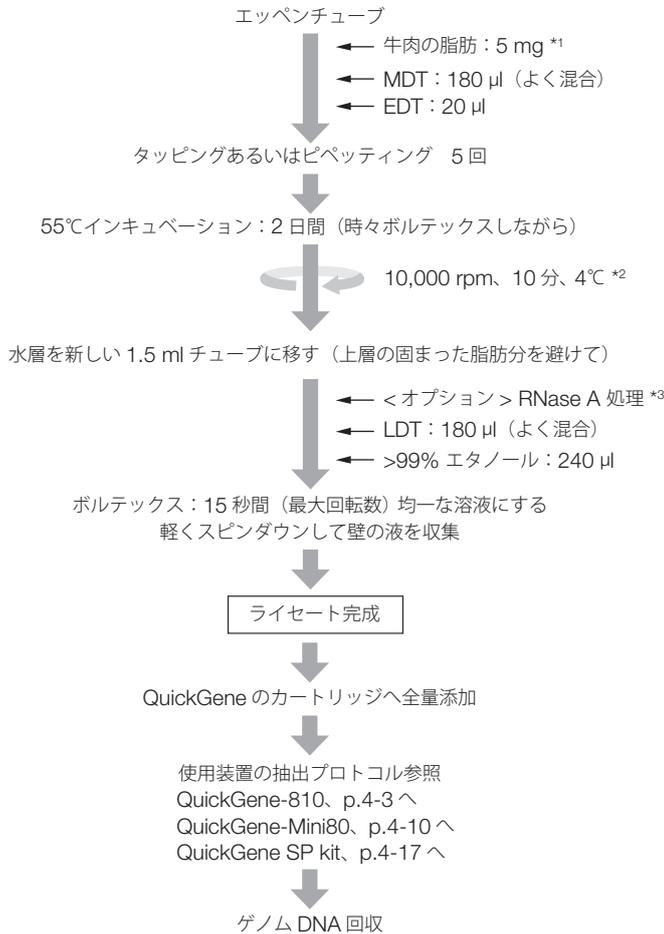
### 共通プロトコルサンプル

データなし

DA-b-2

牛肉の脂肪からのゲノム DNA 抽出

プロトコル



\*1 (250 mg まで可能であることを確認済) 多すぎるとカートリッジ詰まりや溶解不十分などの原因となります。条件が決まるまで必ず秤量してください。

\*2 代替案：  
遠心 (10,000 rpm、室温、3分)。  
水層を新しい 1.5 ml チューブに移す。  
\*5 mg の脂肪の場合のみ。

\*3 オプション  
RNase A (100 mg/ml)：20 µl  
タッピング 5回 (酵素液が混ざっている事を確認する)  
軽くスピンドウンして壁の液を収集  
室温で 2 分間反応

結果

電気泳動図

データなし

ゲノム DNA の収量

	収量 (µg)
250 mg	1.82
5 mg	0.47

タンパク質の混入：A260/280

データなし

カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

その他

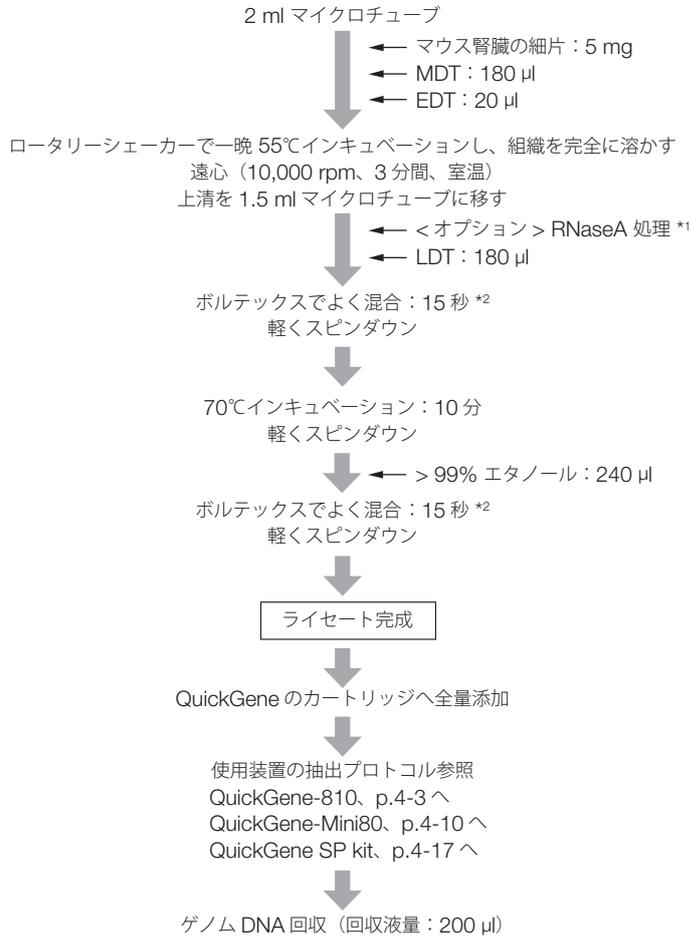
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

## マウス腎臓からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル

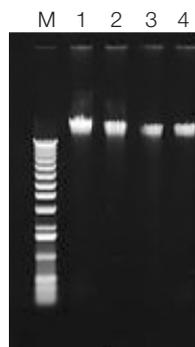


\*1 オプションステップ  
RNaseA：20  $\mu$ l  
チューブを叩いて溶液を混合  
軽くスピンドウン  
室温で 2 分間放置

\*2 ボルテックス（最大回転数）で完全に混合してください。  
ボルテックスで混合不十分ならば、タッピング、ピペッティングまたは転倒を使用してください。

### 結果

#### マウス組織からの抽出ゲノム DNA のアガロースゲル電気泳動 (AGE)



M：サイズマーカー  
1：肺組織サンプル  
2：腎臓組織サンプル  
3：尾組織サンプル  
4：肝臓組織サンプル

#### 電気泳動図

データなし

#### ゲノム DNA の収量

データなし

#### タンパク質の混入：A260/280

データなし

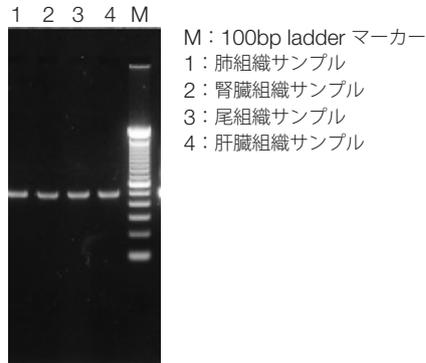
■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

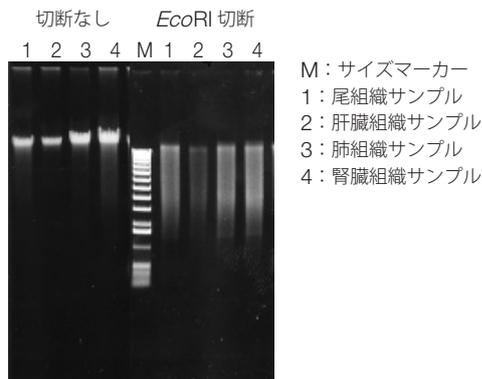
• PCR

QuickGene 抽出システムと試薬を用いてマウス組織から抽出されたゲノム DNA で増幅された *G3PDH* PCR 断片のアガロースゲル電気泳動 (AGE)



• 制限酵素切断

QuickGene 抽出システムと試薬を用いてマウス組織から抽出されたゲノム DNA での *EcoRI* 制限酵素切断断片のアガロースゲル電気泳動 (AGE)

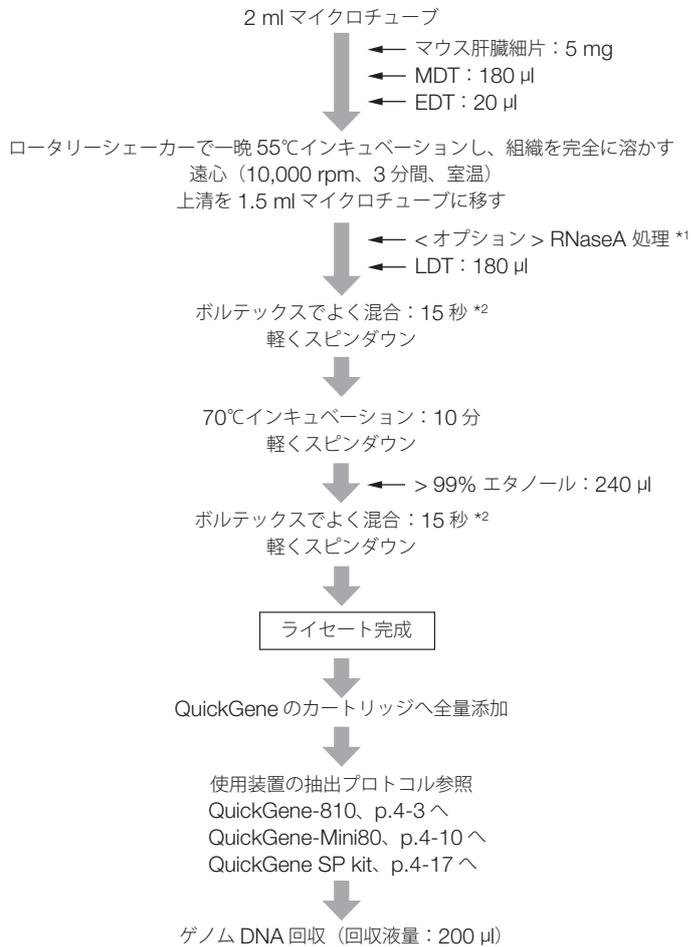


■ 共通プロトコルサンプル

マウス肺、マウス肝臓

## マウス肝臓からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル

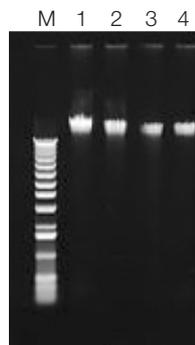


\*1 オプションステップ  
RNaseA : 20  $\mu$ l  
チューブを叩いて溶液を混合  
軽くスピンドウン  
室温で 2 分放置

\*2 ボルテックス (最大回転数) で完全  
に混合してください。  
ボルテックスで混合不十分なら  
ば、タッピング、ピペッティング  
または転倒を使用してください。

### 結果

#### 電気泳動図



M : サイズマーカー  
1 : 肺組織サンプル  
2 : 腎臓組織サンプル  
3 : 尾組織サンプル  
4 : 肝臓組織サンプル

#### ゲノム DNA の収量

データなし

#### タンパク質の混入 : A260/280

データなし

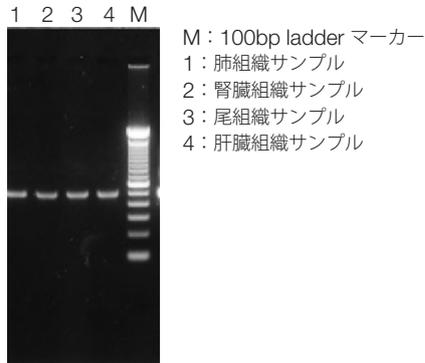
■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

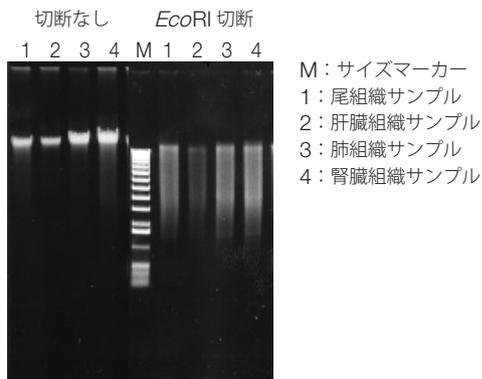
● PCR

QuickGene 抽出システムと試薬を用いてマウス組織から抽出されたゲノム DNA で増幅された *G3PDH* PCR 断片のアガロースゲル電気泳動 (AGE)



● 制限酵素切断

QuickGene 抽出システムと試薬を用いてマウス組織から抽出されたゲノム DNA での *EcoRI* 制限酵素切断断片のアガロースゲル電気泳動 (AGE)

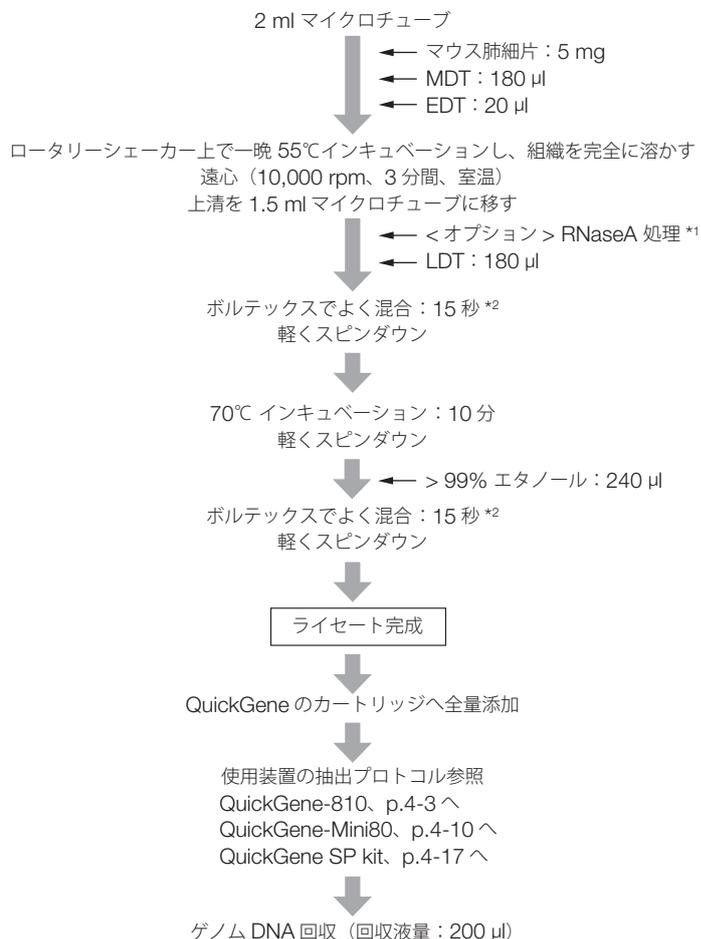


■ 共通プロトコルサンプル

マウス肺、マウス腎臓

## マウス肺からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル

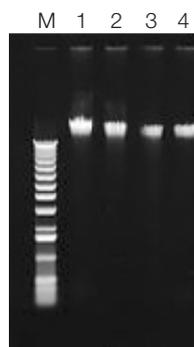


\*1 オプションステップ  
RNaseA：20  $\mu$ l  
タッピングして溶液を混合  
軽くスピンドウン  
室温で 2 分間放置

\*2 ボルテックス（最大回転数）で完全  
に混合してください。  
ボルテックスで混合不十分なら  
ば、タッピング、ピペッティング  
または転倒を使用してください。

### 結果

#### ■ マウス組織からの抽出ゲノム DNA のアガロースゲル電気泳動（AGE）



M：サイズマーカー  
1：肺組織サンプル  
2：腎臓組織サンプル  
3：尾組織サンプル  
4：肝臓組織サンプル

#### ■ 電気泳動図

データなし

#### ■ ゲノム DNA の収量

データなし

#### ■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

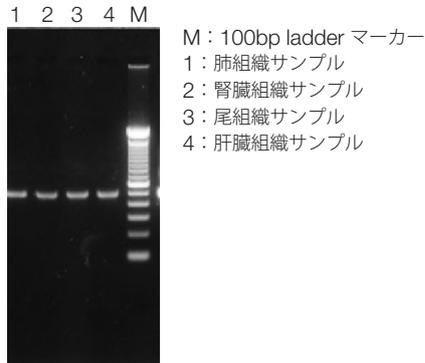
■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

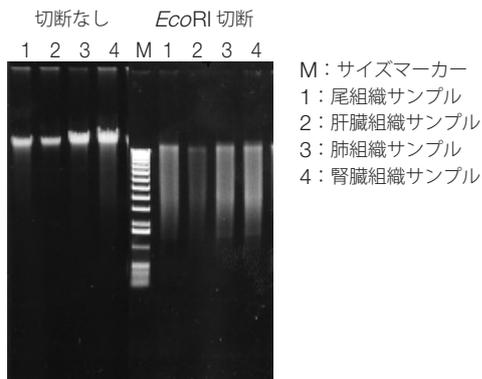
● PCR

QuickGene 抽出システムと試薬を用いてマウス組織から抽出されたゲノム DNA で増幅された *G3PDH* PCR 断片のアガロースゲル電気泳動 (AGE)



● 制限酵素切断

QuickGene 抽出システムと試薬を用いてマウス組織から抽出されたゲノム DNA での *EcoRI* 制限酵素切断断片のアガロースゲル電気泳動 (AGE)

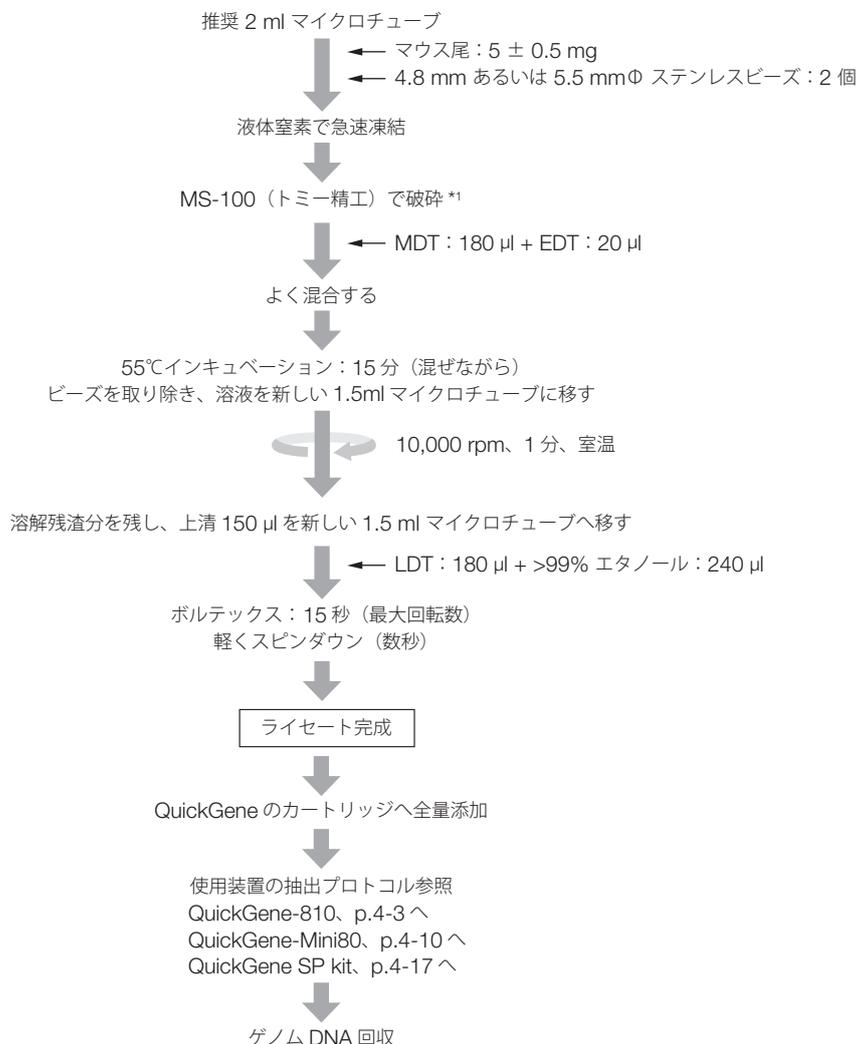


■ 共通プロトコルサンプル

マウス腎臓、マウス肝臓

## マウス尾からのゲノム DNA 抽出 (破碎法)

### プロトコル



\*1 4.8 mmΦ ステンレスビーズの場合 :  
2,700 rpm、60 秒、2 回  
5.5 mmΦ ステンレスビーズの場合 :  
2,400 rpm、30 秒、2 回

### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ ゲノム DNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入 : A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

■ その他

データなし

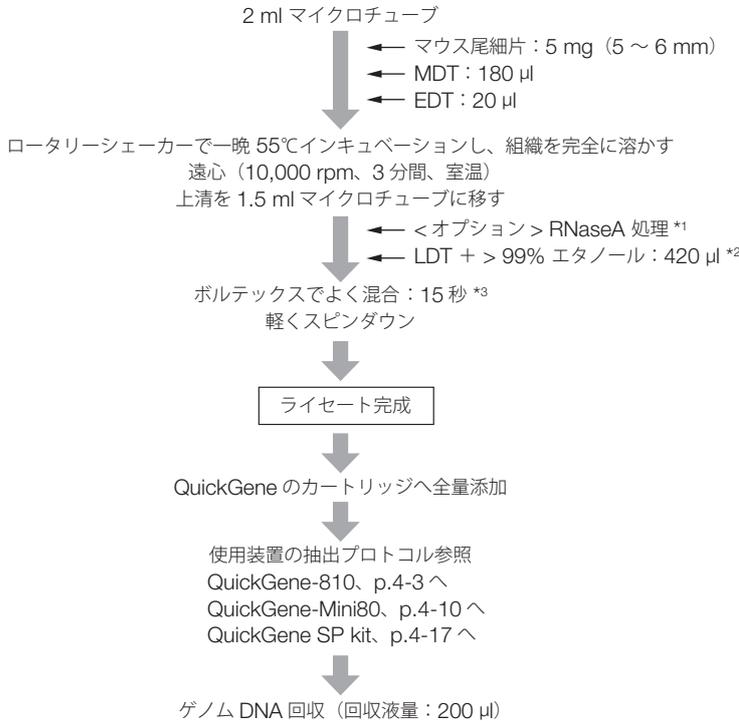
### 共通プロトコルサンプル

データなし

DA-b-7

マウス尾細片からのゲノム DNA 抽出

プロトコル

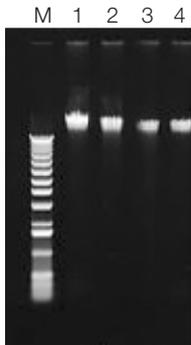


- \*1 オプションステップ  
RNaseA：20  $\mu$ l  
タッピングして溶液を混合  
軽くスピンドウン  
室温で2分放置。
- \*2 使用前に、180  $\mu$ l の LDT に  
240  $\mu$ l の >99% エタノールを添  
加して完全に混合。
- \*3 ボルテックス (最大回転数) で  
完全に混合してください。  
ボルテックスで混合不十分なら  
ば、タッピング、ピペッティング  
または転倒を使用してください。

DA-b-7

結果

マウス組織からの抽出ゲノム DNA のアガロースゲル電気泳動 (AGE)



M：サイズマーカー  
1：肺組織サンプル  
2：腎臓組織サンプル  
3：尾組織サンプル  
4：肝臓組織サンプル

マウス尾からの抽出ゲノム DNA

- ゲノム DNA (組織 5 mg) の収量

QuickGene 抽出システムと試薬	3.6 $\mu$ g
スピнкаラム法を用いる比較法	3.6 $\mu$ g

- タンパク質の混入：A260/280

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
QuickGene 抽出システムと試薬	1.95	1.94	1.95	1.93	1.95	1.97	1.96	1.96
スピнкаラム法を用いる比較法	1.96	1.94	1.97	2.01	1.95	1.99	2.00	1.99

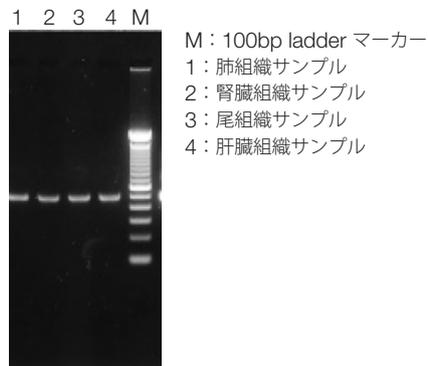
● カオトロピック塩の混入：A260/230

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
QuickGene 抽出システムと試薬	2.03	2.05	2.12	1.84	1.90	1.88	1.90	1.91
スピнкаラム法を用いる比較法	1.57	1.71	2.03	1.77	2.21	2.31	1.94	1.96

■ その他

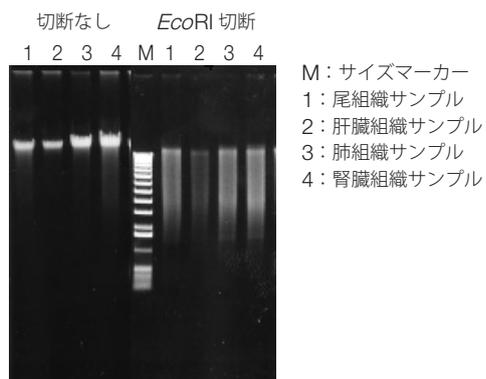
● PCR

QuickGene 抽出システムと試薬を用いてマウス組織から抽出されたゲノム DNA で増幅された *G3PDH* PCR 断片のアガロースゲル電気泳動 (AGE)



● 制限酵素切断

QuickGene 抽出システムと試薬を用いてマウス組織から抽出されたゲノム DNA での *EcoRI* 制限酵素切断断片のアガロースゲル電気泳動 (AGE)



■ 共通プロトコルサンプル

データなし

## 3-II-iii 章

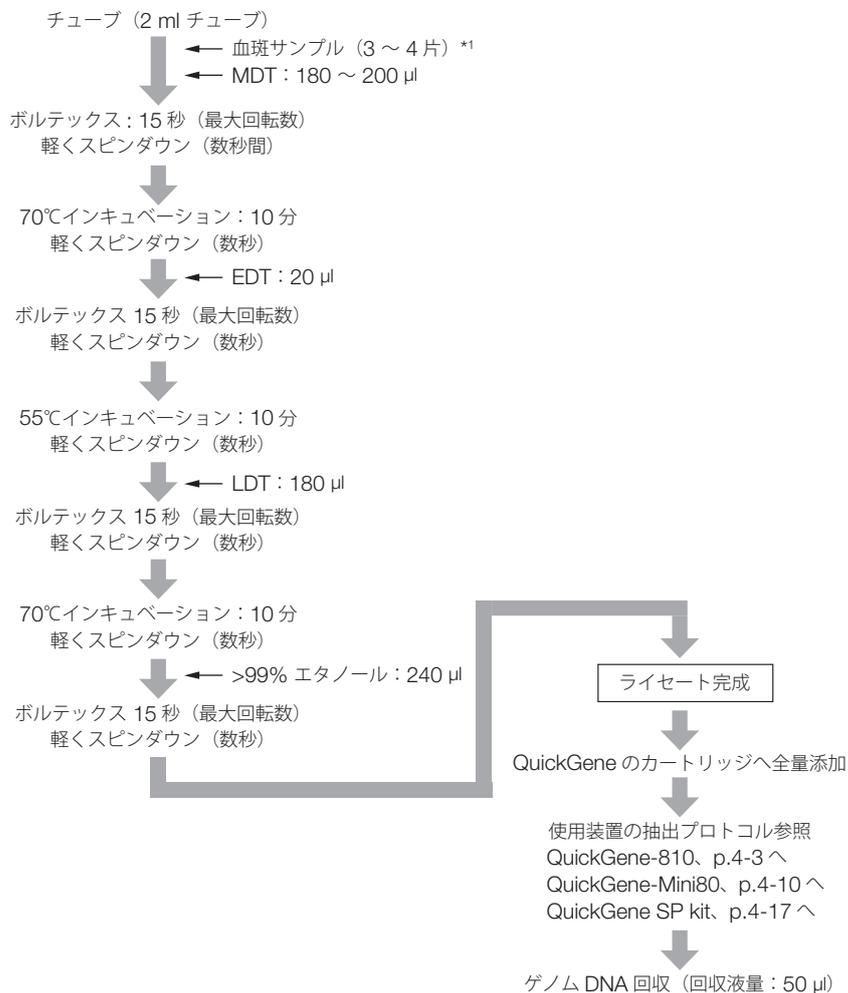
### 他の動物サンプルからのゲノム DNA抽出

---

DA-c-1

## 血斑からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



\*1 ろ紙あるいはパンチ穴綿から。

### 結果

■ 電気泳動図  
データなし

■ ゲノム DNA の収量

収量 (µg)	1	2	3	平均
	0.31	0.33	0.26	0.30

■ タンパク質の混入 : A260/280  
データなし

■ カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし

■ その他  
データなし

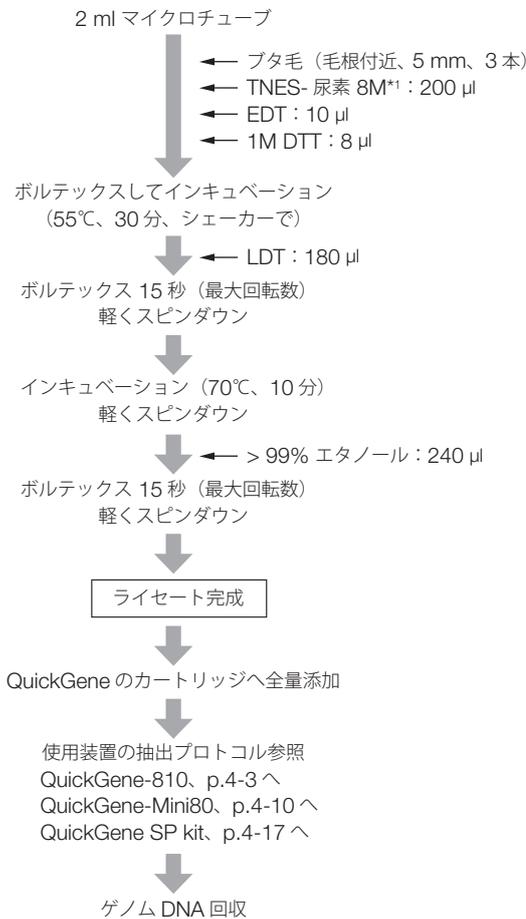
### 共通プロトコルサンプル

データなし

DA-c-2

ブタ毛からのゲノム DNA 抽出

プロトコル



\*1 <TNES-尿素 8M>  
10mM トリス塩酸 pH7.5  
125mM 塩化ナトリウム (NaCl)  
10mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)  
1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)  
8M 尿素

DA-c-2

結果

電気泳動図

データなし

ゲノム DNA の収量

毛の数	収量 (µg)
3 本	3.9

タンパク質の混入 : A260/280

毛の数	A260/280
3 本	1.91

カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

その他

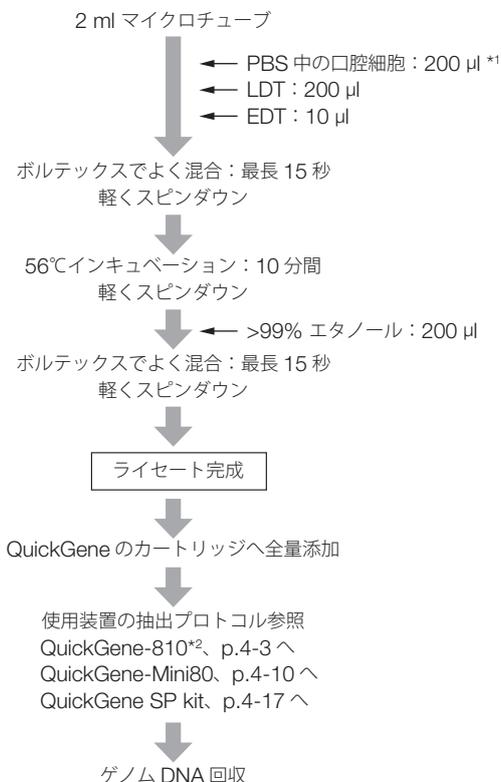
データなし

共通プロトコルサンプル

毛根

## 口腔スワブからのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



\*1 綿球で、口腔細胞を 200 - 400 µl の PBS バッファーに懸濁してください。  
1 サンプルに対して 200 µl の溶液を使用してください。

\*2 "ELUT DIP TM" パラメーターを 90 に変えてください。

### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ ゲノム DNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

データなし

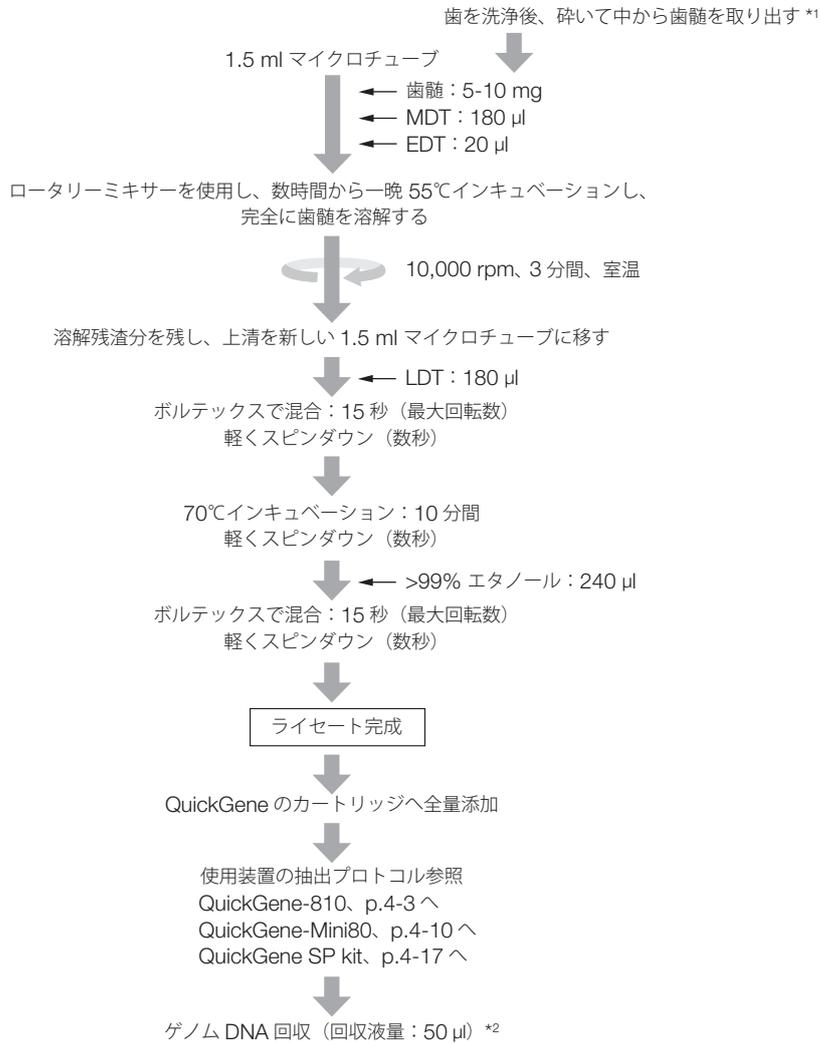
### 共通プロトコルサンプル

データなし

DA-c-4

歯髄からのゲノム DNA 抽出

プロトコル



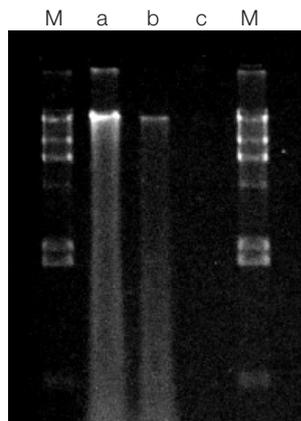
\*1 歯が新しいサンプルでない場合、歯を砕いた後で歯髄腔から歯髄を掻き出す。

\*2 抽出 DNA の収量は、歯の状態によって異なる。

結果

- a : 屋内で 5 年経過した歯 (歯髄の量 : 10 mg)
- b : 屋内で 5 年経過した歯 (歯髄の量 : 7 mg)
- c : 屋外で 3 ヶ月経過した歯 (歯髄の量 : 5 mg)

電気泳動図



M : λ DNA/Hind III digest

- a : 屋内で 5 年経過した歯 (歯髄の量 : 10 mg)
- b : 屋内で 5 年経過した歯 (歯髄の量 : 7 mg)
- c : 屋外で 3 ヶ月経過した歯 (歯髄の量 : 5 mg)

■ ゲノム DNA の収量

サンプル	a	b	c
収量 (μg)	1.9	1.2	0.1

■ タンパク質の混入：A260/280

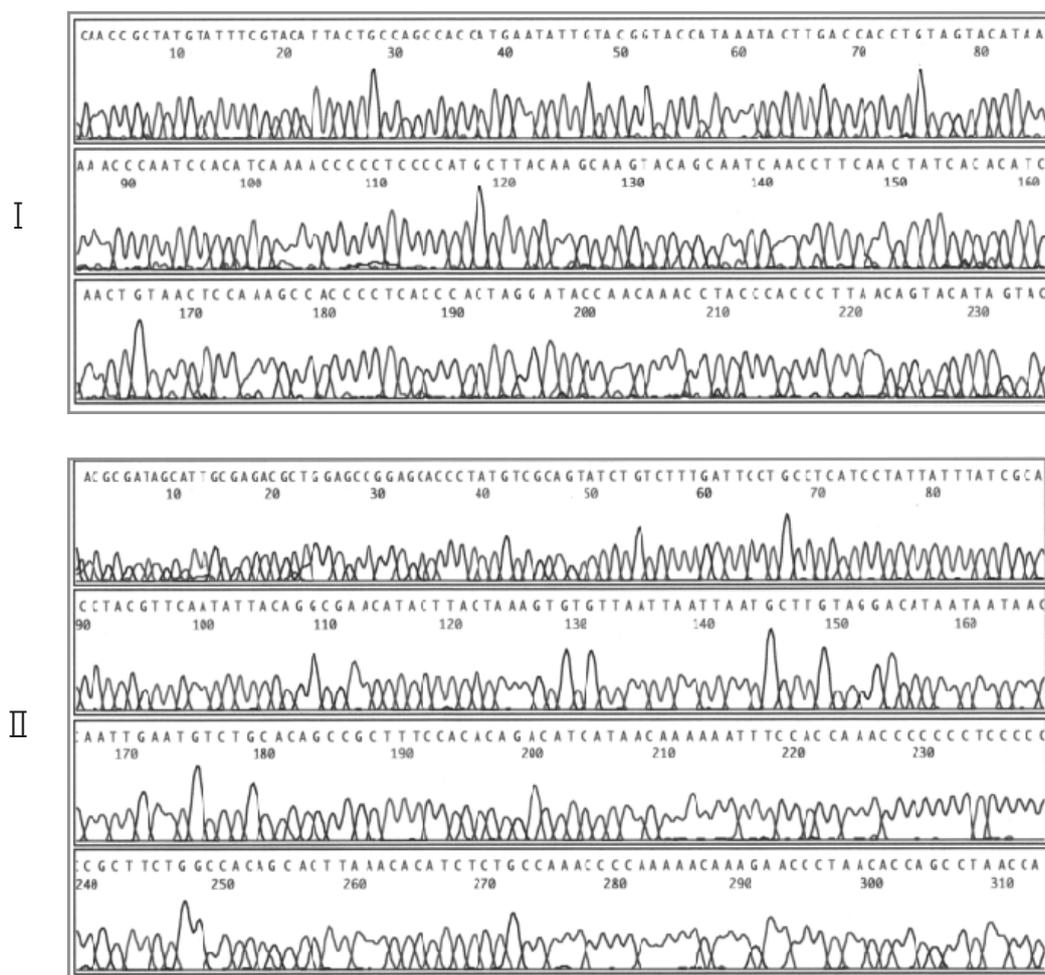
サンプル	a	b	c
QuickGene-810	1.87	1.65	1.05

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

サンプル	a	b	c
QuickGene-810	1.58	1.41	0.63

■ その他

- QuickGene-810 を用いて抽出したゲノム DNA で、*HVR I* および *HVR II* をターゲットに行ったシーケンス解析。



I : *HVR I* (塩基数：16079-16313)

II : *HVR II* (塩基数：77-388)

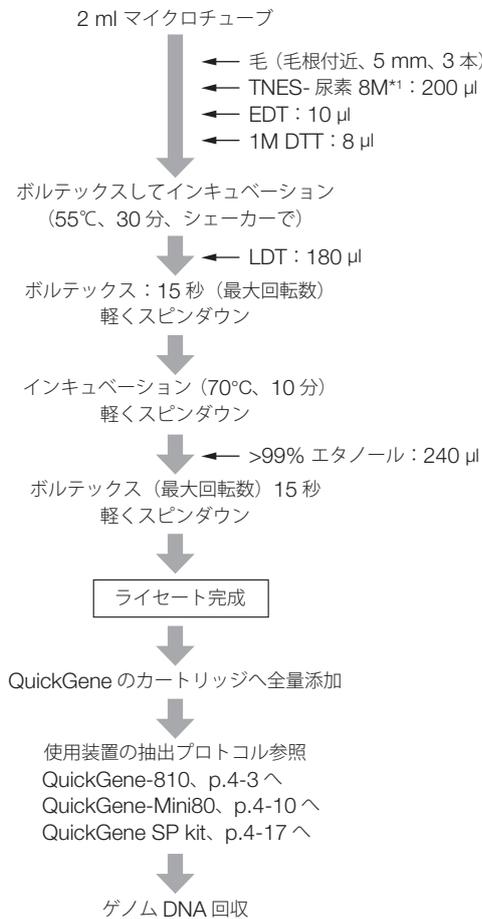
■ 共通プロトコルサンプル

データなし

DA-c-5

毛根からのゲノム DNA 抽出

プロトコル



\*1 <TNES-尿素 8M>  
10mM トリス塩酸 pH7.5  
125mM 塩化ナトリウム (NaCl)  
10mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)  
1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)  
8M 尿素

DA-c-5

結果

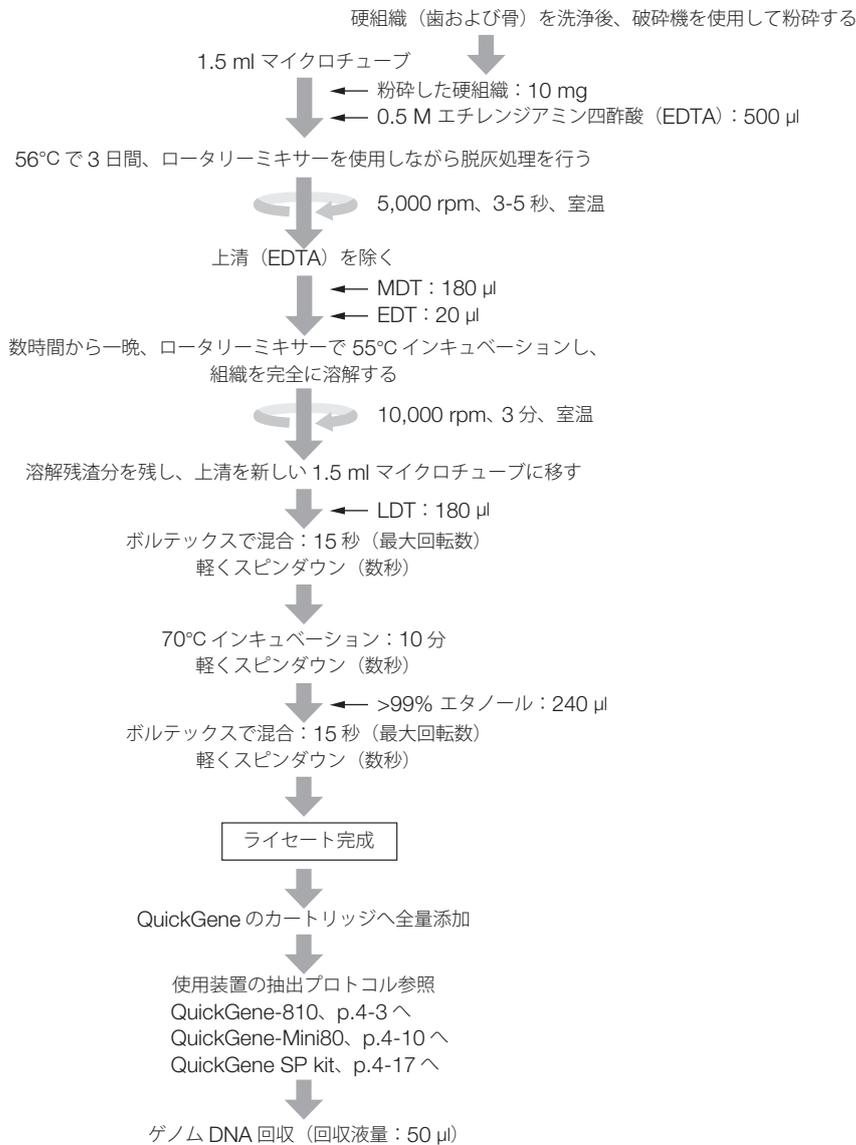
- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入：A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入：A260/230  
データなし
- その他  
データなし

共通プロトコルサンプル

ブタ毛

## 硬組織（歯および骨）からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



### 結果

- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入：A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入：A260/230  
データなし
- その他  
データなし

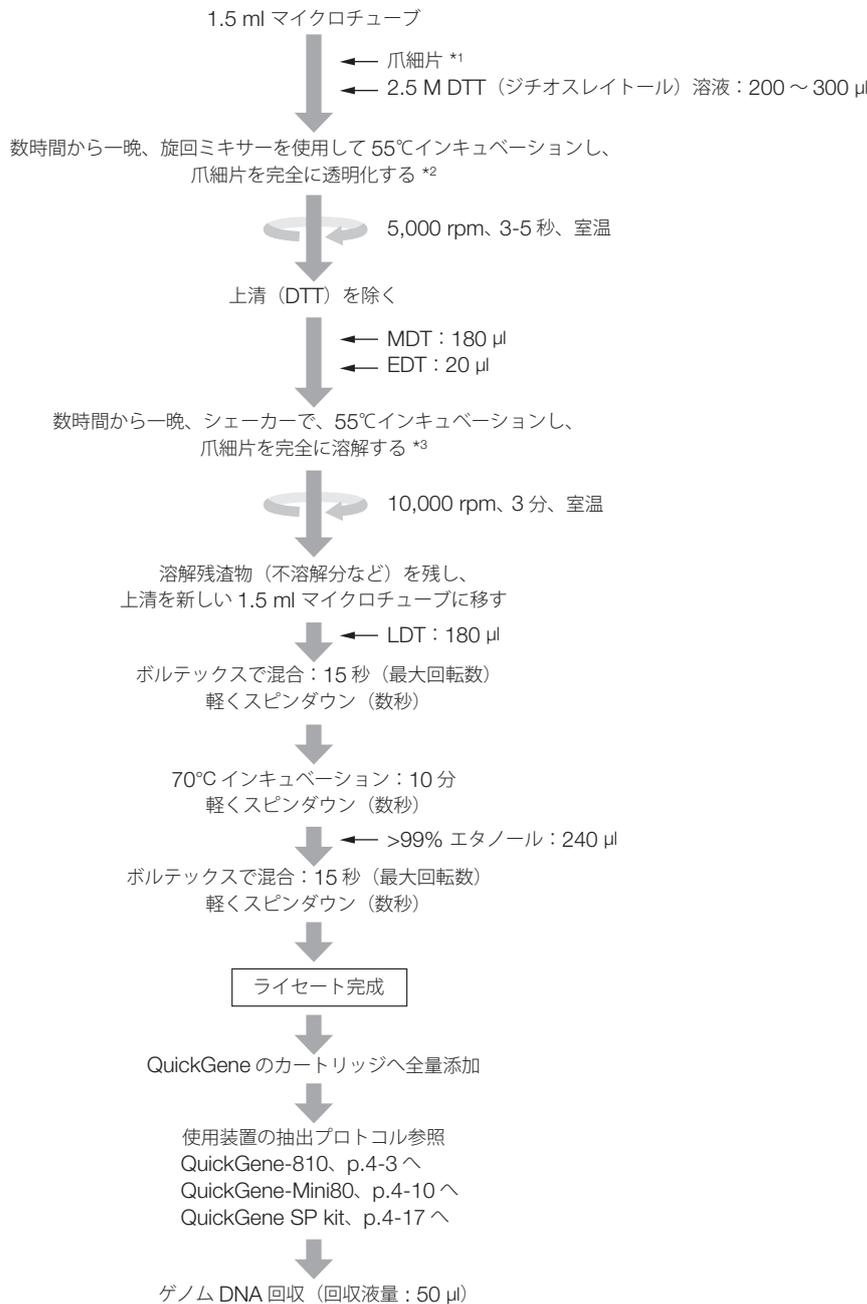
### 共通プロトコルサンプル

データなし

DA-c-7

爪からのゲノム DNA 抽出

プロトコル



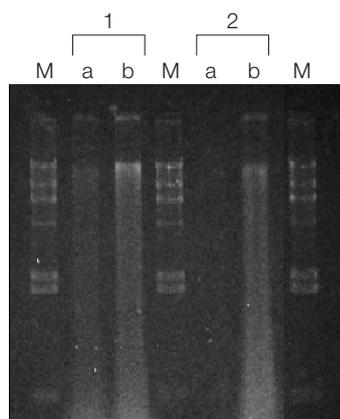
\*1 爪 (5 ~ 15 mg) を 100% エタノールで洗浄。次に精製水で洗浄し、細かく切る。できるだけ細かく切った方が溶けやすくなります。

\*2 透明化するまでの時間は爪の量と大きさにより異なります。(細切した爪 5 mg なら約 2 時間)

\*3 爪 15 mg を使用した場合、細切の仕方により一部が溶け残ることがあります。

## 結果

### 電気泳動図



M :  $\lambda$ -*Hind* III digest  
 1 : QuickGene (a: 爪 5 mg, b: 爪 10 mg)  
 2 : A社 (a: 爪 5 mg, b: 爪 10 mg)

### ゲノム DNA の収量 (ng)

サンプル量	5 mg	10 mg	15 mg
QuickGene	235	655	835
スピнкаラム法 (A社)	165	725	800

### タンパク質の混入 : A260/280

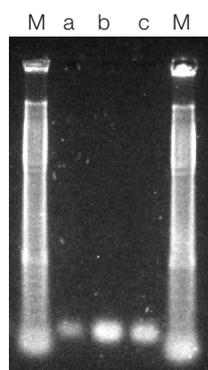
サンプル量	5 mg	10 mg	15 mg
QuickGene	1.81	1.93	1.76
スピнкаラム法 (A社)	1.77	1.78	1.47

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

サンプル量	5 mg	10 mg	15 mg
QuickGene-800	1.57	1.62	0.95
スピнкаラム法 (A社)	0.73	0.90	0.35

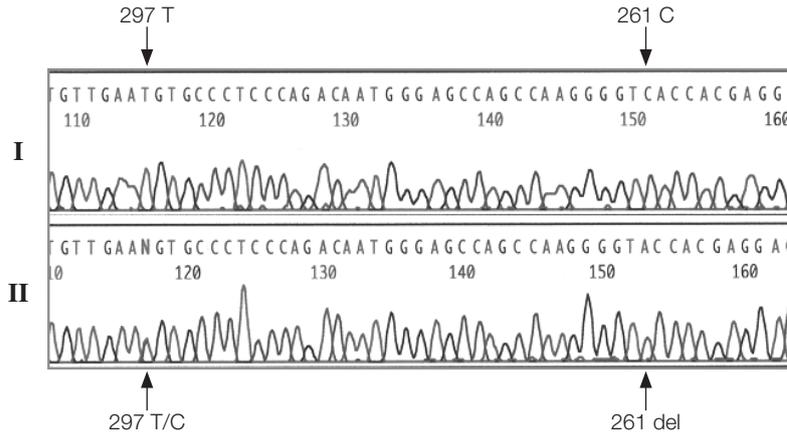
### その他

#### • PCR



ターゲット : *ABO* 遺伝子 Exson 6  
 M : 100 bp ladder  
 a : ゲノム DNA 0.1 ng/ul  
 b : ゲノム DNA 0.4 ng/ul  
 c : ゲノム DNA 1.0 ng/ul

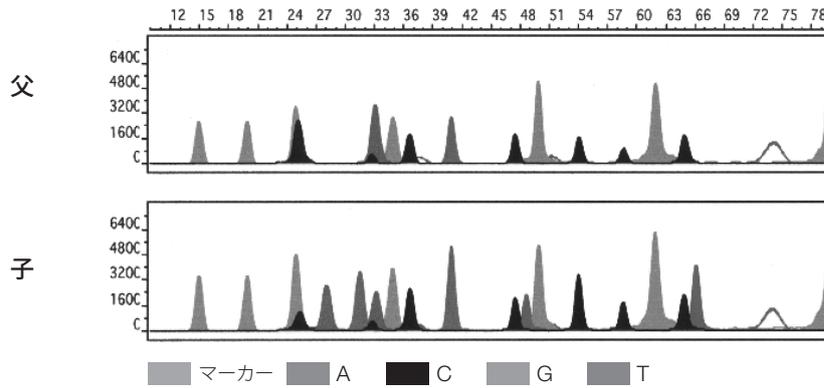
● シーケンス



I : A/A 型  
 II : O<sup>A</sup>/O<sup>G</sup> 型  
 (リバース・サイド (reverse side) のシーケンスを示す)

ABO 遺伝子 Exon 6 をターゲットにシーケンシングを行った。  
 I (A/A 型) では 261 番目が C、297 番目が T であるのに対して、II (O<sup>A</sup>/O<sup>G</sup> 型) では 261 番目が失欠、297 番目が T/C となっている。

● SNPs 解析



塩基数 (bp)	261	297	703	判定
父	C	A	G	A/A 型
子	A/C	A/G	G	A/O <sup>G</sup> 型

主な遺伝子型には、A、B、O<sup>A</sup>、O<sup>G</sup> の 4 遺伝子から成る 10 種類 (AA, AB, AO<sup>A</sup>, AO<sup>G</sup>, BB, BO<sup>A</sup>, BO<sup>G</sup>, O<sup>A</sup>O<sup>A</sup>, O<sup>A</sup>O<sup>G</sup>, O<sup>G</sup>O<sup>G</sup>) があります。QuickGene-810 システムを用いて抽出したゲノム DNA で、SNPs 解析による親子鑑定を行うことができます。

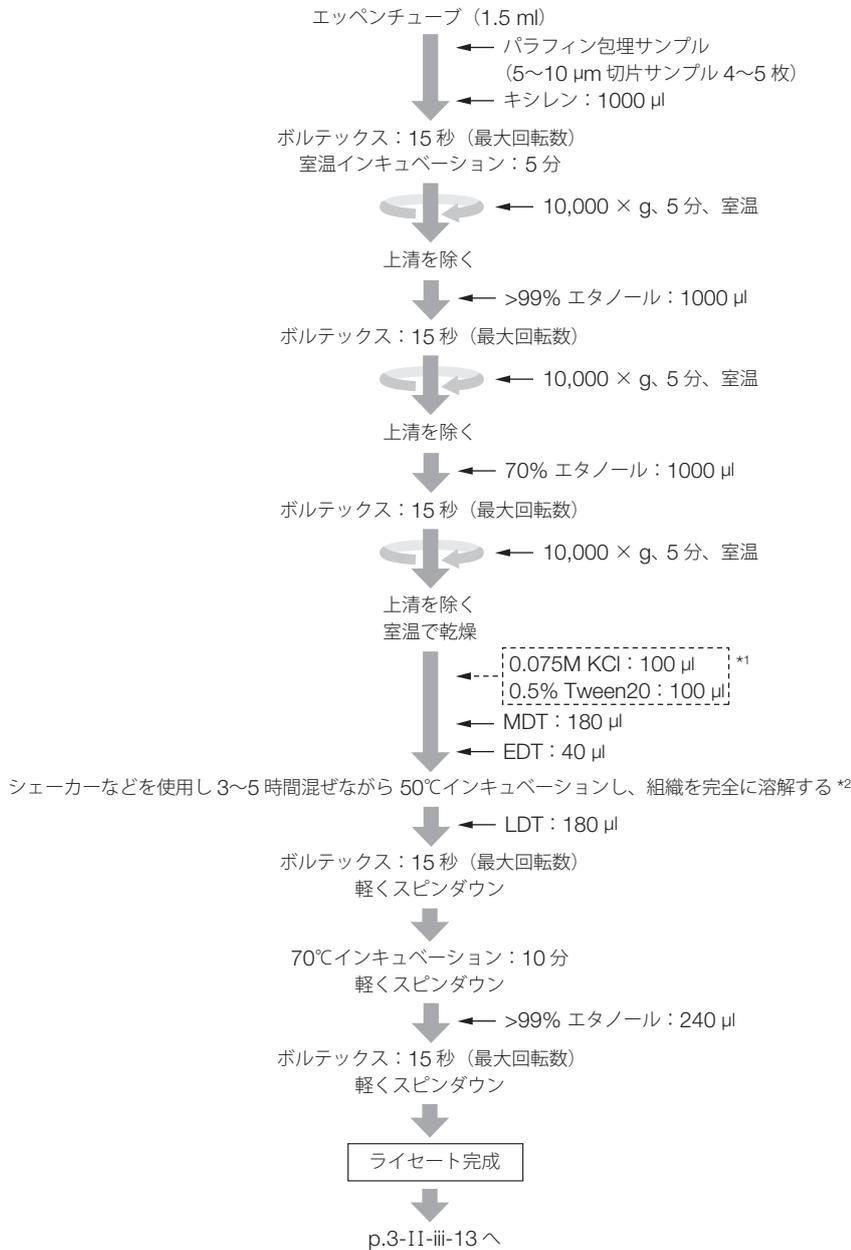
共通プロトコルサンプル

データなし

DA-c-8

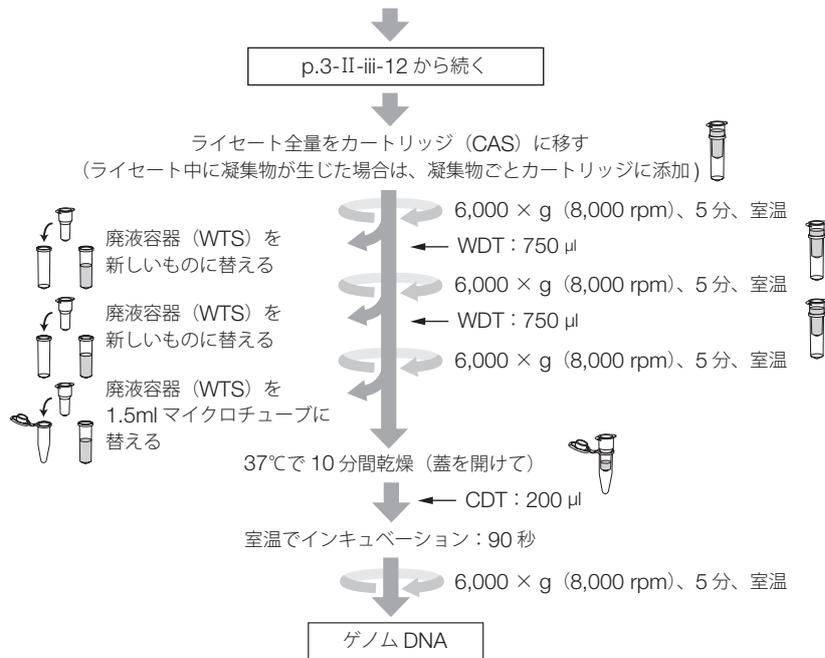
パラフィン包埋サンプルからのゲノム DNA 抽出

プロトコル



\*1 組織によっては、これらの試薬の添加で収量が増します。

\*2 硬組織の場合には、EDT の増加により収量が増します。一晩溶解操作をすると収量が減ることに注意してください。



## 結果

### ■ 電気泳動図

データなし

### ■ ゲノム DNA の収量

サンプル	癌 1	癌 2
QuickGene	1.43 μg	0.58 μg
スピнкаラム法 (A 社)	1.36 μg	0.44 μg

### ■ タンパク質の混入 : A260/280

サンプル	癌 1	癌 2
QuickGene	1.99	1.90
スピнкаラム法 (A 社)	1.98	2.41

### ■ カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

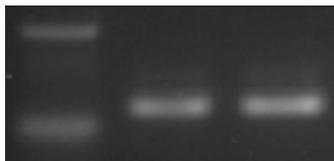
### ■ その他

#### ● PCR

QuickGene SP kit DNA tissue および A 社キット (スピнкаラム法) を用いてパラフィン包埋癌サンプルから抽出したゲノム DNA で、*β-actine* 遺伝子の検出を行った。

癌 1

M スピнкаラム法 (A 社) QuickGene



いずれのゲノム DNA からでも *β-actine* 遺伝子を検出できた。

技術協力 : 日本医科大学 外科学講座 原田 明希摩様

## 共通プロトコルサンプル

データなし



**■ タンパク質の混入：A260/280**

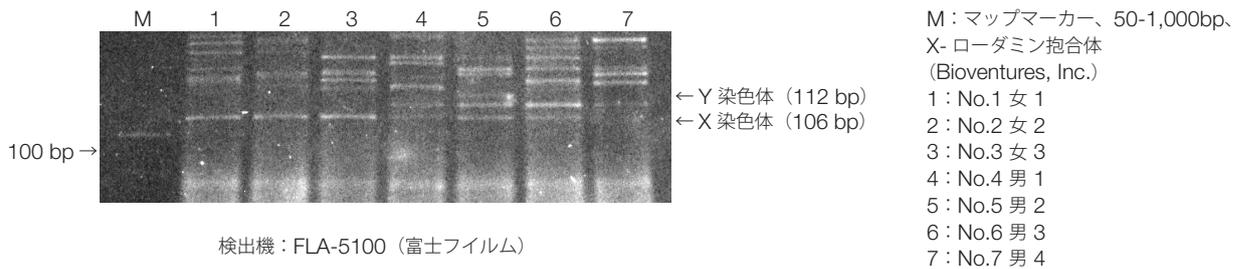
サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7
純度 (A260/280)	1.80	1.70	1.86	1.85	1.52	1.71	1.74

**■ カオトロピック塩の混入：A260/230**

データなし

**■ その他**
**● 性別の判定解析**

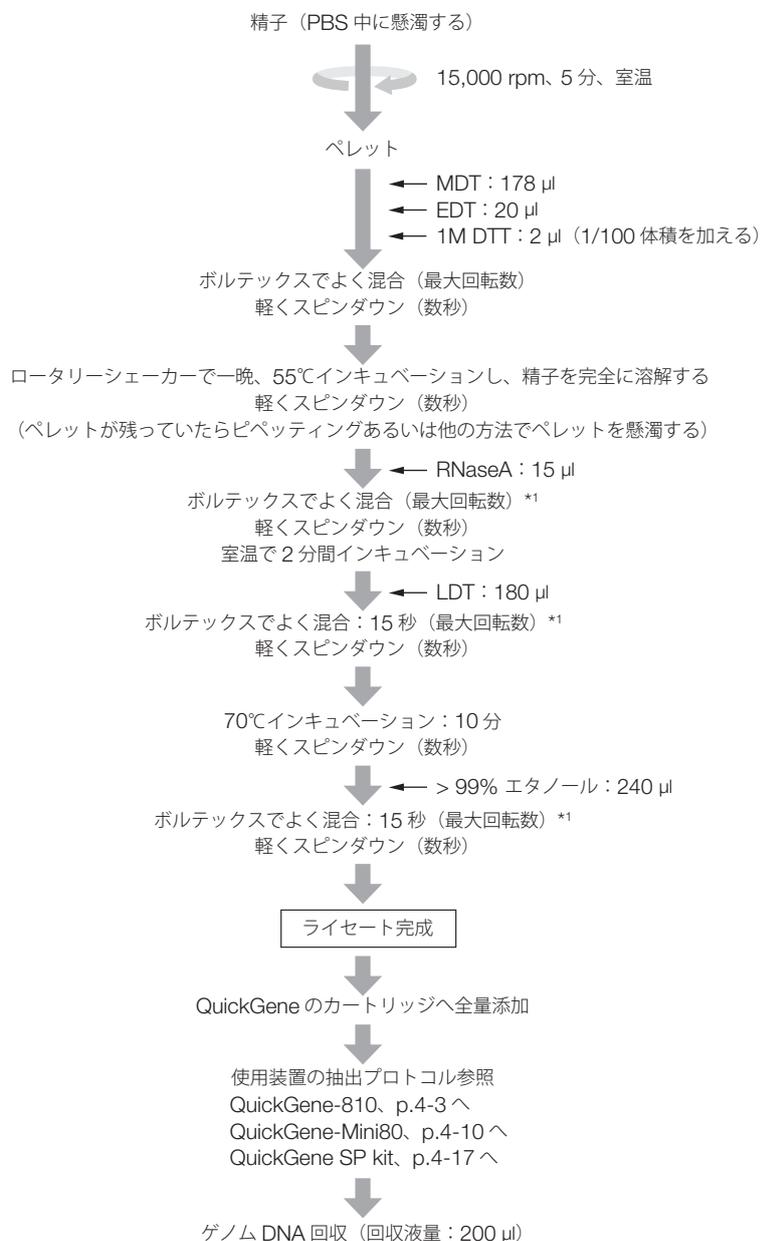
PowerPlex® 16 システムを用いて、縦列型反復配列 (STR、Short Tandem Repeat) に対するマルチプレックス PCR と抽出 DNA の性差解析を行った。アメロゲニン遺伝子は X 染色体と Y 染色体に存在する。この断片差長はドナーの性識別に用いることができる。PowerPlex キットによるマルチプレックス PCR を用いると、性別の判定が 100% 精度で可能である。この事は、Oragene・DNA で採取され QuickGene-610L システムで精製された唾液 DNA が、STR 断片解析において良い成果を表すことを示す。


**■ 共通プロトコルサンプル**

データなし

## マウス精子からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



\*1 ボルテックス (最大回転数) で完全に混合してください。  
ボルテックスで混合不十分ならば、タッピング、ピペッティングまたは転倒混和を使用してください。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### ゲノム DNA の収量 (µg)

精子数	$2.3 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$
QuickGene-810	3.99	3.99
フェノール/クロロホルム法	5.48	2.20

■ タンパク質の混入：A260/280

精子数	$2.3 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$
QuickGene-810	1.75	1.73
フェノール/クロロホルム法	1.6	1.93

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

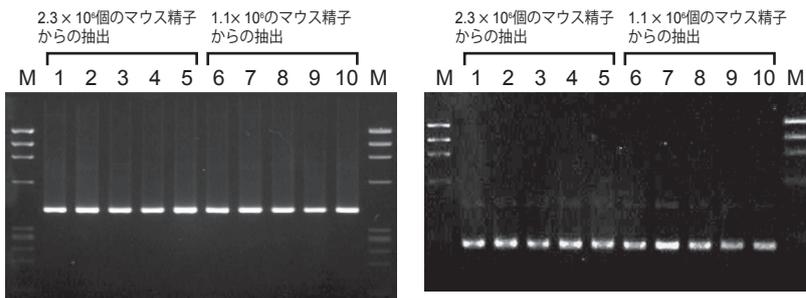
データなし

■ その他

● バイサルファイト処理と PCR

QuickGene-810システムあるいはフェノール/クロロホルム法を用いて抽出されたマウス精子ゲノムDNA 1 µgをバイサルファイト処理を施し PCR テンプレートに使用した。

バイサルファイト処理した DNA 250 ng を用いて、H19、Igf2r の DMR (Differentially methylated regions) をターゲットに PCR を効果的に行った。



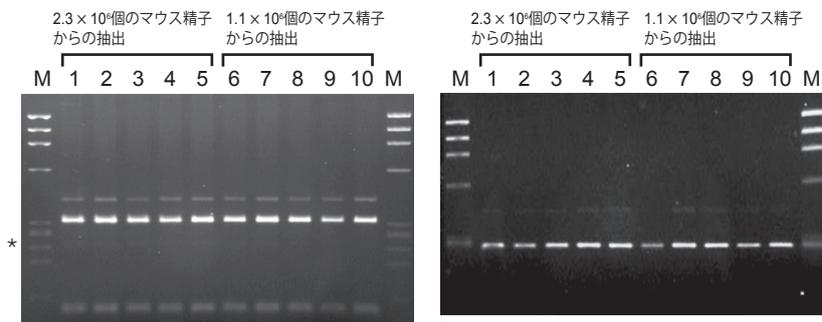
M :  $\phi$  x 174/Hae III マーカー  
1-4, 6-9 : QuickGene-810  
5, 10 : フェノール/クロロホルム

H19 バイサルファイト PCR 電気泳動図

Igf2r バイサルファイト PCR 電気泳動図

● COBRA (combined bisulfite restriction assay) による DNA メチル化解析

3) で得られた、H19 DMR、Igf2r DMR の PCR 生成物を、それぞれ制限酵素 HpyCH4IV、Csp45I により切断した。



M :  $\phi$  x 174/Hae III マーカー  
1-4, 6-9 : QuickGene-810  
5, 10 : フェノール/クロロホルム

H19 COBRA 電気泳動図

Igf2r COBRA 電気泳動図

H19 DMR は、ほとんど完全にメチル化されており、Igf2r DMR は脱メチル化されている。

\* バンドは非メチル化バンドを示す。

したがって QuickGene-810 で抽出した精子 DNA はフェノール/クロロホルム抽出法と同様に、メチル化部分を保ったまま抽出できることが確認された。

■ 共通プロトコルサンプル

データなし



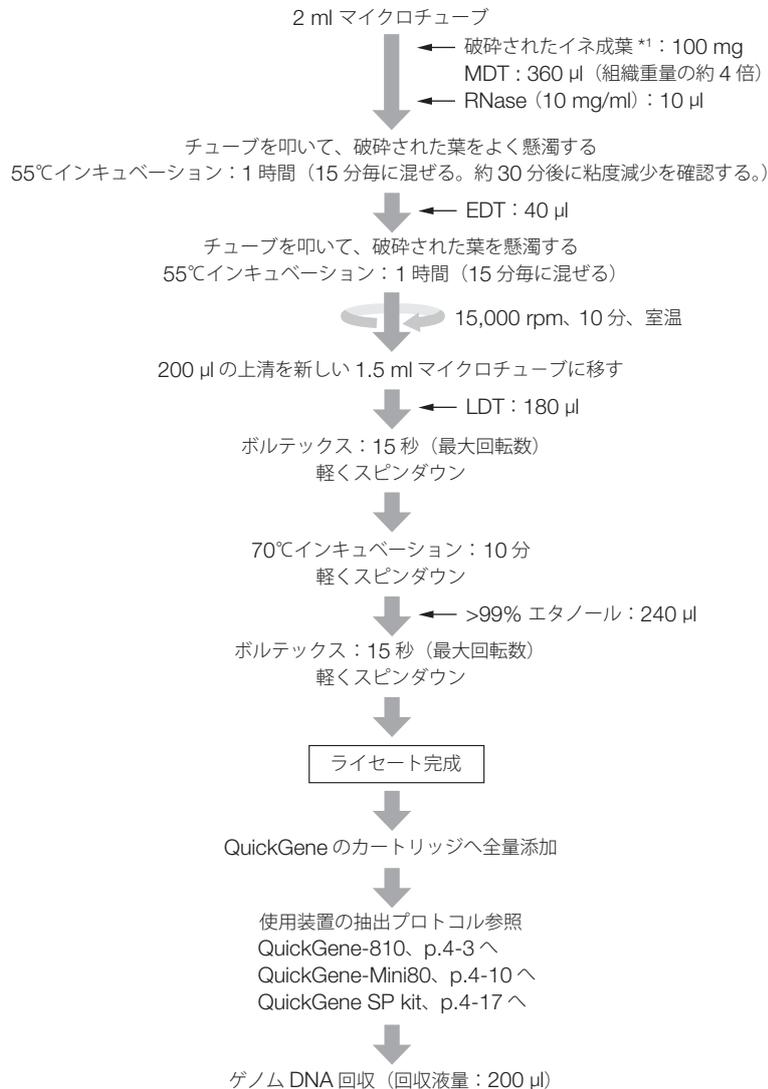
## 3-III 章

### 植物組織からのゲノム DNA抽出

---

## イネ成葉からのゲノム DNA 抽出

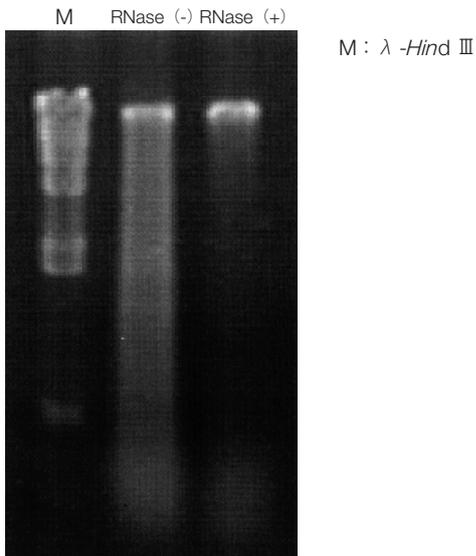
### プロトコル



\*1 マルチピースショッカー  
(安井機械 (株)) を破碎に使用。

結果

電気泳動図



ゲノム DNA の収量

	収量 (μg)
RNase (+)	10
RNase (-)	36

タンパク質の混入：A260/280

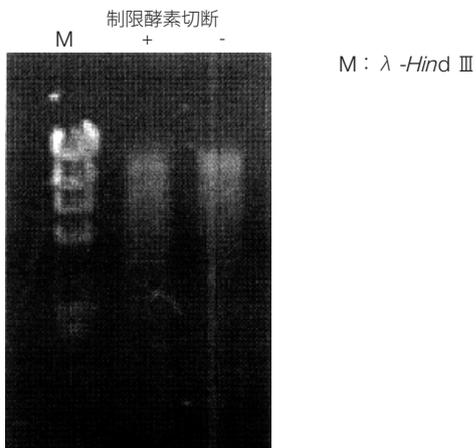
データなし

カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

その他

- 制限酵素切断



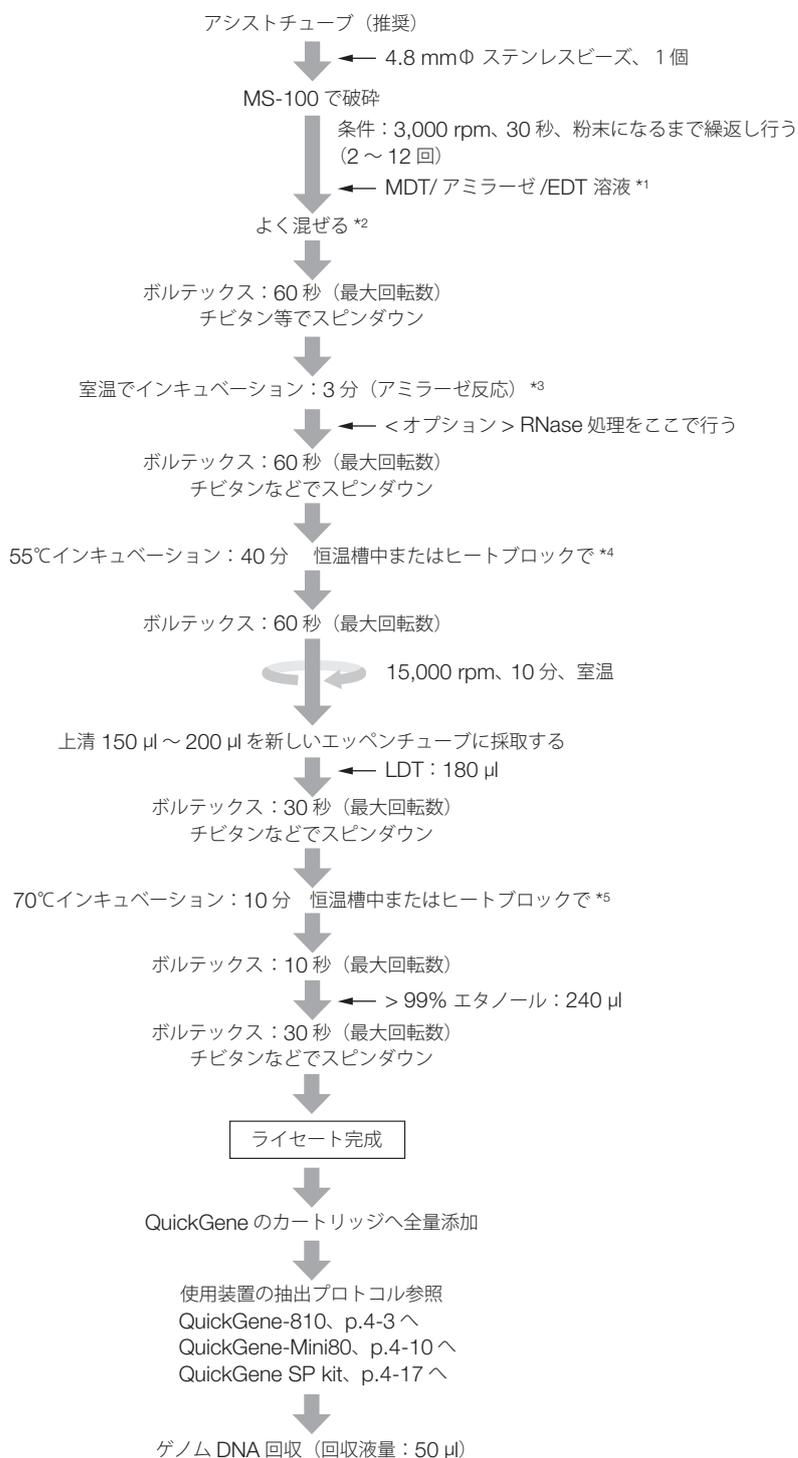
(データ提供：福井県立大学 生物資源学部 岩崎行玄 先生、藤澤由起子 先生)

共通プロトコルサンプル

データなし

# アマランサス種子からのゲノム DNA 抽出

## プロトコル



\*1 SIGMA A-3403

1 サンプルにつき  
αアミラーゼ\* .....1 µl  
EDT (ProK) .....20 µl  
MDT .....180 µl  
アミラーゼを入れると収量が 10 倍近く上がるが、PCR 実験は未確認のため、PCR がかからなければ操作を削除。

\*2 ビーズがはまり込んで動かない時には、チューブを逆さまにして机上で 1 回叩く。  
ビーズを壁内をまんべんなく這わせるようにチューブを振りながら回転させ、ムラをなくす。  
初めはもちもちだが、水に溶かした小麦粉状になる。

\*3 ProK はこの温度では働かないが、アミラーゼが働く。

\*4 ProK によるタンパク質分解過程。

\*5 アミラーゼを使用しているため、より強力にタンパク質を壊すため。

\*PCR のかかりが悪いなど、トラブルがある場合は操作を削除。

## 結果

---

- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入：A260/280  
データなし
- グアニジウム塩（カオトロピック塩）の混入：A260/230  
データなし
- その他  
データなし

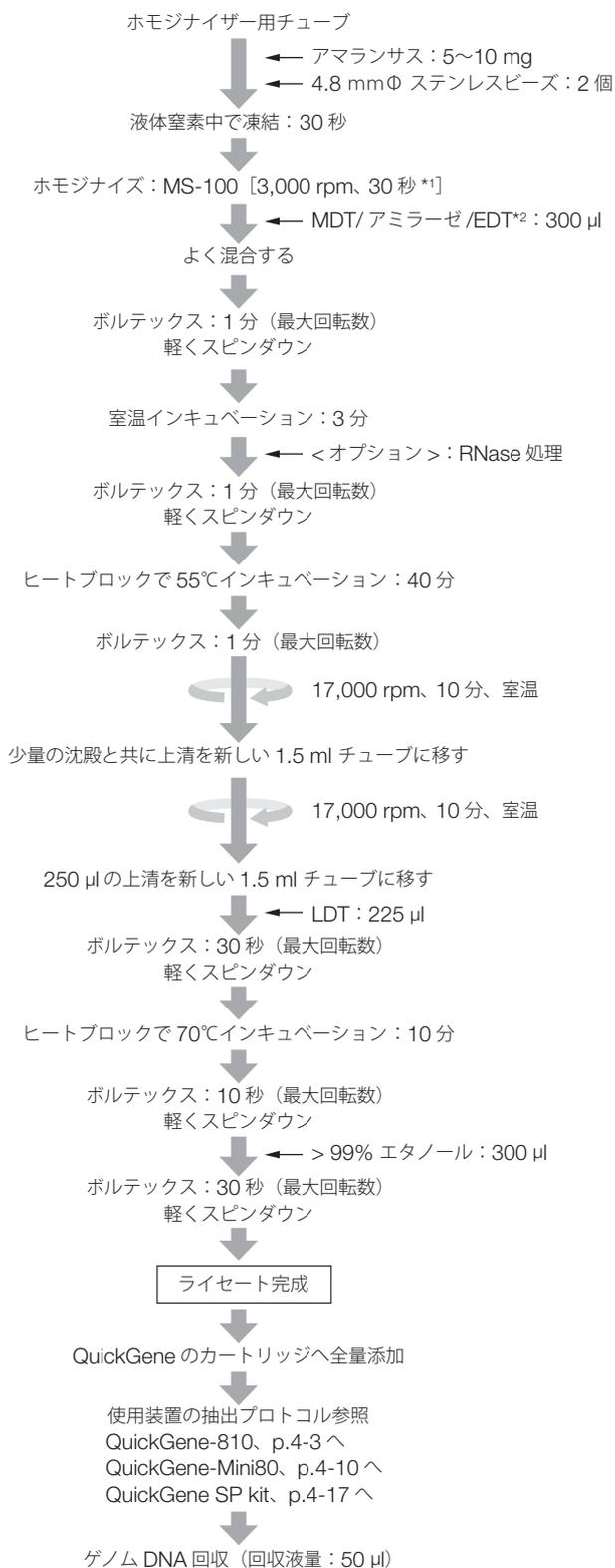
## 共通プロトコルサンプル

---

データなし

## アマランサスからのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



\*1 ホモジナイズで粉末状になる。

\*2 1 サンプルにつき  
α アミラーゼ\*...1.5 µl  
EDT (ProK) ...30 µl  
MDT .....270 µl

\*SIGMA A-3403

このプロセスで、アミラーゼは反応するが、ProK は反応しない。

このプロセスで、ProK が反応する。

トラブル(PCR 反応が不良)の場合は、このプロセスは削除。

## 結果

### 電気泳動図

M 1 2



1 : 5 mg アマランサス  
2 : 10 mg アマランサス  
M :  $\lambda$ -Hind III マーカー

1% アガロース  
EtBr 染色  
100V  
30分  
RNase 処理

検出機 : LAS-3000 (富士フイルム)

### ゲノム DNA の収量

サンプルは検出限界以下。

### タンパク質の混入 : A260/280

データなし

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

### その他

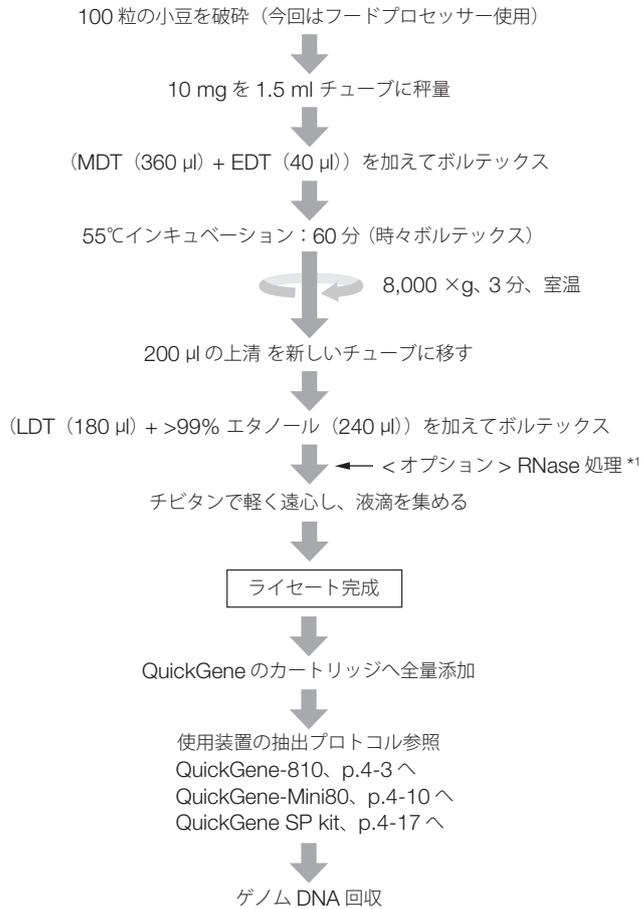
データなし

## 共通プロトコルサンプル

レタス

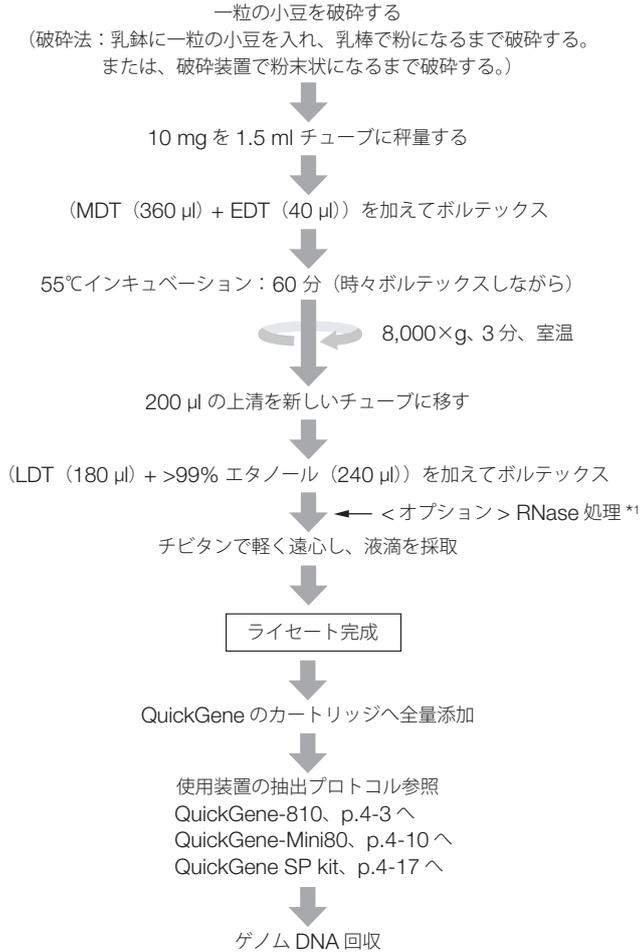
## 小豆からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル 1



\*1 20 μl の 100 mg/ml  
RNase A を添加。  
タッピングし軽くスピンドウン  
室温で 2 分間反応。

## プロトコル 2



\*1 20 µl の 100 mg/ml RNase A を加える。タッピングし、軽くスピンドウン。室温で反応 2 分間。

## 結果

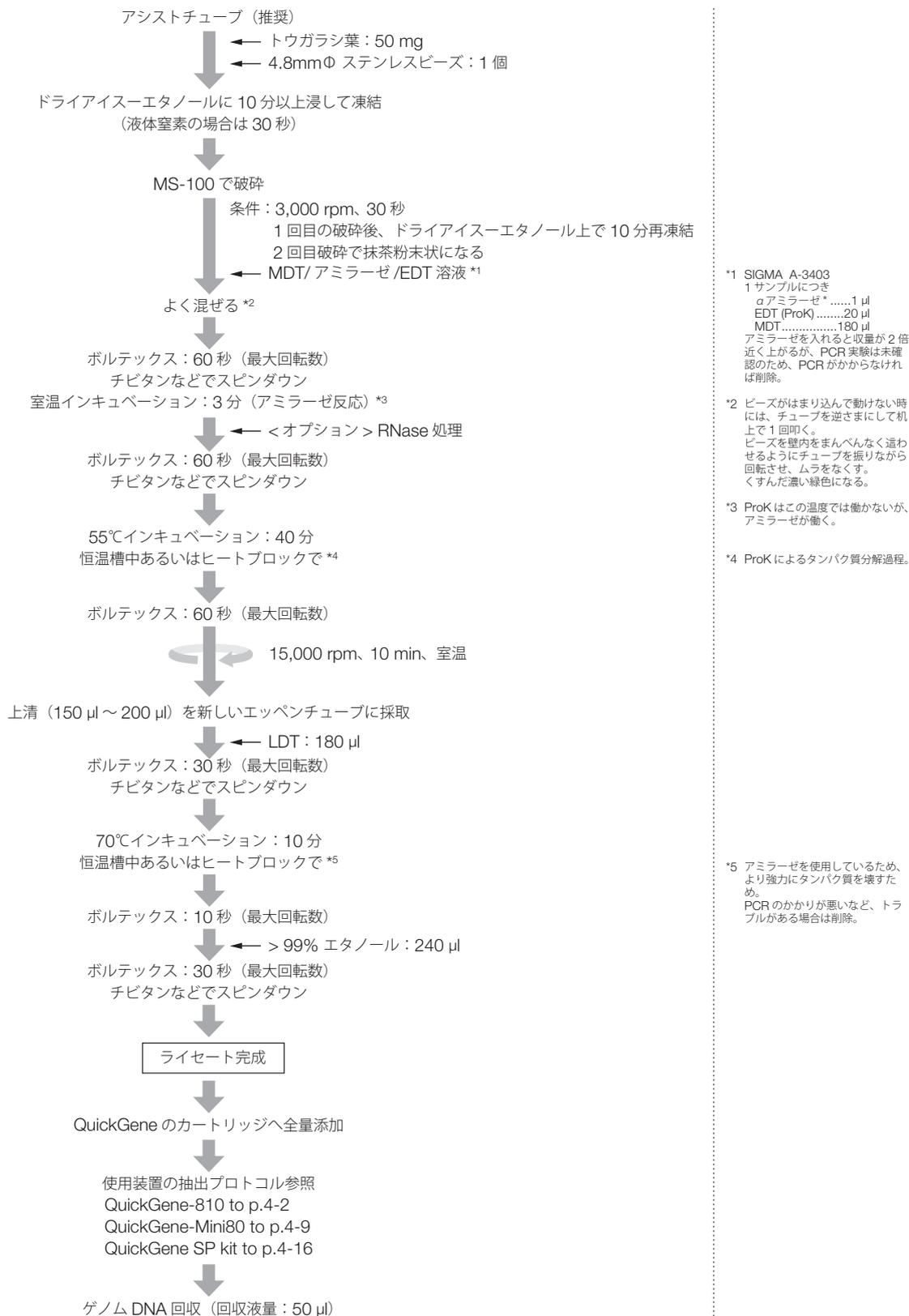
- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入：A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入：A260/230  
データなし
- その他  
データなし

## 共通プロトコルサンプル

データなし

## トウガラシ葉からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



\*1 SIGMA A-3403  
1 サンプルにつき  
αアミラーゼ\* .....1 µl  
EDT (ProK) .....20 µl  
MDT .....180 µl  
アミラーゼを入れると収量が 2 倍近く上がるが、PCR 実験は未確認のため、PCR がからなければ削除。

\*2 ビーズがはまり込んで動かない時には、チューブを逆さまにして机上で 1 回叩く。  
ビーズを壁内をまんべんなく混ぜるようにチューブを振りながら回転させ、ムラをなくす。  
くすんだ濃い緑色になる。

\*3 ProK はこの温度では働かないが、アミラーゼが働く。

\*4 ProK によるタンパク質分解過程。

\*5 アミラーゼを使用しているため、より強力にタンパク質を壊すため。  
PCR のかかりが悪いなど、トラブルがある場合は削除。

### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ ゲノム DNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

データなし

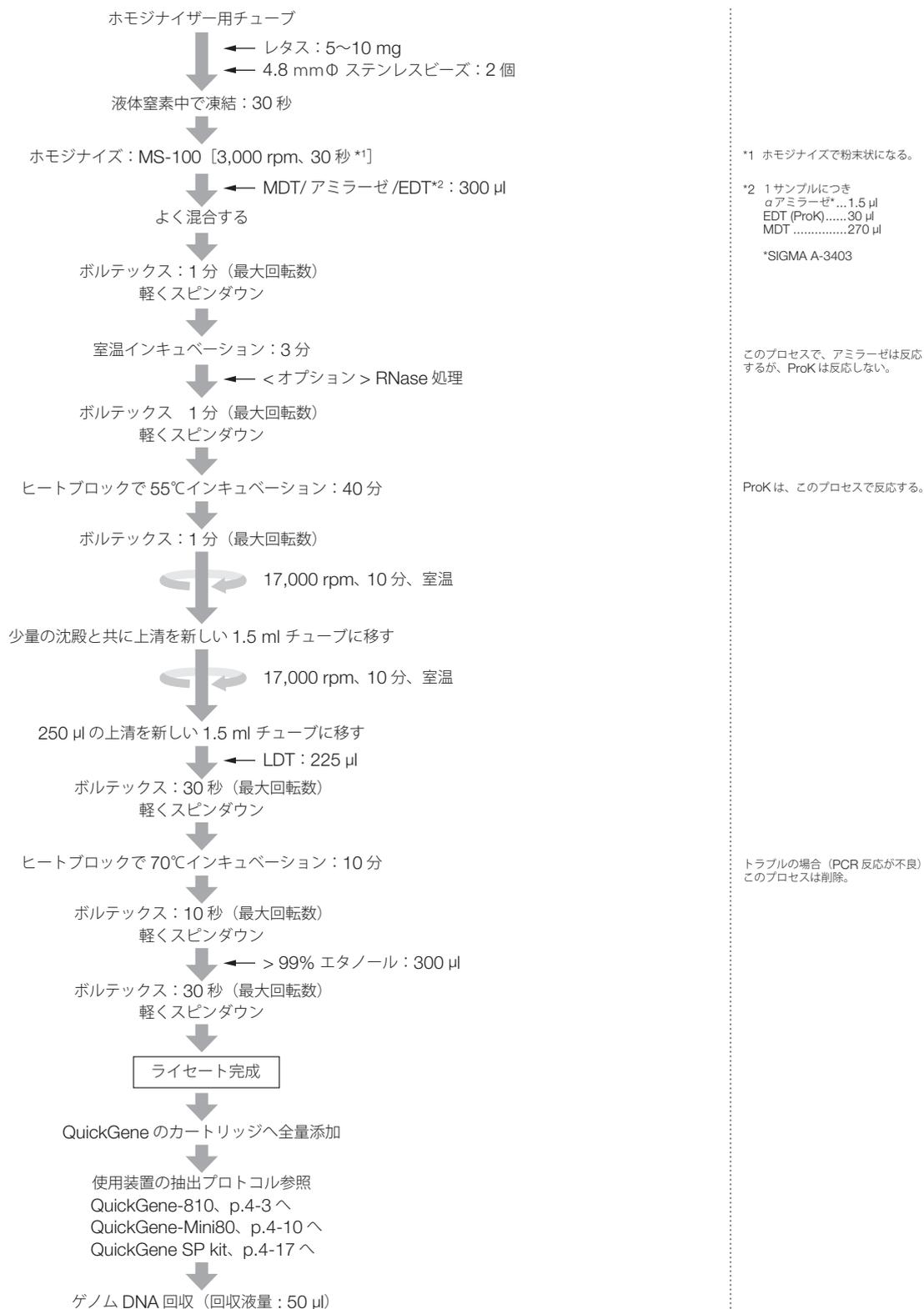
## 共通プロトコルサンプル

---

データなし

## レタスからのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



## 結果

### 電気泳動図

1 2 M



1 : 5 mg レタス  
2 : 10 mg レタス  
M :  $\lambda$ -Hind III マーカー

1% アガロース  
EtBr 染色  
100V  
30分  
RNase 処理

検出機 : LAS-3000 (富士フイルム)

### ゲノム DNA の収量

レタスの量	
10 mg	1.2 $\mu$ g

他のサンプルは検出限界以下。

### タンパク質の混入 : A260/280

データなし

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

### その他

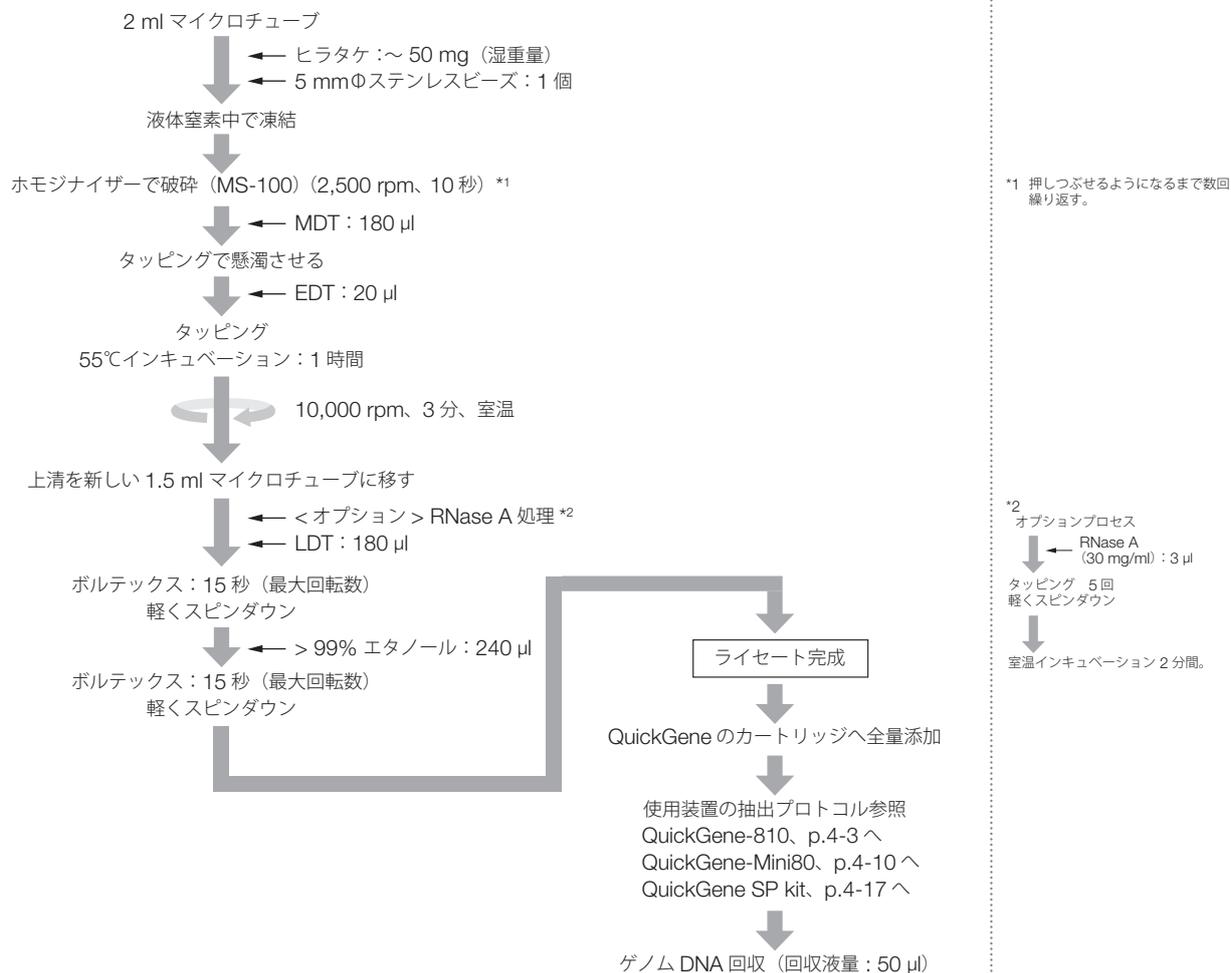
データなし

## 共通プロトコルサンプル

アマランサス

## ヒラタケからのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



### 結果

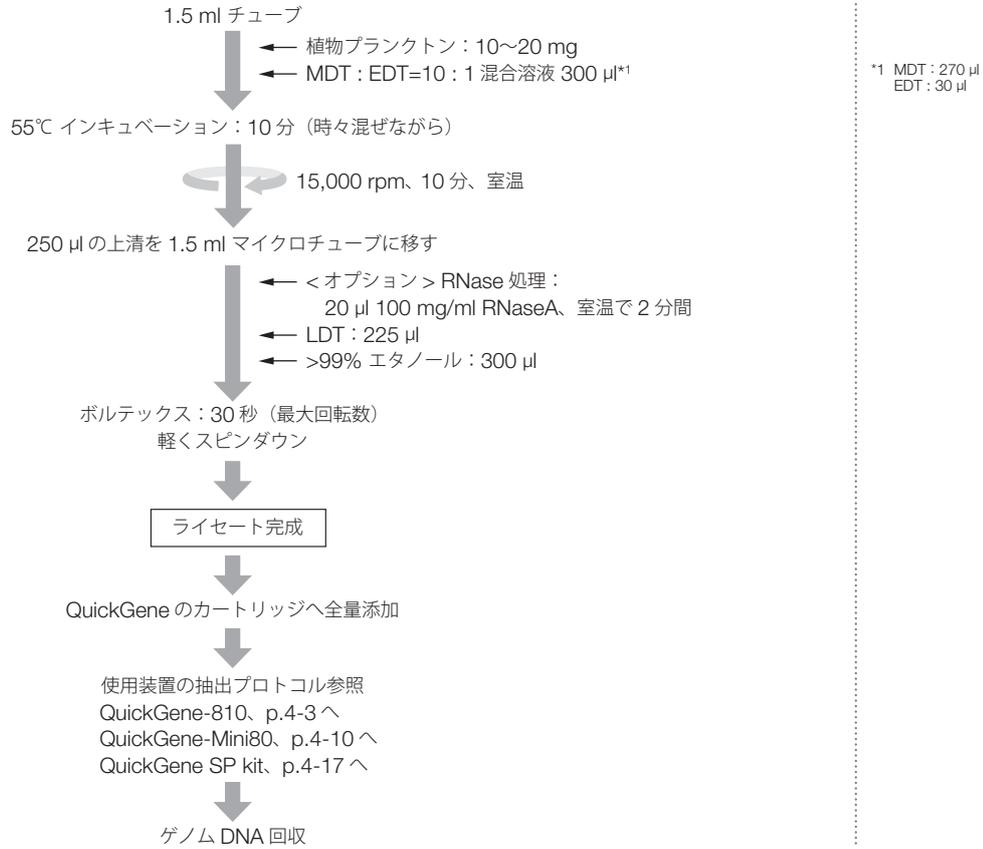
- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし
- その他  
データなし

### 共通プロトコルサンプル

データなし

## 植物プランクトンからの DNA 抽出

### プロトコル



### 結果

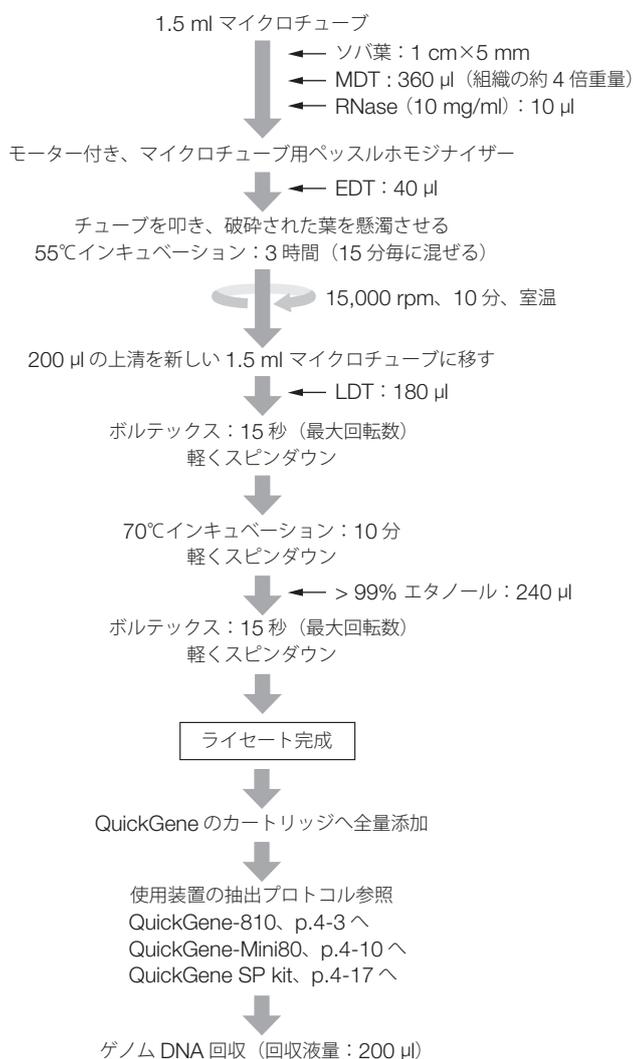
- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入：A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入：A260/230  
データなし
- その他  
データなし

### 共通プロトコルサンプル

データなし

## ソバ葉からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### ゲノム DNA の収量

データなし

#### タンパク質の混入：A260/280

データなし

#### カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

#### その他

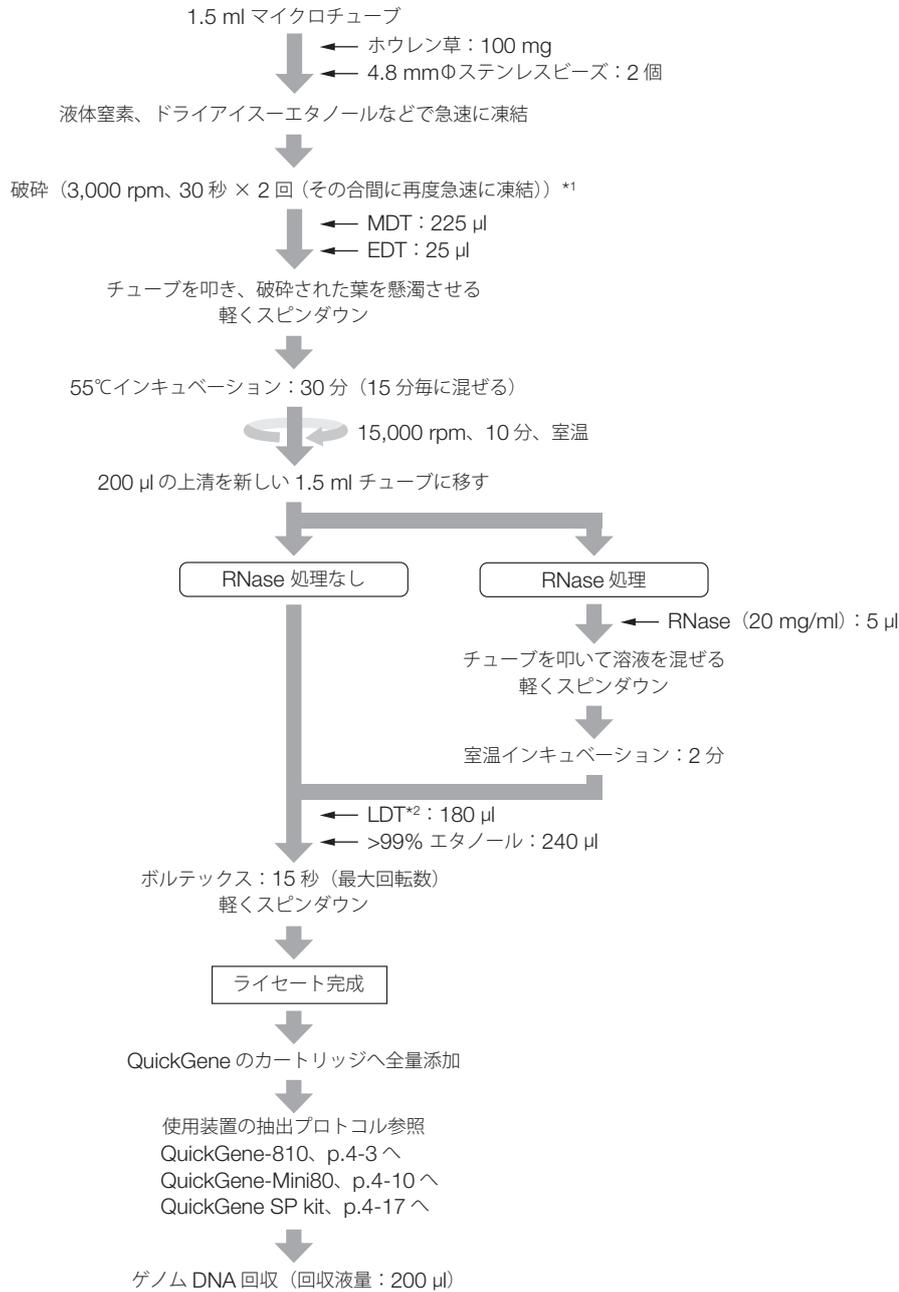
データなし

### 共通プロトコルサンプル

データなし

# ホウレン草からのゲノム DNA 抽出

## プロトコル

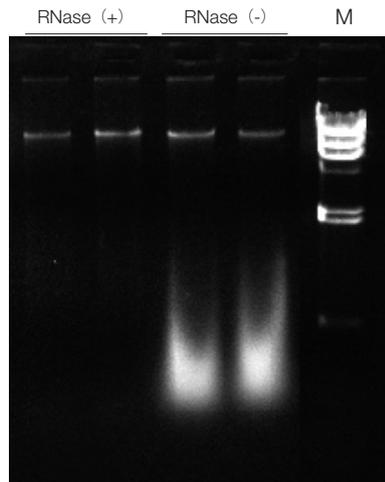


\*1 MS-100 (トミー精工) を破碎に使用した。

\*2 LDT 添加後沈殿が生じたら、数分間 70°C インキュベーションして沈殿を溶解した後、>99% エタノールを加えてください。

## 結果

### 電気泳動図



電気泳動条件：1% アガロース / 1 × TAE

M：λ - *Hind* III

### ゲノム DNA の収量

RNase (+)	3.6 μg	4.0 μg	2.8 μg	6.9 μg
RNase (-)	39.6 μg	14.8 μg	44.8 μg	52.0 μg

### タンパク質の混入：A260/280

RNase (+)	1.94	1.87	1.80	1.97
RNase (-)	2.22	2.16	2.24	2.24

### カオトロピック塩の混入：A260/230

RNase (+)	1.76	1.89	1.77	2.04
RNase (-)	2.24	1.99	2.26	2.29

### その他

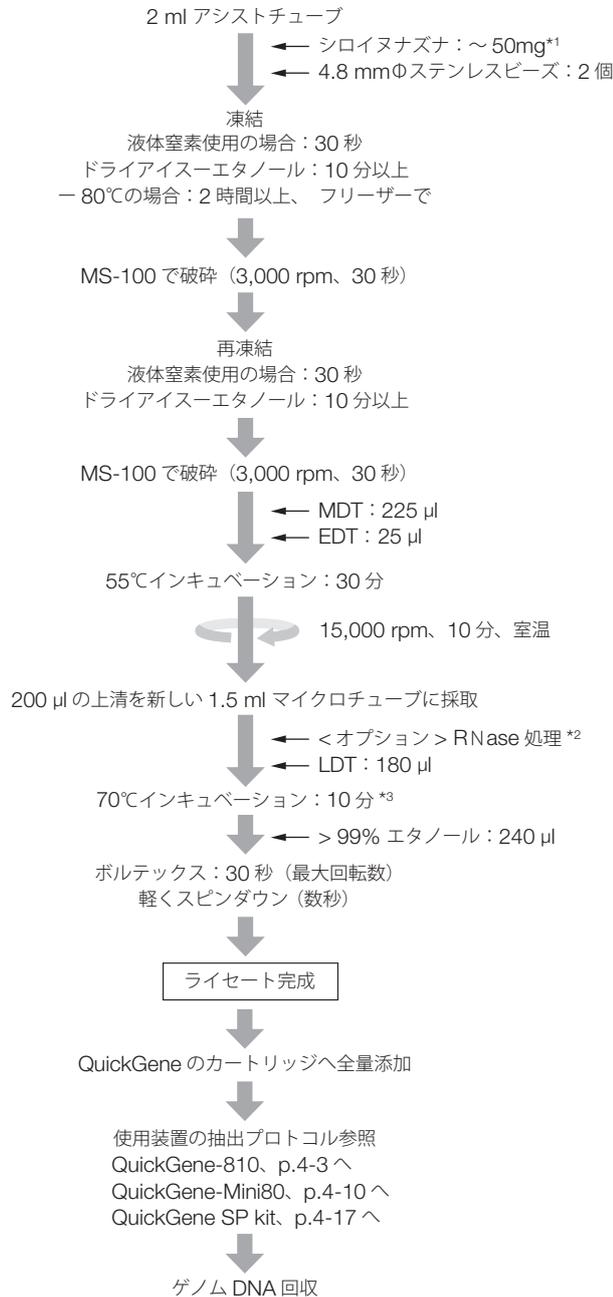
データなし

## 共通プロトコルサンプル

データなし

## シロイヌナズナからのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



\*1 成長条件によっては、50 mg が処理できない場合があります。最初に、20～30 mg で試し、それから量を増やしてください。

\*2 20 μl の推奨 RNase A 100 mg/ml を加え、室温で2分

\*3 LDT の添加後沈殿が生じた場合にこのプロセスを行ってください。沈殿が溶けたら10分以下でOKです。

### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ ゲノム DNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

データなし

## ■ 共通プロトコルサンプル

---

データなし

## ウスバアオノリ (*Ulva Linza*) からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



### 結果

- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入：A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入：A260/230  
データなし
- その他  
データなし

### 共通プロトコルサンプル

データなし



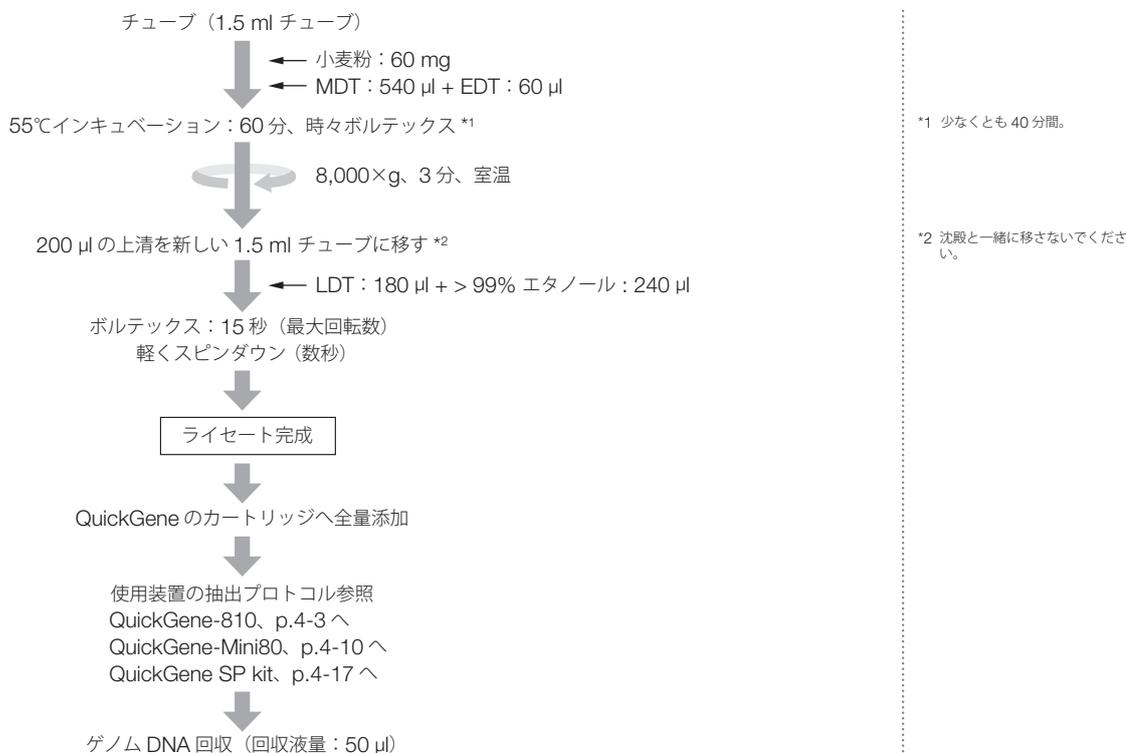
## 3-IV 章

### 食品からのゲノム DNA抽出

---

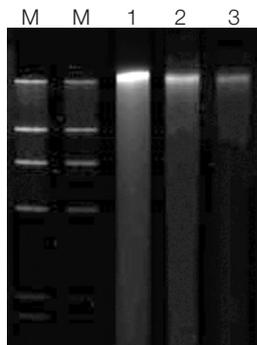
## 小麦粉からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



### 結果

#### 電気泳動図



M :  $\lambda$ -Hind III  
1 : ゲノム DNA  
2 : 2 倍希釈ゲノム DNA  
3 : 4 倍希釈ゲノム DNA

#### ゲノム DNA の収量

小麦粉の量	収量 (µg)
60 mg	0.3

#### タンパク質の混入 : A260/280

データなし

#### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

#### その他

データなし

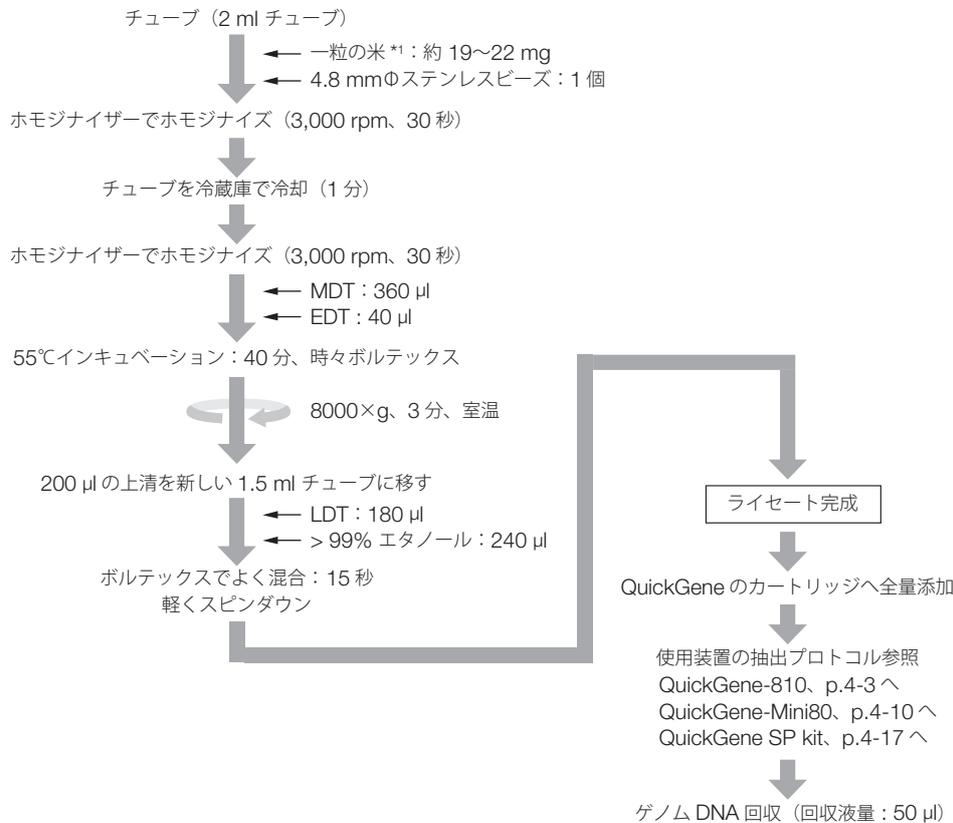
### 共通プロトコルサンプル

データなし

DC-2

米からのゲノム DNA 抽出

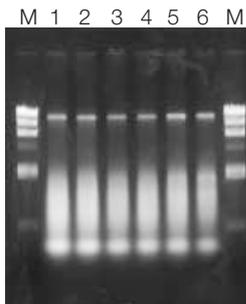
プロトコル



DC-2

結果

電気泳動図



M : λ-Hind III 断片  
1 : 無洗米 (洗っていない米)  
2 : 無洗米 (洗っていない米)  
3 : 精白米  
4 : 精白米  
5 : 玄米  
6 : 玄米  
M : λ-Hin d III 断片

ゲノム DNA の収量

データなし

タンパク質の混入 : A260/280

データなし

カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

その他

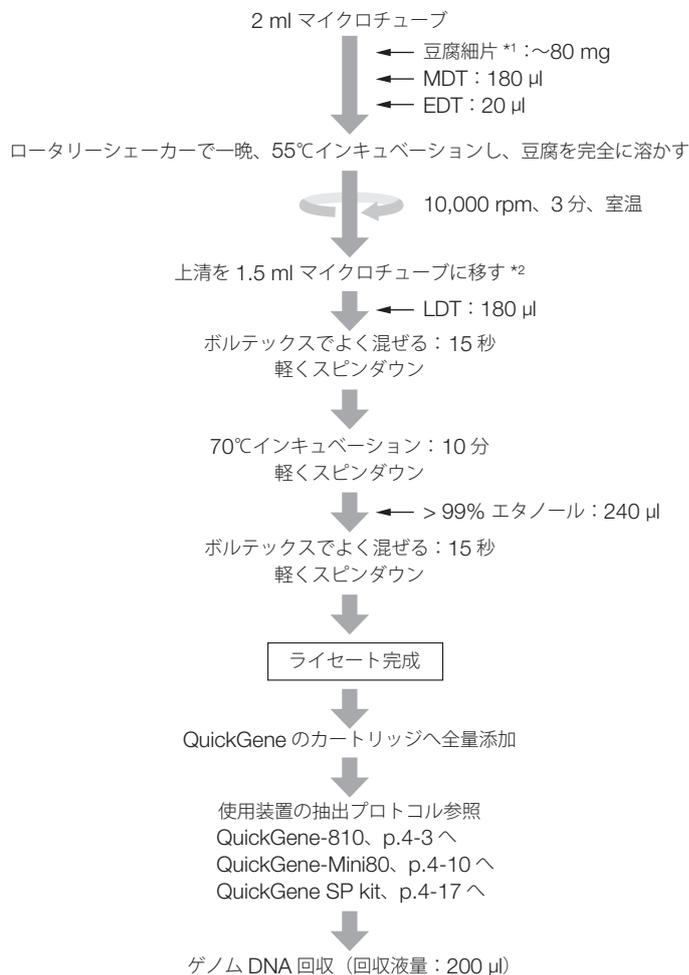
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

## 豆腐からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル

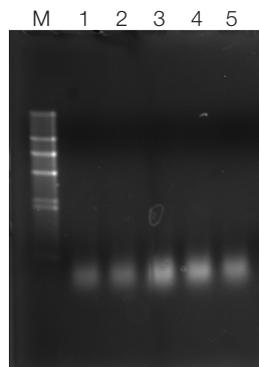


\*1 豆腐はペーパータオルで、一晩挟み、水抜きする。

\*2 上清に浮いた油分は回収しない。

### 結果

#### 電気泳動図



M : マーカー  
1 : 豆腐 5 mg  
2 : 豆腐 10 mg  
3 : 豆腐 30 mg  
4 : 豆腐 50 mg  
5 : 豆腐 80 mg

### ■ ゲノム DNA の収量

豆腐の量	濃度 (ng/μl)
5 mg	42.81
10 mg	104.85
30 mg	254.18
50 mg	498.0
80 mg	394.3

### ■ タンパク質の混入：A260/280

豆腐の量	A260/280
5 mg	1.92
10 mg	1.87
30 mg	1.93
50 mg	2.07
80 mg	2.02

### ■ カオトロピック塩の混入：A260/230

豆腐の量	A260/230
5 mg	1.29
10 mg	1.35
30 mg	1.98
50 mg	2.05
80 mg	1.93

### ■ その他

データなし

## ■ 共通プロトコルサンプル

データなし



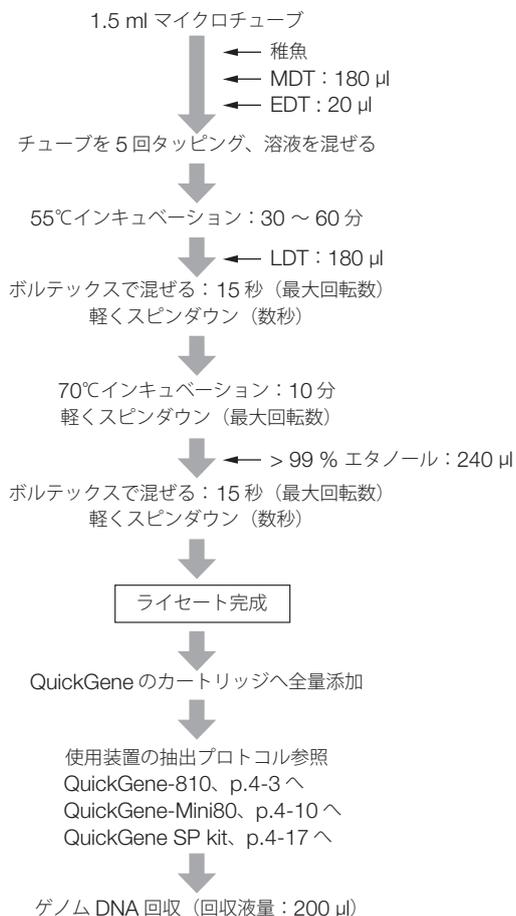
## 3-V 章

### 魚および貝からのゲノム DNA抽出

---

## 稚魚からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ ゲノム DNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

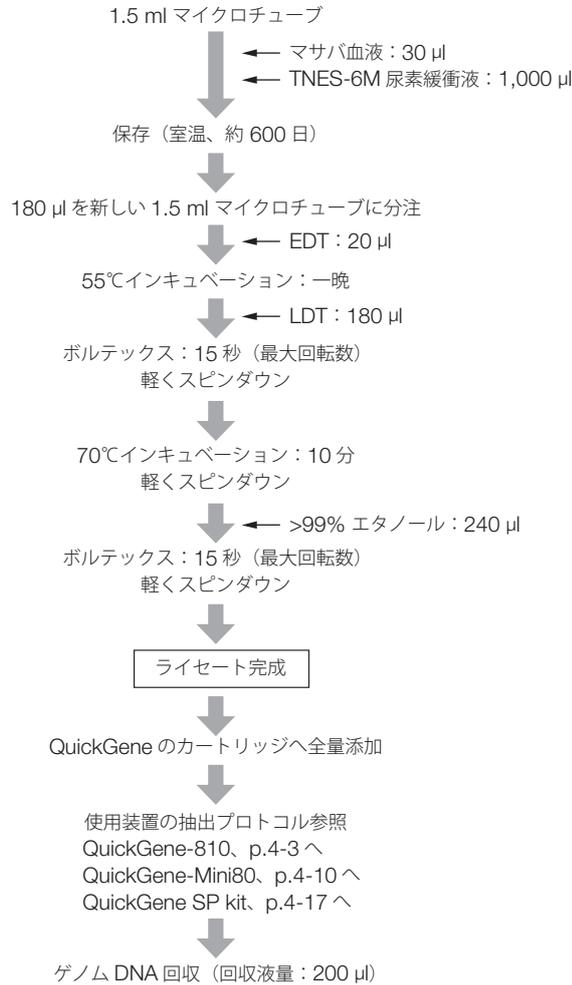
データなし

### 共通プロトコルサンプル

シジミ

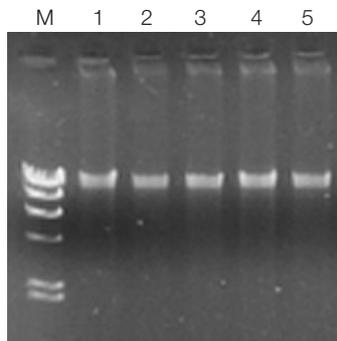
# TNES-6M 尿素緩衝液中で長期間保存されたマサバ血液からの DNA 抽出

## プロトコル



## 結果

### 電気泳動図



M:  $\lambda$ -Hind III digest  
1 ~ 5: マサバサンプル

■ ゲノム DNA の収量

	サンプル 1	サンプル 2	サンプル 3	サンプル 4	サンプル 5
収量 (μg)	13.2	11.6	9.5	9.1	16.6

■ タンパク質の混入：A260/280

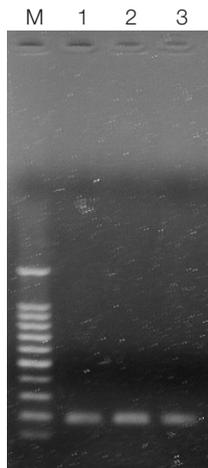
データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

● PCR



M：マーカー（100 bp DNA Ladder：TaKaRa）  
1～3：マサバサンプル

QuickGene システムを用いて、TINES-6M 尿素緩衝液中で長期間保存されたマサバの血液から抽出した DNA を用いて、マイクロサテライトの PCR を行った。  
いずれのサンプルでも増幅産物の電気泳動バンドを検出できた。

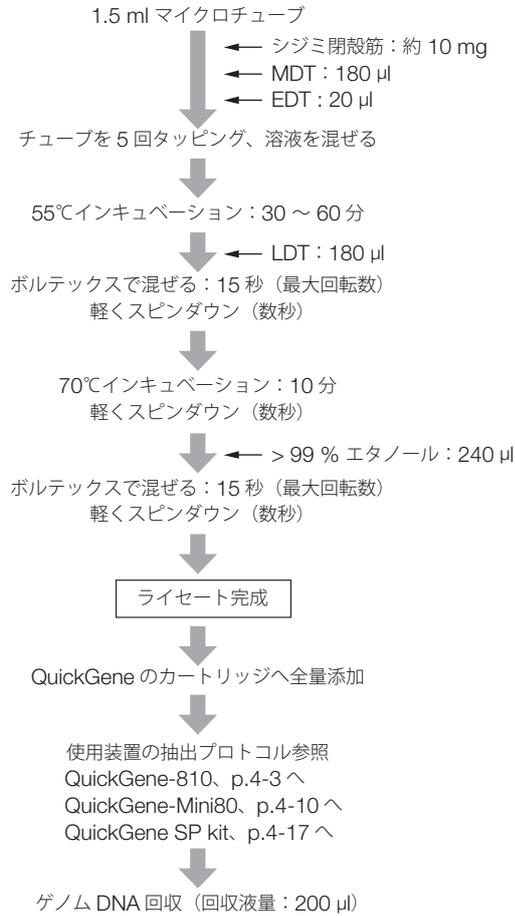
■ 共通プロトコルサンプル

データなし

DD-3

シジミからのゲノム DNA 抽出

プロトコル



結果

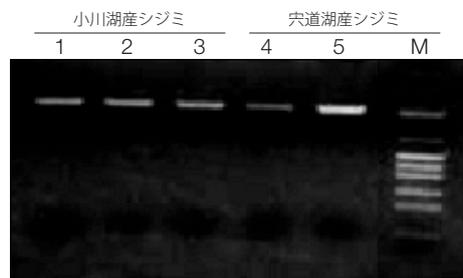
- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入：A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入：A260/230  
データなし

■ その他

● QuickGene システムを用いて抽出した mtDNA で行った PCR

(EDT 処理時間の検討実験)

QuickGene システムを用いて、10 mg のシジミ閉殻筋から抽出した mtDNA で、COI1 - 16SrRNA にかけての約 5Kbp をターゲットに PCR を行った。



M : pHY マーカー (TAKARA BIO INC.)

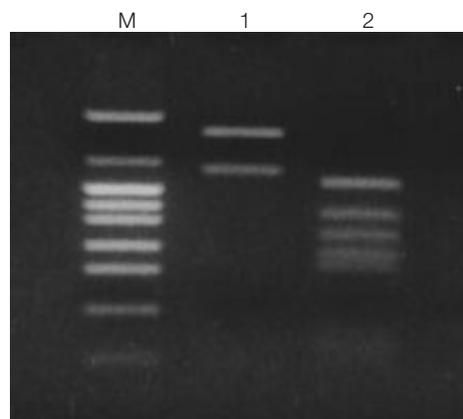
1,4 : EDT 処理 10分

2,5 : EDT 処理 30分

3 : EDT 処理 60分

● QuickGene システムを用いて抽出した mtDNA に対し PCR を行った後の制限酵素切断

QuickGene システムを用いて、10 mg のシジミ閉殻筋から抽出した mtDNA で、COI1 - 16SrRNA にかけての約 5Kbp をターゲットに PCR を行った後、制限酵素 (*Msp* I) 切断を行った。



M : pHY マーカー (TAKARA BIO INC.)

1 : 宍道湖産ヤマトシジミ

2 : 淡水シジミ

QuickGene システムを用いてシジミ閉殻筋から抽出した mtDNA で、シジミ種を判別できた。

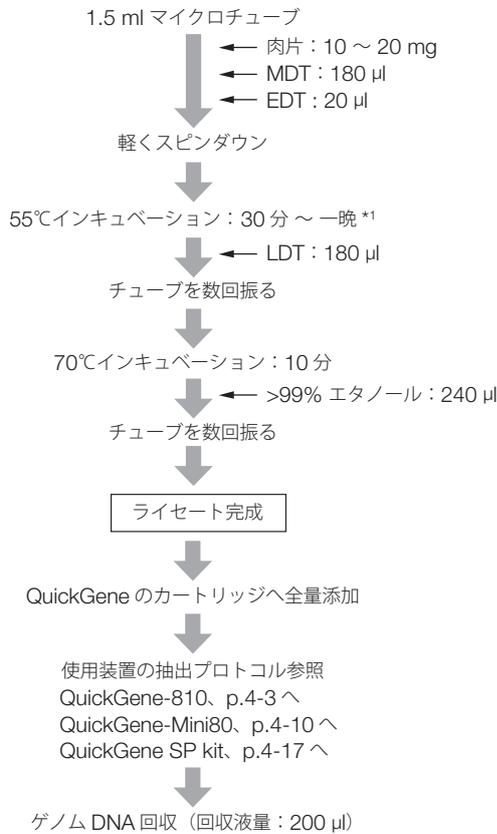
■ 共通プロトコルサンプル

稚魚

DD-4

海洋生物からのゲノム DNA 抽出

プロトコル



\*1 肉片が溶けた段階で終了。

DD-4

結果

電気泳動図

データなし

ゲノム DNA の収量

キンメダイ、エゾイバラガニ、マグロ類、コウイカの 10 個体の平均収量

魚種名	濃度 (µg)
キンメダイ	2.2
エゾイバラガニ	2.8
マグロ類	2.1
コウイカ	4.6

タンパク質の混入：A260/280

キンメダイ、エゾイバラガニ、マグロ類、コウイカの 10 個体の平均純度

魚種名	260/280
キンメダイ	1.70
エゾイバラガニ	1.72
マグロ類	2.29
コウイカ	2.31

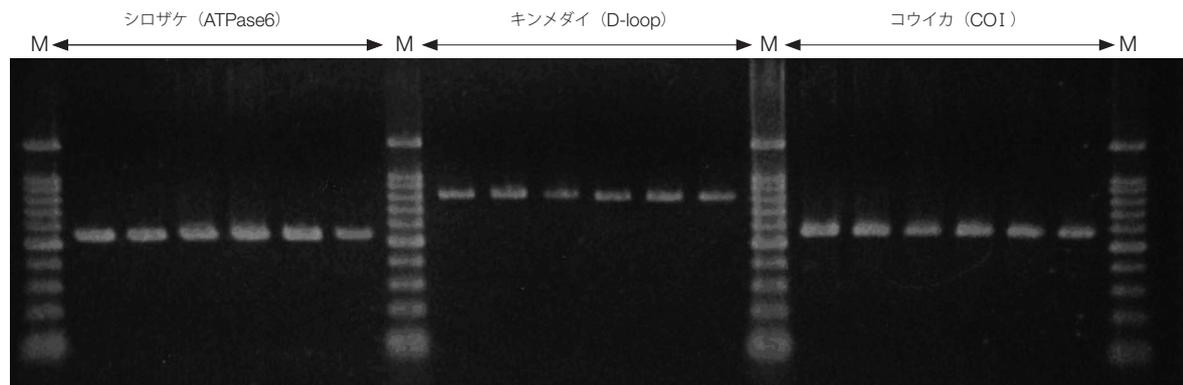
カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

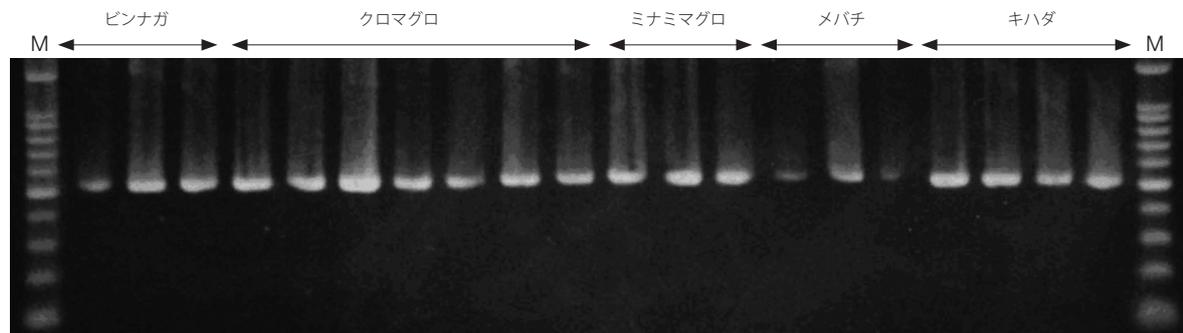
■ その他

● PCR

QuickGene を用いて抽出した DNA から PCR を行った例



QuickGene を用いて抽出した DNA から PCR を行った例 (マグロ類、ATPase6-COIII)



M : 100dp Ladder (Qiagen)

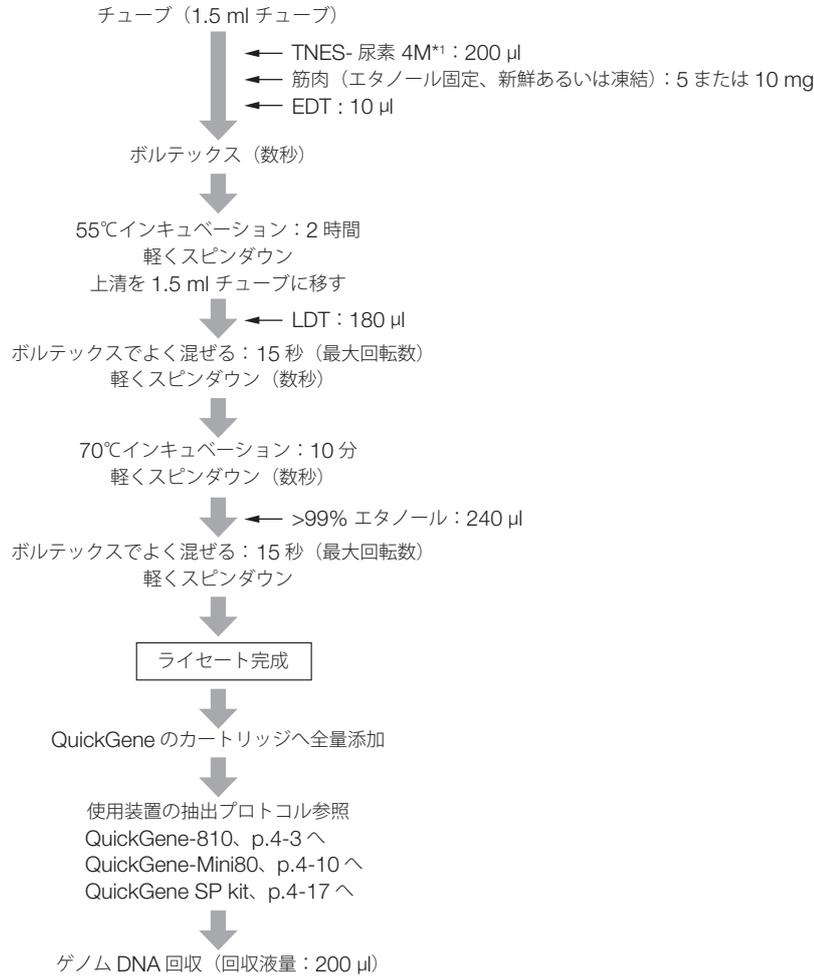
■ 共通プロトコルサンプル

データなし

DD-5

フグ筋肉からのゲノム DNA 抽出

プロトコル



\*1 <TNES-尿素 4M>  
10mM トリス塩酸 pH7.5  
125mM 塩化ナトリウム (NaCl)  
10mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)  
1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 4M 尿素

結果

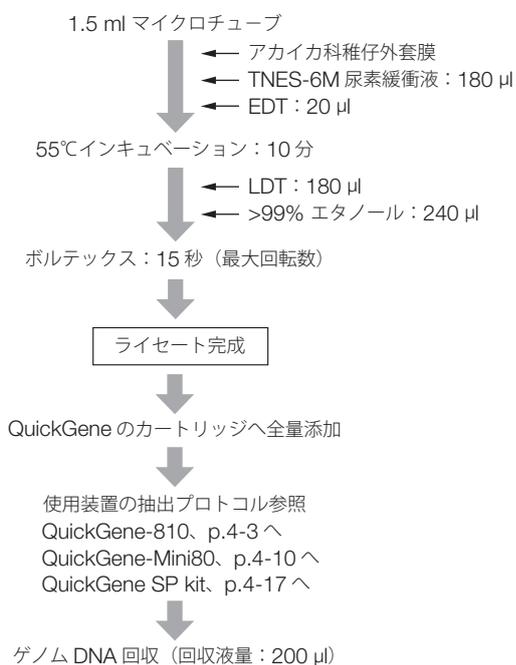
- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし
- その他  
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

## 船上でのアカイカ科稚仔からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### ゲノム DNA の収量

	収量 (ng)
1	1.7
2	2.2
3	1.6
4	2.9
5	2.5

#### タンパク質の混入: A260/280

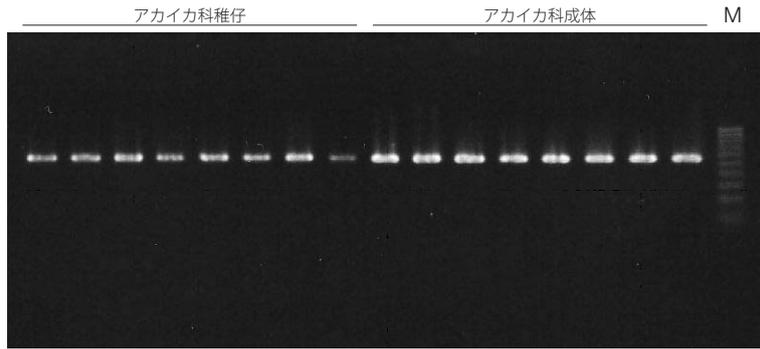
データなし

#### カオトロピック塩の混入: A260/230

データなし

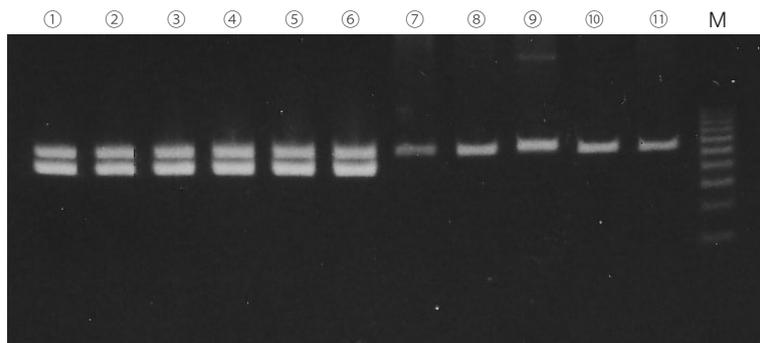
■ その他

● PCR



M : DNA Ladder マーカー 100bp (BEXEL)  
ごく少量の組織から回収した DNA でも成体とかわらない電気泳動図が得られた。

● SSP-PCR



①～⑥ : アメリカオオアカイカ  
⑦～⑪ : アメリカオオアカイカ以外 (主にトビイカ)  
M : DNA Ladder マーカー 100bp (BEXEL)

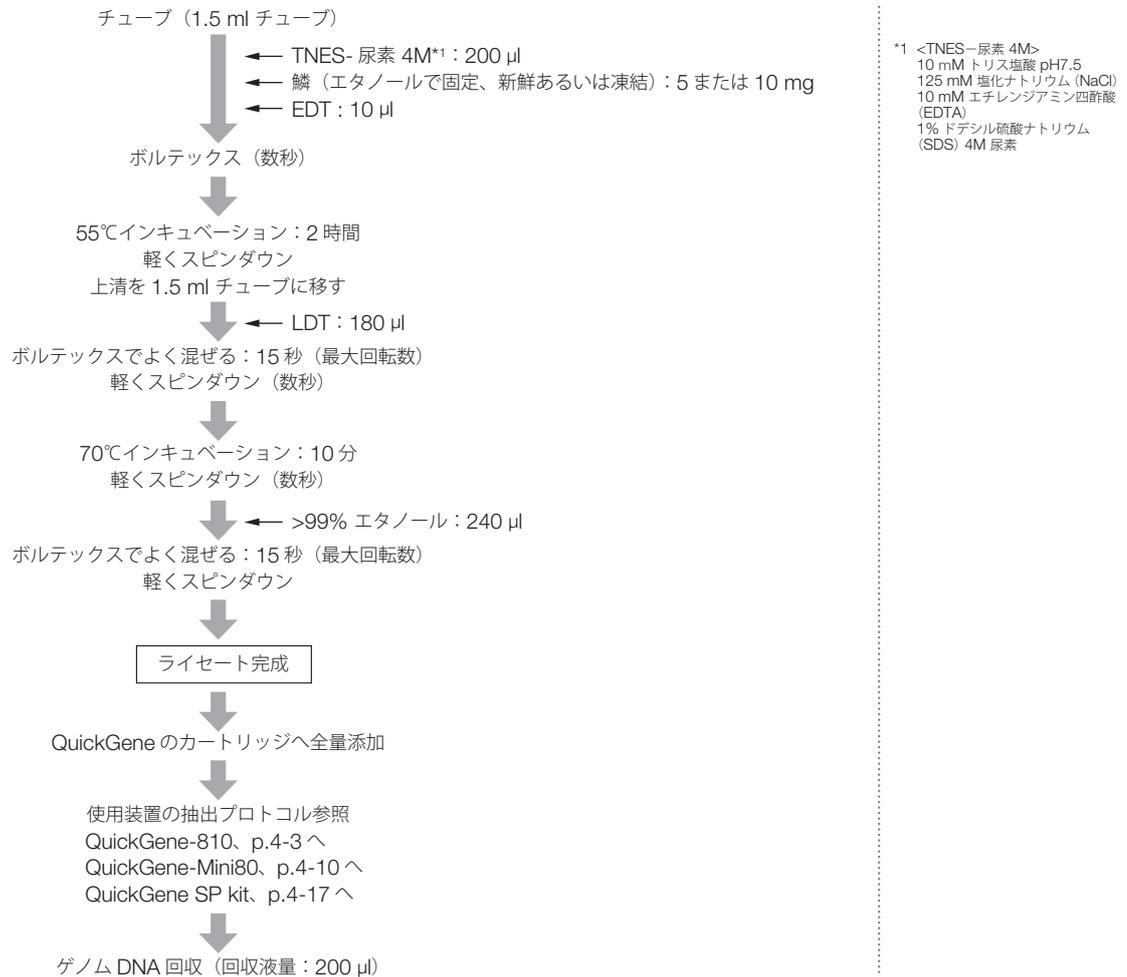
QuickGene システムを用いて、揺れる船上でも問題なく DNA を抽出することができた。また抽出した DNA を用い、COI 前半部で種特異的なプライマーを作製し PCR を行ったところ、アメリカオオアカイカとトビイカの稚仔を判別することができた。

■ 共通プロトコルサンプル

データなし

## 鱗からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



### 結果

- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし
- その他  
データなし

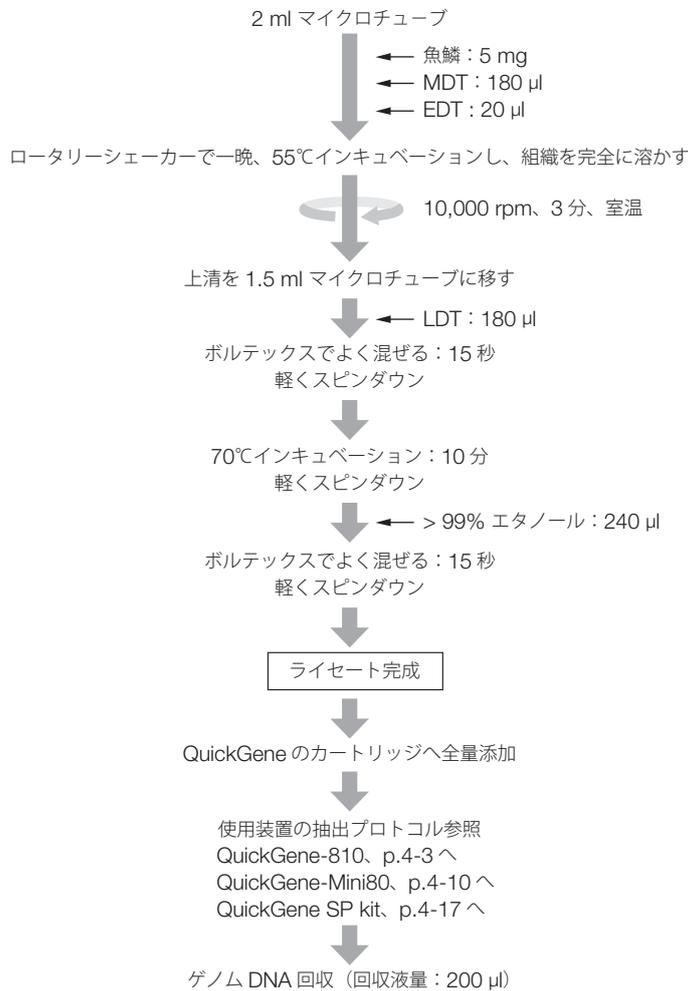
### 共通プロトコルサンプル

データなし

DD-8

魚鱗からのゲノム DNA 抽出

プロトコル



結果

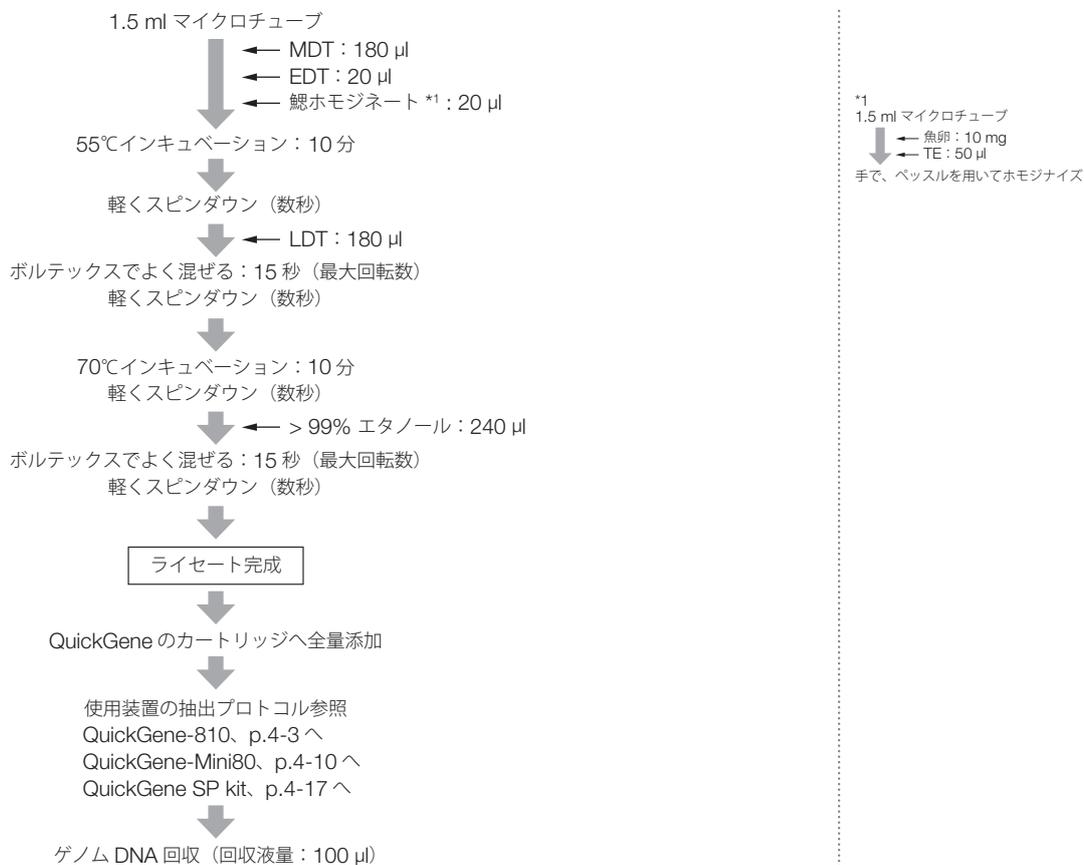
- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし
- その他
  - PCR  
PCS 成功

共通プロトコルサンプル

データなし

## 魚卵からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



### 結果

- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし
- その他  
データなし

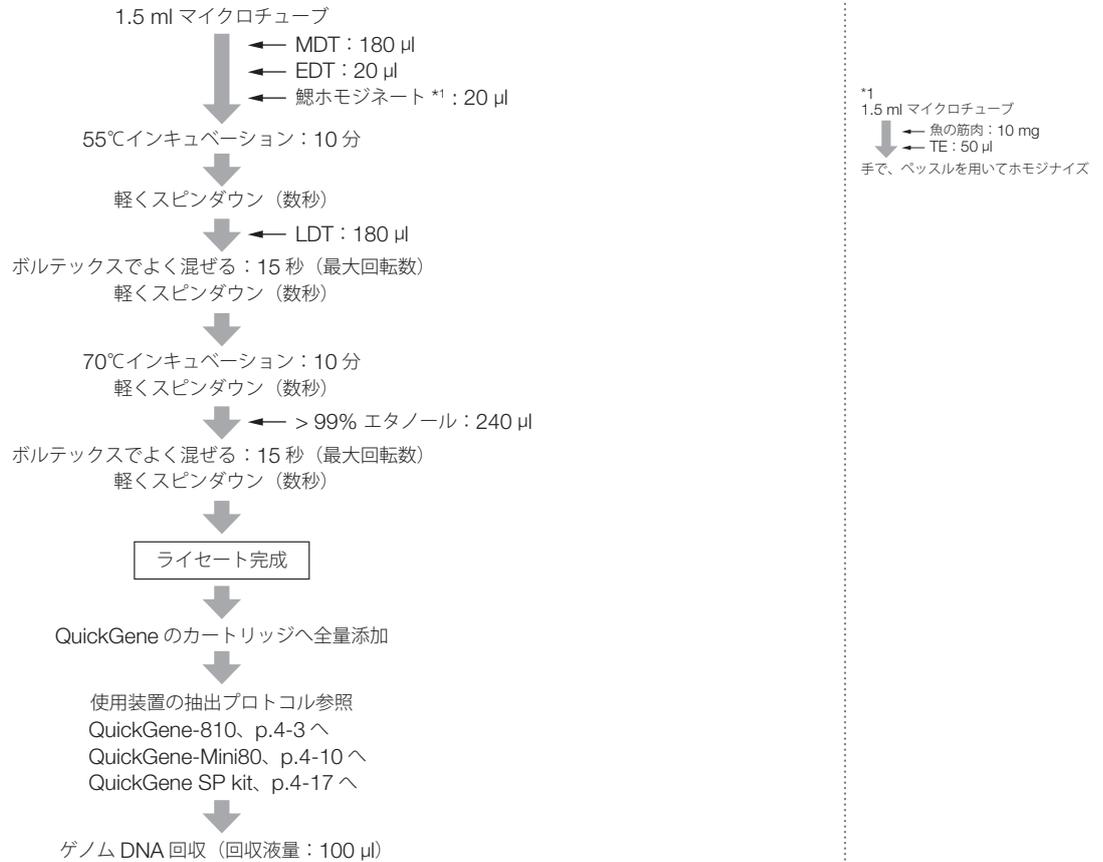
### 共通プロトコルサンプル

魚の筋肉

DD-10

魚の筋肉からのゲノム DNA 抽出

プロトコル



DD-10

結果

- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし
- その他  
データなし

共通プロトコルサンプル

魚卵



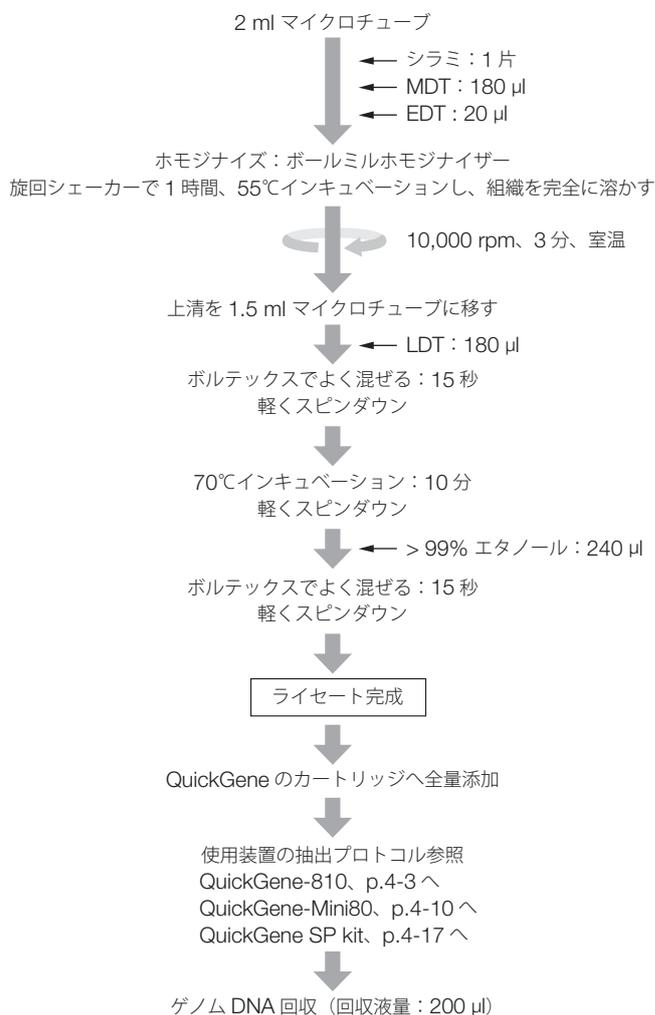
## 3-VI 章

### 昆虫からのゲノム DNA抽出

---

## シラミからのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ ゲノム DNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

データなし

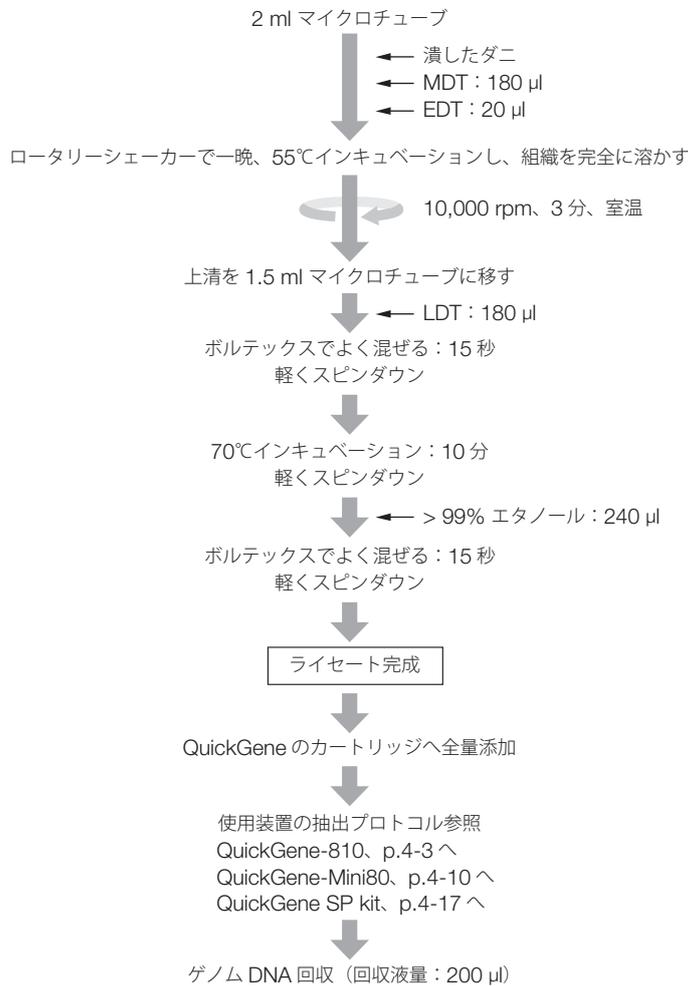
### 共通プロトコルサンプル

データなし

DE-2

ダニからのゲノム DNA 抽出

プロトコル



結果

- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし
- その他  
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし



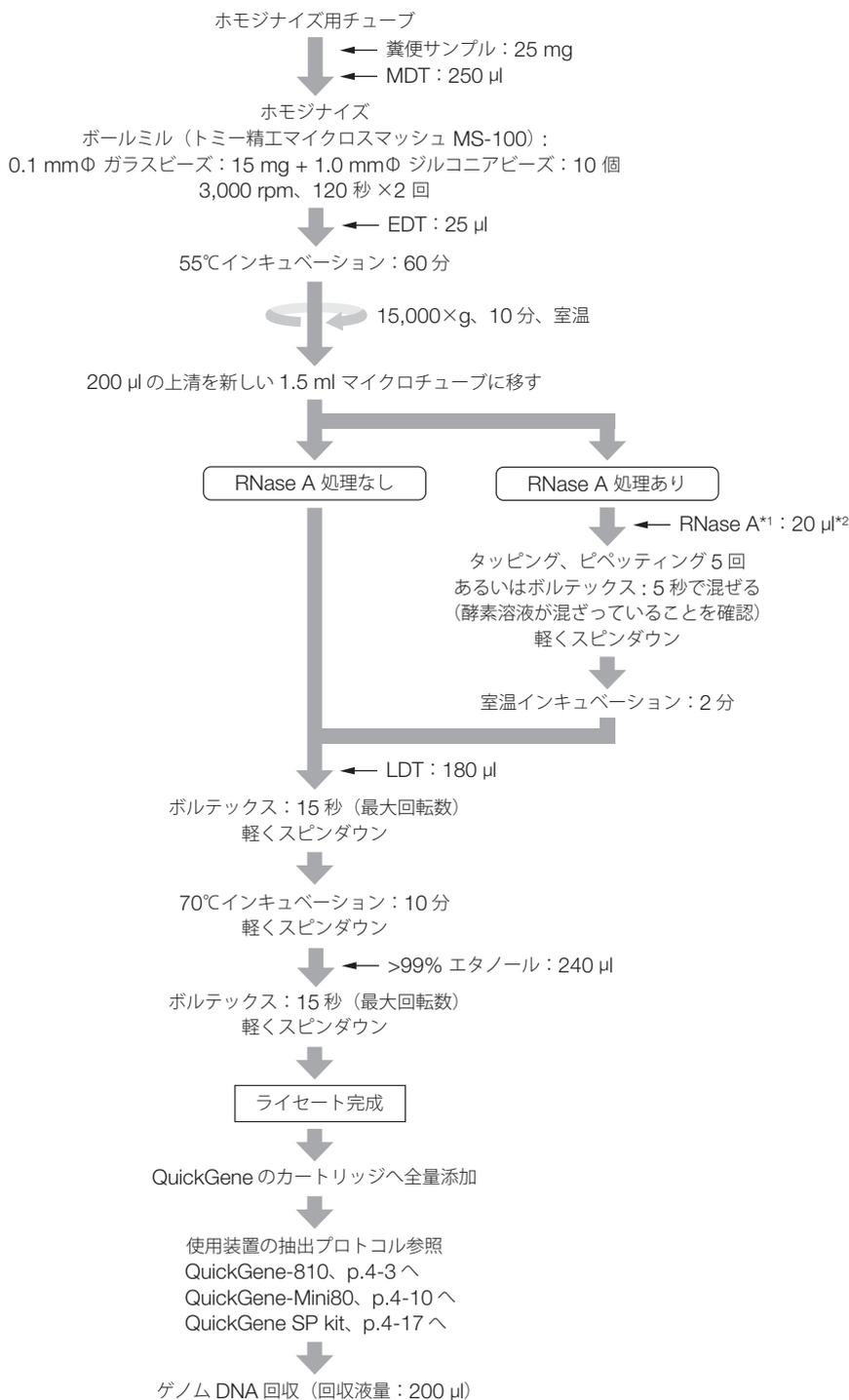
## 3-VII 章

### 細菌からのゲノム・プラスミド DNA抽出

---

# 糞便からの細菌ゲノム DNA 抽出

## プロトコル



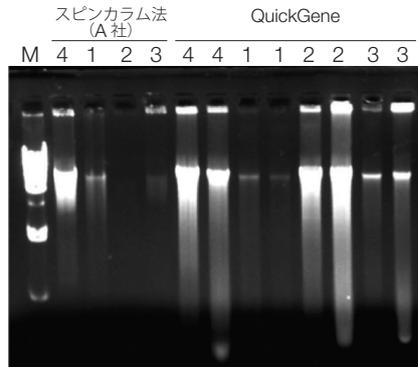
\*1 RNase A は、キットに含まれておりません。推奨 RNase (以下を参照) を御用意ください。

\*2 RNase A (invitrogen Cat. No.12091) の場合は 60 µl。

結果

糞便サンプル No.1：成人 1 No.2：成人 2  
No.3：乳児 1 No.4：ラット 1

電気泳動図



電気泳動条件：0.8% アガロース

M：λ-Hind III  
1：No.1 成人 1  
2：No.2 成人 2  
3：No.3 乳児 1  
4：No.4 ラット 1

(+)：RNase 処理あり、(-)：RNase 処理なし  
抽出したゲノム DNA に分解は認められなかった。

ゲノム DNA の収量

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4
QuickGene	8.4 μg	23.7 μg	15.8 μg	34.4 μg
スピнкаラム法 (A社)	2.3 μg	0.6 μg	N.D	6.7 μg

タンパク質の混入：A260/280

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4
QuickGene	2.14	1.92	2.08	2.13
スピнкаラム法 (A社)	2.08	1.36	N.D	1.70

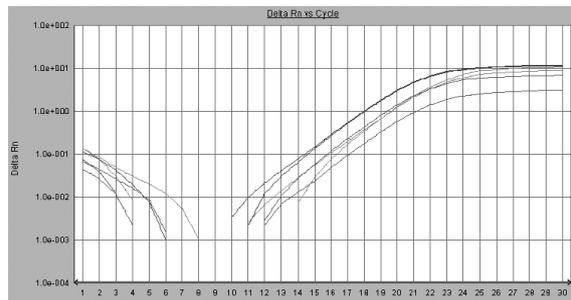
カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

その他

リアルタイム PCR

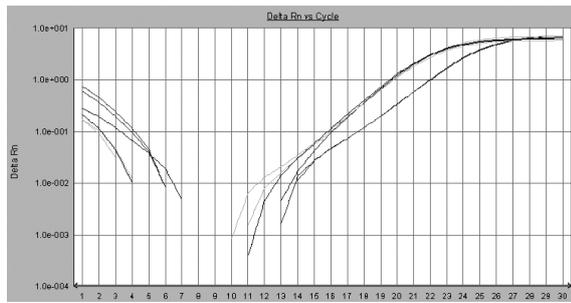
QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A社) を用いて糞便から抽出したゲノム DNA で、大腸菌群特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR を行った。  
テンプレートとして 1 μl の溶出液を使用した (総反応容量 10 μl：デュプリケート)。  
リアルタイム PCR には Applied Biosystem 7300 を使用した。



青：成人 1 (QuickGene-810、RNase 処理あり)  
緑：成人 1 (QuickGene-810、RNase 処理なし)  
橙：成人 1 (スピнкаラム法 (A社)、RNase 処理なし)



黄：成人 2 (QuickGene-810、DNase 処理あり)  
青：成人 2 (QuickGene-810、DNase 処理なし)  
緑：成人 2 (スピнкаラム法 (A社)、RNase 処理なし)



紺：乳児 1 (QuickGene-810、RNase 処理あり)  
 青：乳児 1 (QuickGene-810、RNase 処理なし)  
 茶：乳児 1 (スピカラム法 (A 社)、RNase 処理なし)



緑：ラット 1 (QuickGene-810、RNase 処理あり)  
 桃：ラット 1 (QuickGene-810、RNase 処理なし)  
 赤：ラット 1 (スピカラム法 (A 社)、RNase 処理なし)

いずれのゲノム DNA でも、リアルタイム PCR で発現解析を行うことができた。

その他、乳酸菌 (Lactobacillus) 属特異的プライマーや Clostridium coccoides-Eubacterium rectale グループ 特異的プライマーでも同様に発現解析を行うことができた。

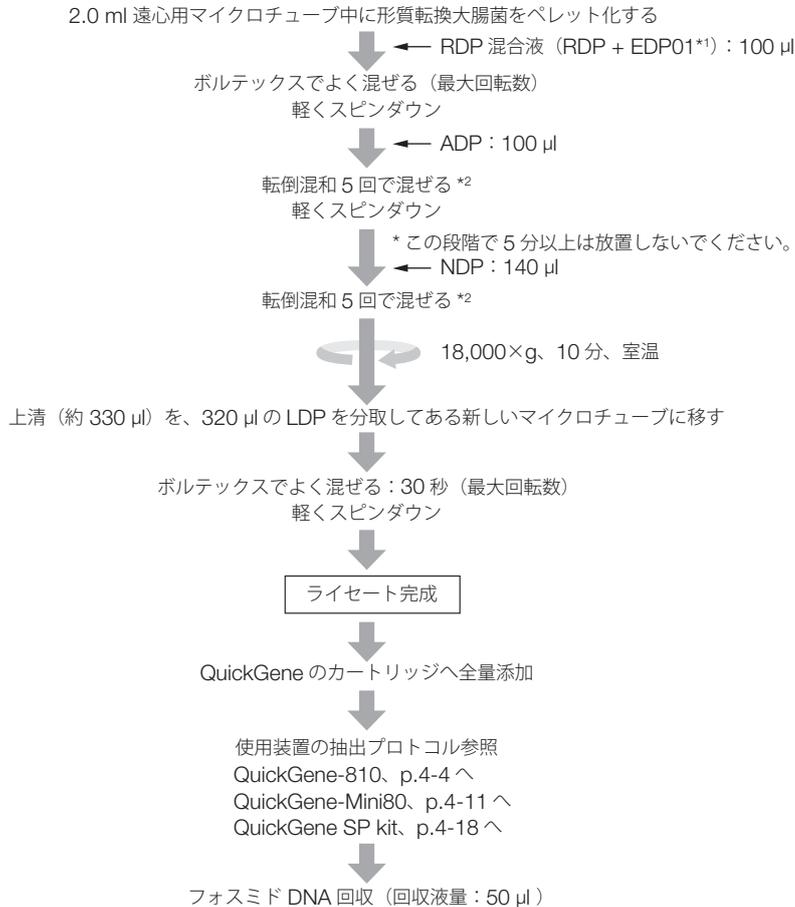
## 共通プロトコルサンプル

データなし

DF-2

大腸菌からの Fosmid DNA 抽出

プロトコル



\*1 EDP-01 全量を RDP ボトルに添加。

\*2 ADP または NDP 添加直後、チューブを転倒して混ぜてください。  
溶液は、チューブを穏やかに 5 回転倒することで混ぜなければなりません。溶液をボルテックスすると、染色体 DNA が抽出されます。もしチューブを振ると、多くのゲノム DNA がプラスミド DNA と共に抽出されます。しかし、この時の混和が不十分だと収量が減ります。

結果

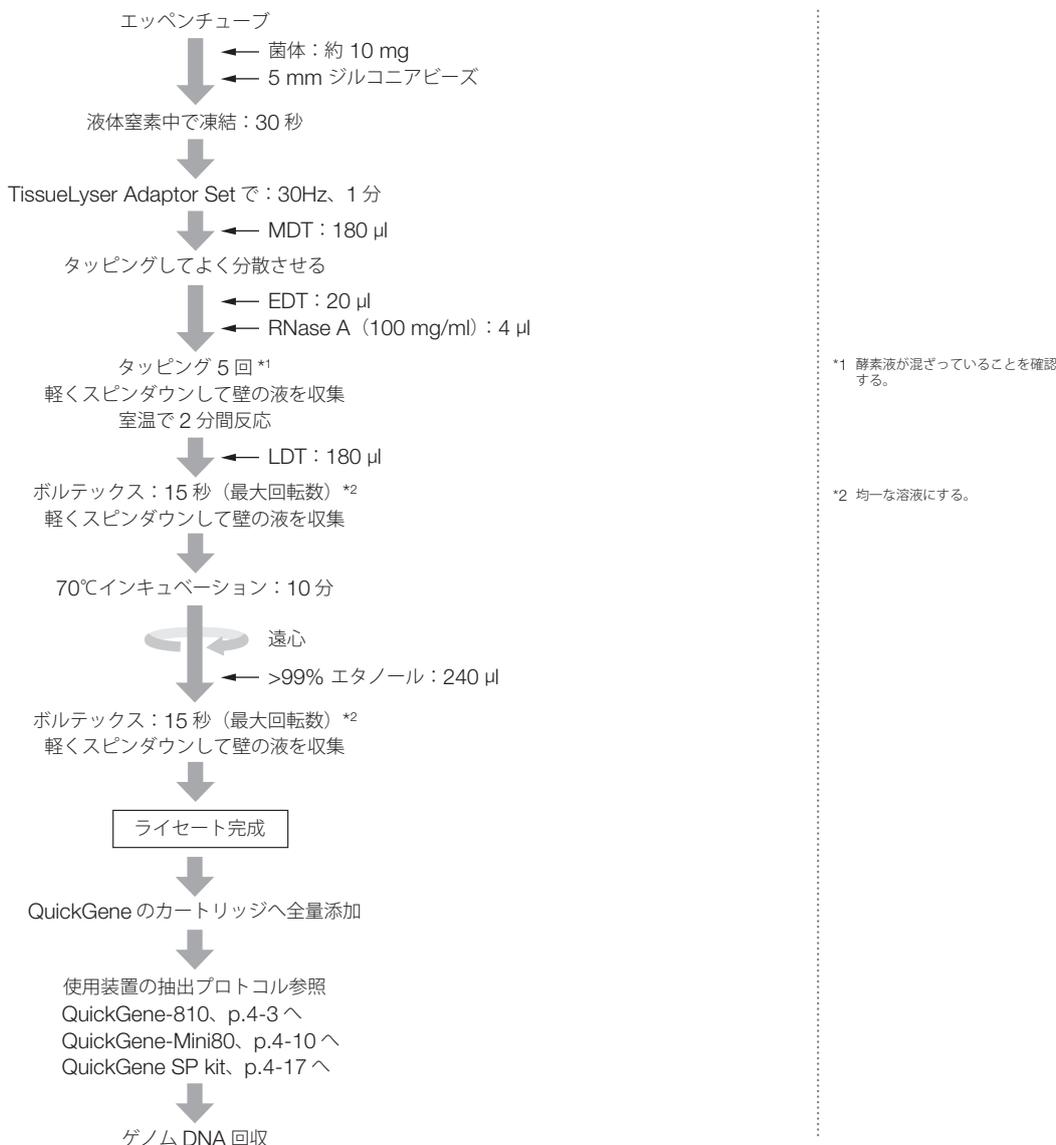
- 電気泳動図  
データなし
- フォスミド DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし
- その他  
データなし

共通プロトコルサンプル

プラスミド

## 放線菌からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ ゲノム DNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

データなし

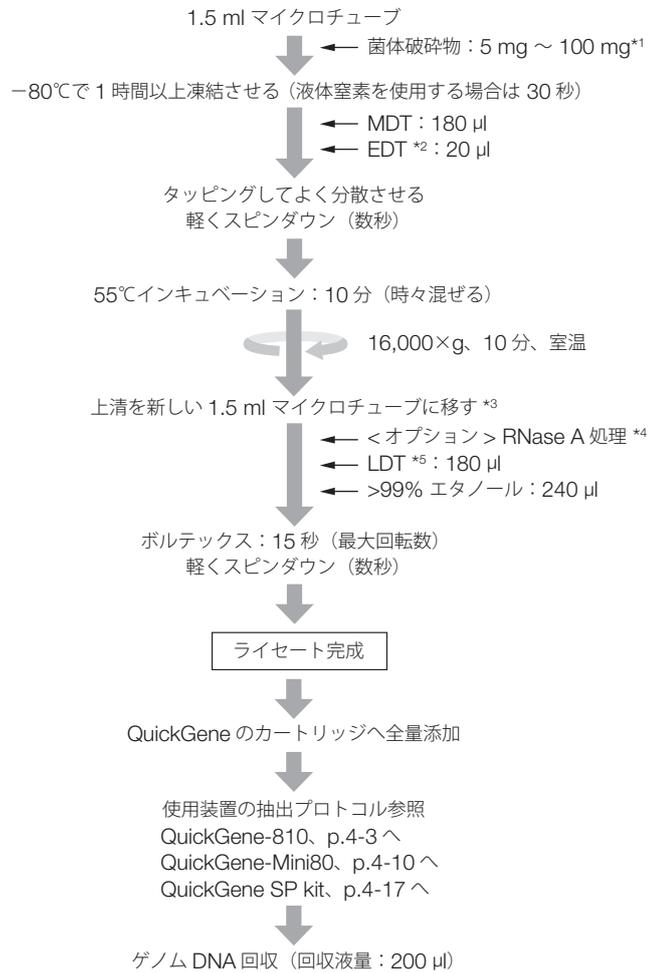
### 共通プロトコルサンプル

データなし

DF-4

糸状菌からのゲノム DNA 抽出

プロトコル



<sup>\*1</sup> 使用可能量は菌の種類などによっても異なります。本キットで初めて抽出されるサンプルの場合は、予備実験を行ってください。

<sup>\*2</sup> EDT の効果が無い場合は、省略できます。

<sup>\*3</sup> 残渣が落ちきらない場合は追加で遠心する。

<sup>\*4</sup> RNase A（100 mg/ml）：20 µl  
タッピング（酵素液が混ざっていることを確認する）  
軽くスピンドウン（数秒）

↓  
室温インキュベーション：2分

<sup>\*5</sup> LDT 添加後に沈殿が生じた場合は70°Cで数分間インキュベートし、沈殿を溶解してから特級エタノール（>99%）を添加してください。

結果

■ 電気泳動図

データなし

■ ゲノム DNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

データなし

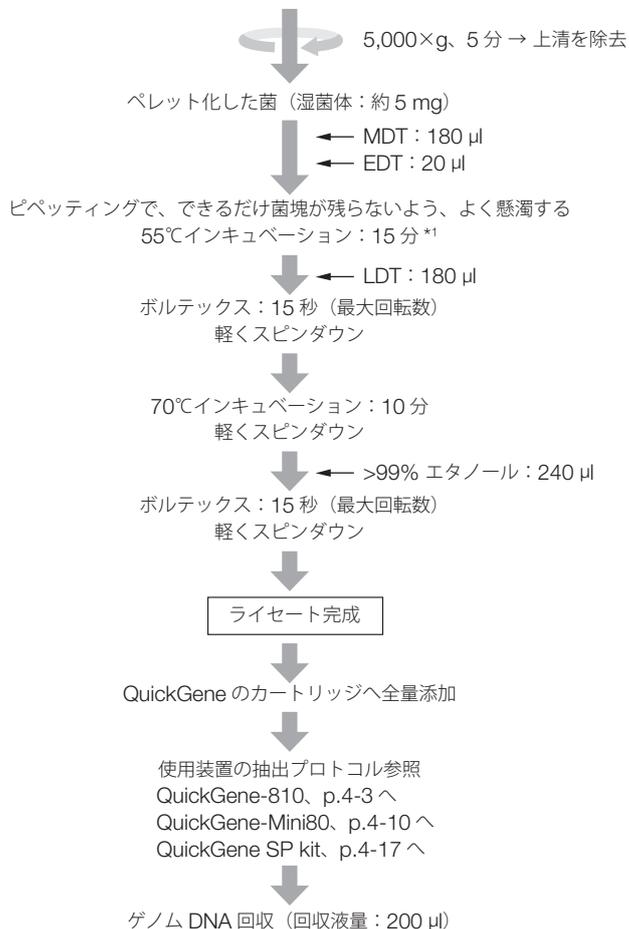
共通プロトコルサンプル

データなし

## 淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル

培養後の液体培地、もしくは寒天培地から釣菌した菌の懸濁液

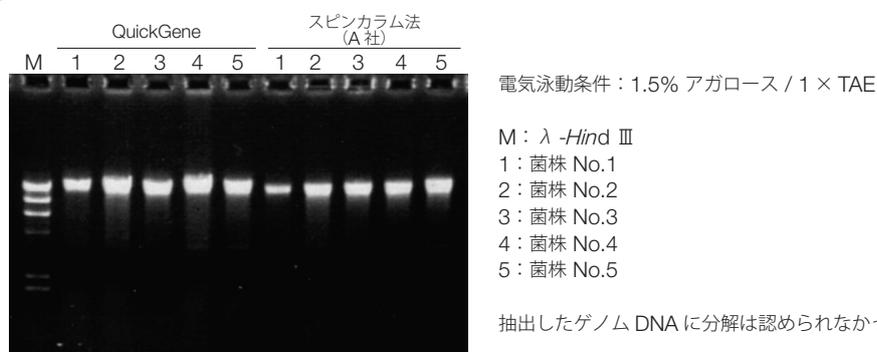


\*1 この時菌塊が残っていれば、ピペティングで菌塊を壊し、再度インキュベートする。

### 結果

菌株：臨床分離株 No.1 ~ 5  
各湿菌体 約 4.5 ~ 6 mg から抽出

#### 電気泳動図



### ■ ゲノム DNA の収量

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
QuickGene	8.5 µg	7.1 µg	11.2 µg	11.0 µg	7.3 µg
スピнкаラム法 (A社)	3.2 µg	6.6 µg	5.8 µg	6.5 µg	4.6 µg

### ■ タンパク質の混入：A260/280

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
QuickGene	1.97	2.06	2.39	2.03	2.04
スピнкаラム法 (A社)	2.11	2.05	2.46	2.00	2.05

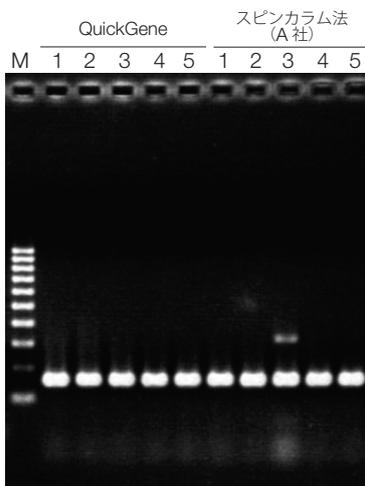
### ■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

### ■ その他

#### ● PCR

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A社) を用いて抽出したゲノム DNA で、フルオロキノロン系抗菌薬のターゲットであるトポイソメラーゼIVのサブユニットの ParC 遺伝子の検出を、PCR により行った。



電気泳動条件：2% アガロース / 1 × TAE

M：100 bp DNA Ladder

1：菌株 No.1

2：菌株 No.2

3：菌株 No.3

4：菌株 No.4

5：菌株 No.5

いずれのゲノム DNA からでも PCR 産物を検出できた。

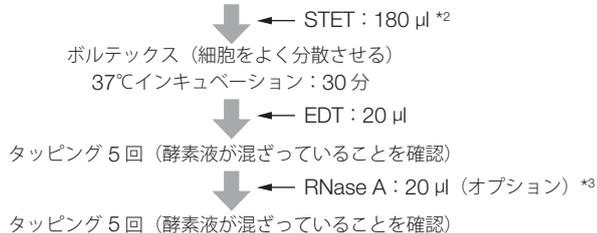
## ■ 共通プロトコルサンプル

ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)

## 枯草菌からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル

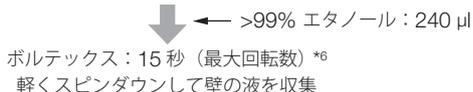
枯草菌を集菌しペレットを作る (5,000 g×10分)：枯草菌ペレット \*1



軽くスピンドウンして壁の液を収集  
25°Cインキュベーション : 2分



70°Cインキュベーション : 10分 \*5  
軽くスピンドウンして壁の液を収集



ライセート完成

QuickGene のカートリッジへ全量添加

使用装置の抽出プロトコル参照  
QuickGene-810、p.4-3 へ  
QuickGene-Mini80、p.4-10 へ  
QuickGene SP kit、p.4-17 へ

ゲノム DNA 回収

\*1 1×10<sup>9</sup>個以下(OD:0.8, 1.2 ml)。

\*2 STET:20mM トリス塩酸 (pH8)、  
2 mM EDTA (pH8)、1.2%  
Triton×100, 20 mg/ml  
リソチームは使用前に添加する。

\*3 細胞で発現している RNA 量により減量可能。

\*4 均一な溶液にする。  
(必要に応じてピペッティングする)

\*5 必要に応じて病原体不活化 (煮沸) 処理を加える。

\*6 均一な溶液にする。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### ゲノム DNA の収量

データなし

#### タンパク質の混入：A260/280

データなし

#### カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

#### その他

データなし

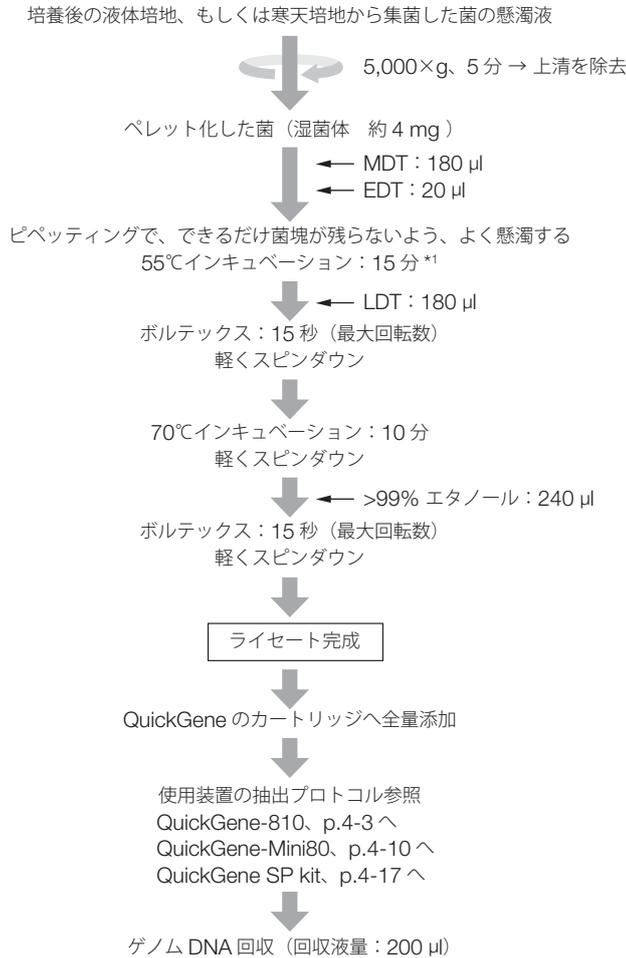
### 共通プロトコルサンプル

データなし

DF-7

ピロリ菌からのゲノム DNA 抽出

■ プロトコル



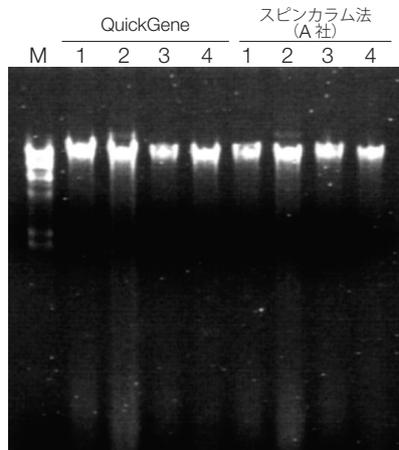
\*1 この時菌塊が残ってれば、ピペティングで菌塊を壊し、再度インキュベートする。

DF-7

■ 結果

菌株 : 各湿菌体 約 4 mg から抽出された臨床分離株 No. 1 ~ 4

■ 電気泳動図



電気泳動条件 : 1.5% アガロース / 1 × TAE

- M : λ -Hind III
- 1 : 菌株 No.1
- 2 : 菌株 No.2
- 3 : 菌株 No.3
- 4 : 菌株 No.4

抽出したゲノム DNA に分解は認められなかった。

### ■ ゲノム DNA の収量

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4
QuickGene	3.0 µg	4.2 µg	2.0 µg	3.2 µg
スピнкаラム法 (A 社)	2.9 µg	4.7 µg	1.0 µg	2.9 µg

### ■ タンパク質の混入：A260/280

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4
QuickGene	2.01	1.91	1.88	1.93
スピнкаラム法 (A 社)	1.92	1.88	1.78	1.82

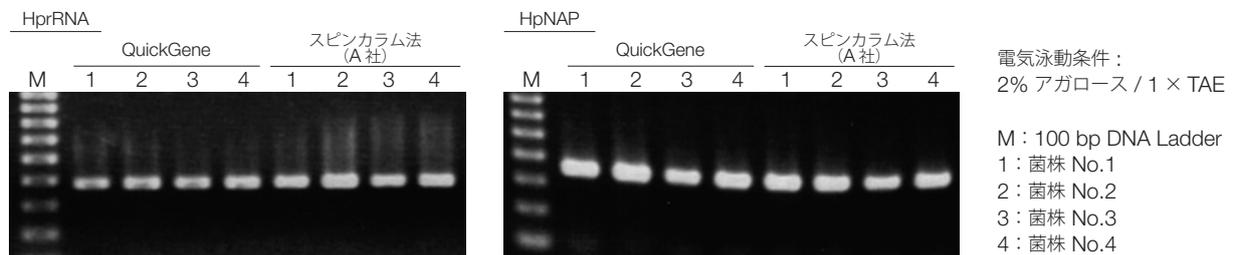
### ■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

### ■ その他

#### ● PCR

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて抽出したゲノム DNA で、ピロリ菌の 16s ribosomal RNA (A) 遺伝子および neutrophil-activating protein (NAP) (B) 遺伝子の検出を、PCR により行った。



いずれのゲノム DNA でも、PCR 産物を検出できた。

## ■ 共通プロトコルサンプル

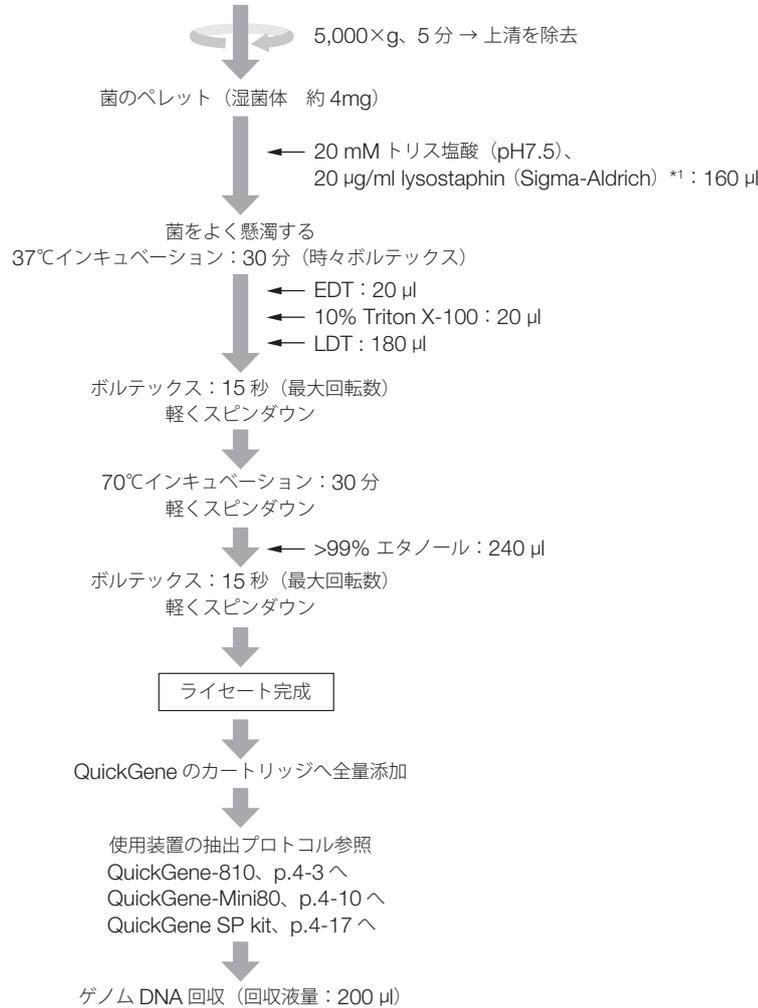
淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)

DF-8

# メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) からのゲノム DNA 抽出

## プロトコル

培養後の液体培地、もしくは寒天培地から釣菌した菌の懸濁液



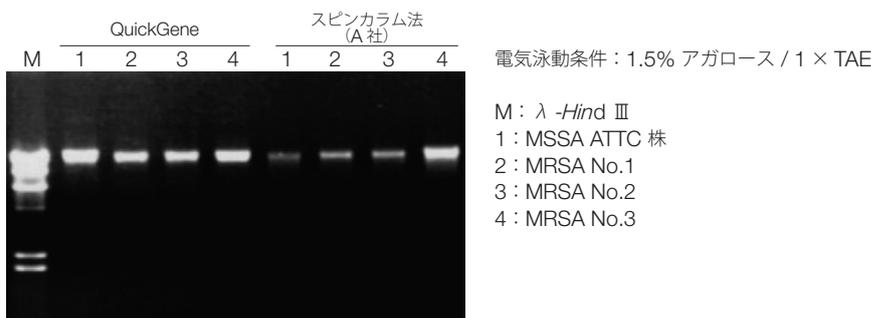
\*1 "20 mM トリス塩酸 (pH7.5)、  
20 µg/ml lysostaphin (Sigma-Aldrich)" はキットに含まれておりません。  
lysostaphin は使用前に添加してください。

DF-8

## 結果

菌株 : メチシリン感受性菌 (MSSA) 標準株 (ATCC25923)  
菌株 : メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 臨床分離株 No.1 ~ 3  
各湿菌体 約 4mg から抽出

### 電気泳動図



### ■ ゲノム DNA の収量

サンプル	MSSA	MRSA No.1	MRSA No.2	MRSA No.3
QuickGene	16.0 µg	14.4 µg	10.2 µg	10.3 µg
スピнкаラム法 (A 社)	2.7 µg	4.6 µg	9.1 µg	12.5 µg

### ■ タンパク質の混入：A260/280

サンプル	MSSA	MRSA No.1	MRSA No.2	MRSA No.3
QuickGene	1.76	1.70	1.70	1.76
スピнкаラム法 (A 社)	1.80	1.76	1.73	1.95

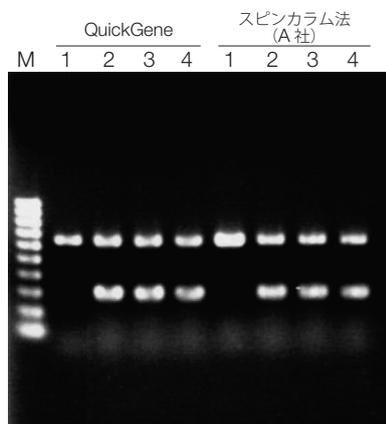
### ■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

### ■ その他

#### ● PCR

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて抽出したゲノム DNA で、黄色ブドウ球菌遺伝子の *FemA* と MRSA に見られる *mecA* 遺伝子の検出を PCR 法 [Jonas, D. et al. 「Rapid PCR based Identification of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus from Screening Swabs.」 J. Clin. Microbiol. 2002 ; 40, 1821-1823.] により行った。



電気泳動条件：2% アガロース / 1 × TAE

M : 100 bp DNA Ladder  
 1 : MSSA ATC 株  
 2 : MRSA No.1  
 3 : MRSA No.2  
 4 : MRSA No.3

MSSA (ATCC 標準株) では *femB* のみが、MRSA では *femB* と *mecA* の両方が検出された。

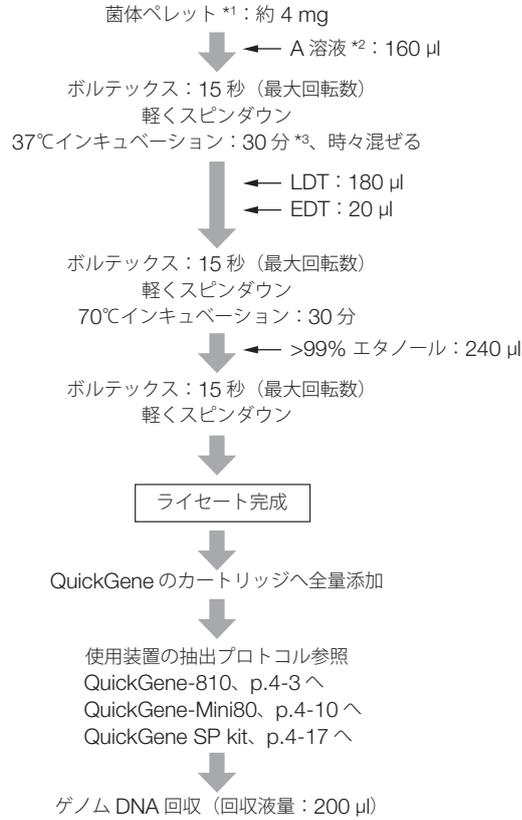
### ■ 共通プロトコルサンプル

データなし

DF-9

# ペニシリン耐性肺炎球菌 (*Streptococcus Pneumoniae*, PRSP) から のゲノム DNA 抽出

## プロトコル



\*1 集菌遠心条件 (5,000×g、5 分)

\*2 A 溶液: 20 mM トリス塩酸 (pH 7.5)  
2 mM EDTA  
1.2% Triton X-100  
20 mg/ml リゾチーム

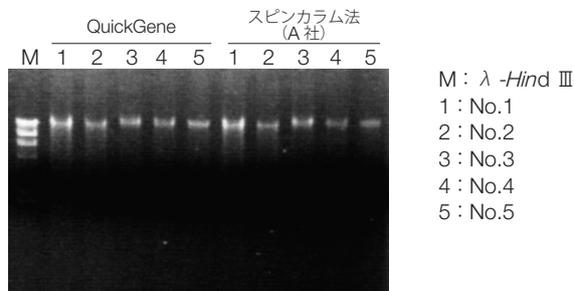
\* リゾチームは要事調整で加える

\*3 溶液が乳白色に濁る、もしくは沈殿物が生じることがありますが次のステップで溶解します。

## 結果

- 菌株 No.1: R6 (肺炎球菌標準株)  
No.2: PISP 臨床分離株 (ペニシリン中程度耐性肺炎球菌)  
No.3: PISP 臨床分離株 (ペニシリン中程度耐性肺炎球菌)  
No.4: PRSP 臨床分離株 (ペニシリン高度耐性肺炎球菌)  
No.5: PRSP 臨床分離株 (ペニシリン高度耐性肺炎球菌)

### 電気泳動図



### ゲノム DNA の収量

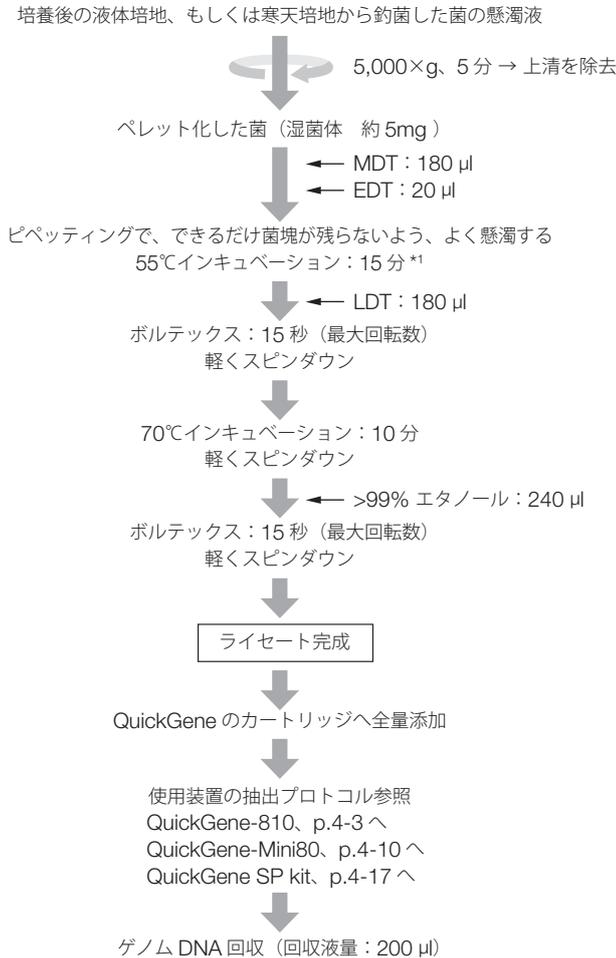
サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
QuickGene	12.6 µg	4.8 µg	8.6 µg	9.1 µg	8.3 µg
スピнкаラム法 (A社)	10.6 µg	5.8 µg	10.0 µg	8.0 µg	5.4 µg



DF-10

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) からのゲノム DNA 抽出

■ プロトコル



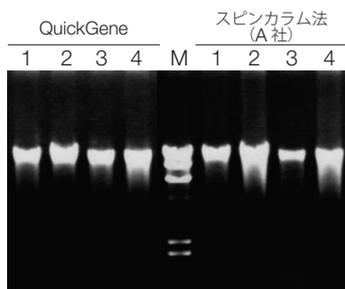
\*1 この時菌塊が残ってれば、ピペティングで菌塊を壊し、再度インキュベートする。

DF-10

■ 結果

- 菌株 No.1 : S792 (血清型 G)
- 菌株 No.2 : S728 (血清型 G、ムコイド株)
- No.3 : S715 (血清型 E)
- No.4 : S1067 (ラフ株)

■ 電気泳動図



電気泳動条件 : 1.5% アガロース / 1 × TAE

- M : λ -Hind III
- 1 : No.1 S792 (血清型 G)
- 2 : No.2 S728 (血清型 G、ムコイド株)
- 3 : No.3 S715 (血清型 E)
- 4 : No.4 S1067 (ラフ株)

抽出したゲノム DNA に分解は認められなかった。

### ■ ゲノム DNA の収量

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4
QuickGene	11.4 µg	12.4 µg	10.0 µg	14.0 µg
スピнкаラム法 (A 社)	10.8 µg	14.0 µg	7.4 µg	13.0 µg

### ■ タンパク質の混入：A260/280

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4
QuickGene	2.23	1.90	2.31	2.18
スピнкаラム法 (A 社)	1.96	1.78	1.93	2.12

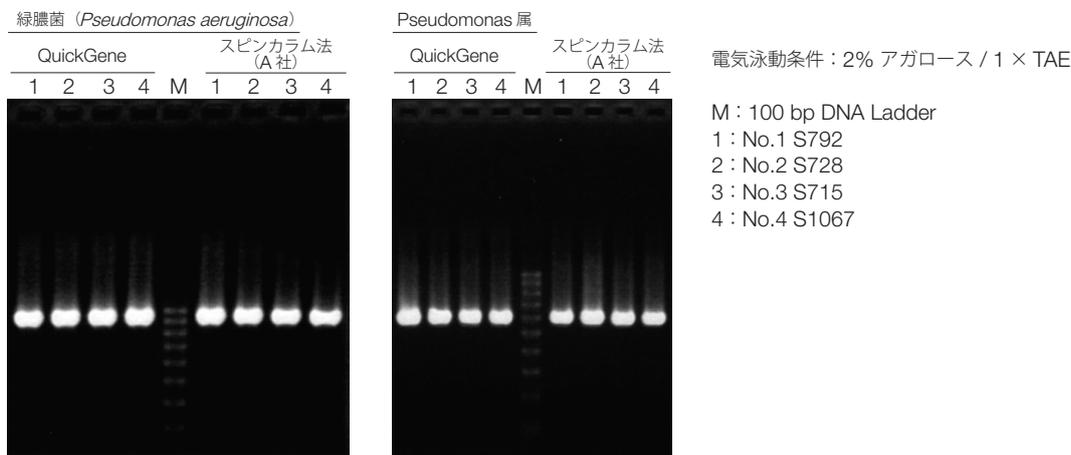
### ■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

### ■ その他

#### ● PCR

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて緑膿菌菌体から抽出したゲノム DNA で、16srRNA 遺伝子の検出を、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) に特異的なプライマーおよび *Pseudomonas* 属特異的なプライマーを使用した PCR により行った。



いずれのゲノム DNA でも PCR 産物を検出できた。

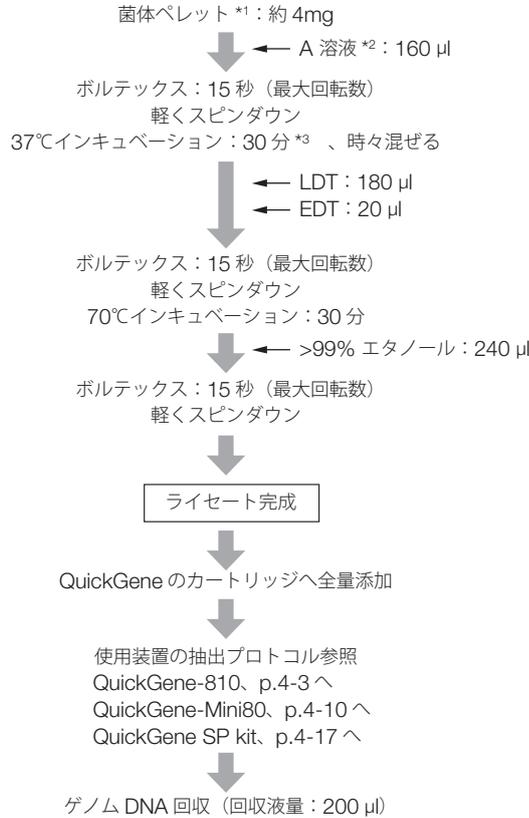
### ■ 共通プロトコルサンプル

淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、ピロリ菌

DF-11

# バンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin-resistant *Enterococcus*; VRE) からのゲノム DNA 抽出

## プロトコル



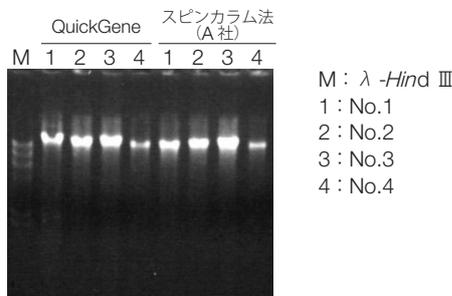
- \*1 集菌遠心条件 (5,000×g、5 分)
- \*2 A 溶液 : 20 mM トリス塩酸 (pH 7.5)  
2 mM EDTA  
1.2% Triton X-100  
20 mg/ml リゾチーム  
\* リゾチームは要事調整で加える
- \*3 溶液が乳白色に濁る、もしくは沈殿物が生じることがありますが次のステップで溶解します。

DF-11

## 結果

- 菌株 No.1 : バンコマイシン感受性 *E.faecium* (バンコマイシン感受性腸球菌臨床分離株)
- No.2 : バンコマイシン感受性 *E.faecalis* (バンコマイシン感受性腸球菌臨床分離株)
- No.3 : バンコマイシン耐性 *E.faecalis* (バンコマイシン耐性腸球菌臨床分離株)
- No.4 : バンコマイシン耐性 *E.faecalis* (バンコマイシン耐性腸球菌臨床分離株)

### 電気泳動図



### ゲノム DNA の収量

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4
QuickGene	11.1 µg	7.4 µg	9.6 µg	3.0 µg
スピнкаラム法 (A社)	4.2 µg	7.0 µg	11.1 µg	1.8 µg

■ タンパク質の混入：A260/280

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4
QuickGene	2.03	1.75	1.94	1.78
スピнкаラム法 (A社)	1.73	1.70	1.96	1.70

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

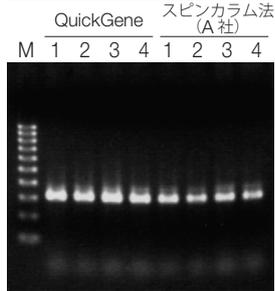
データなし

■ その他

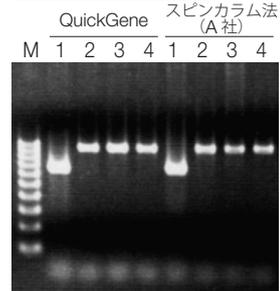
● PCR

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A社) を用いて腸球菌から抽出したゲノム DNA で、*Enterococcus 16S rRNA*、*E.faecium*\*<sup>4</sup>、*E.faecalis*\*<sup>5</sup>、薬剤耐性遺伝子 (*vanA*\*<sup>6</sup>、*vanB*\*<sup>7</sup>) を PCR で検出した。

*Enterococcus 16S rRNA*



*E. faecium, E. faecalis*



電気泳動条件：2% アガロース / 1 × TAE

M：100 bp DNA Ladder

- 1：No.1 バンコマイシン感受性 *E. faecium*  
(バンコマイシン感受性腸球菌臨床分離株)
- 2：No.2 バンコマイシン感受性 *E. faecalis*  
(バンコマイシン感受性腸球菌臨床分離株)
- 3：No.3 バンコマイシン耐性 *E. faecalis*  
(バンコマイシン耐性腸球菌臨床分離株)
- 4：No.4 バンコマイシン耐性 *E. faecalis*  
(バンコマイシン耐性腸球菌臨床分離株)

*vanA, vanB*



- No.1 バンコマイシン感受性 *E. faecium* は *vanA*、*vanB* 陰性の *E. faecium* と同定された。
- No.2 バンコマイシン感受性 *E. faecalis* は *vanA*、*vanB* 陰性の *E. faecalis* と同定された。
- No.3、4 バンコマイシン感受性 *E. faecalis* は *vanA* 陰性、*vanB* 陽性の *E. faecalis* と同定された。

いずれのプライマーを用いた場合も良好な結果が得られ、生化学的な検討と一致する結果であった。

- \*4：*E. faecium* 特異的プライマー (658 bp)
- \*6：薬剤耐性遺伝子 *vanA* (732 bp)

- \*5：*E. faecalis* 特異的プライマー (941 bp)
- \*7：薬剤耐性遺伝子 *vanB* (635 bp)

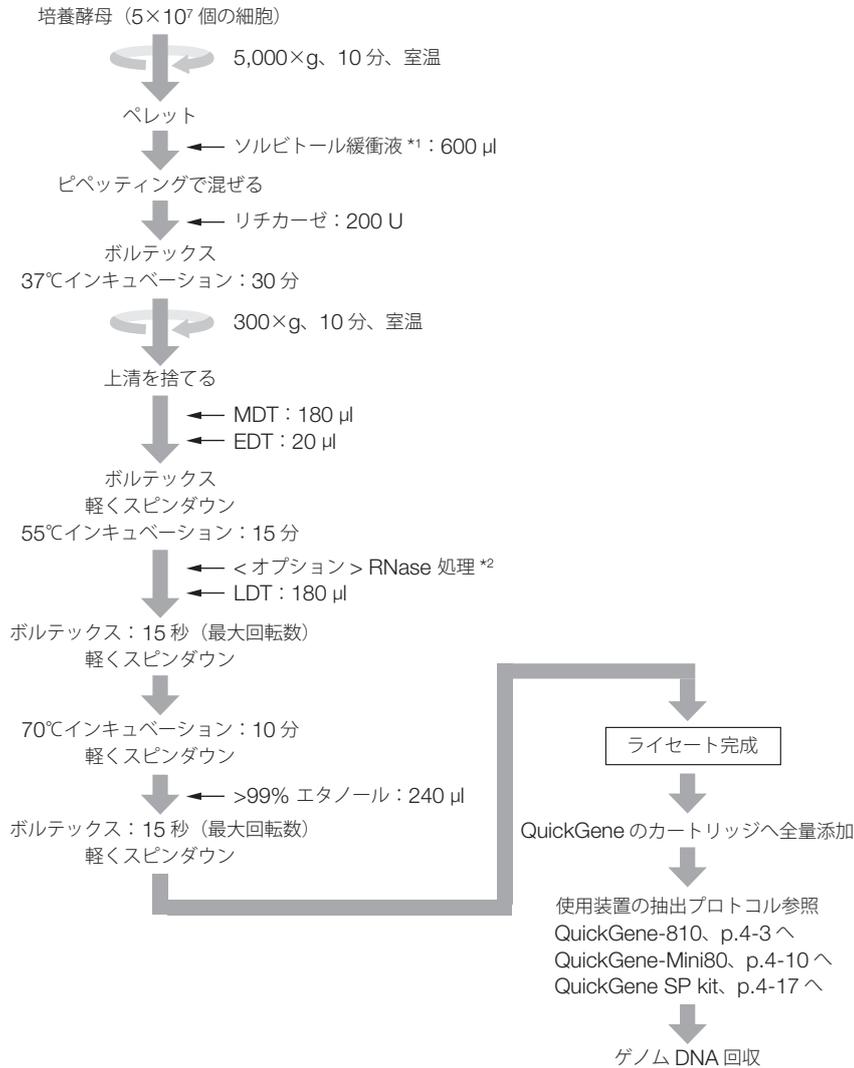
■ 共通プロトコルサンプル

ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP)

DF-12

酵母からのゲノム DNA 抽出

プロトコル



\*1  
<ソルビトール緩衝液>  
1M ソルビトール  
100mM EDTA  
0.1% β-メルカプトエタノール

\*2  
(オプションプロセス)  
RNase A : 20 µl  
タッピング 5回で混ぜる

↓  
軽くスピンドウン  
25°Cインキュベーション : 2分

DF-12

結果

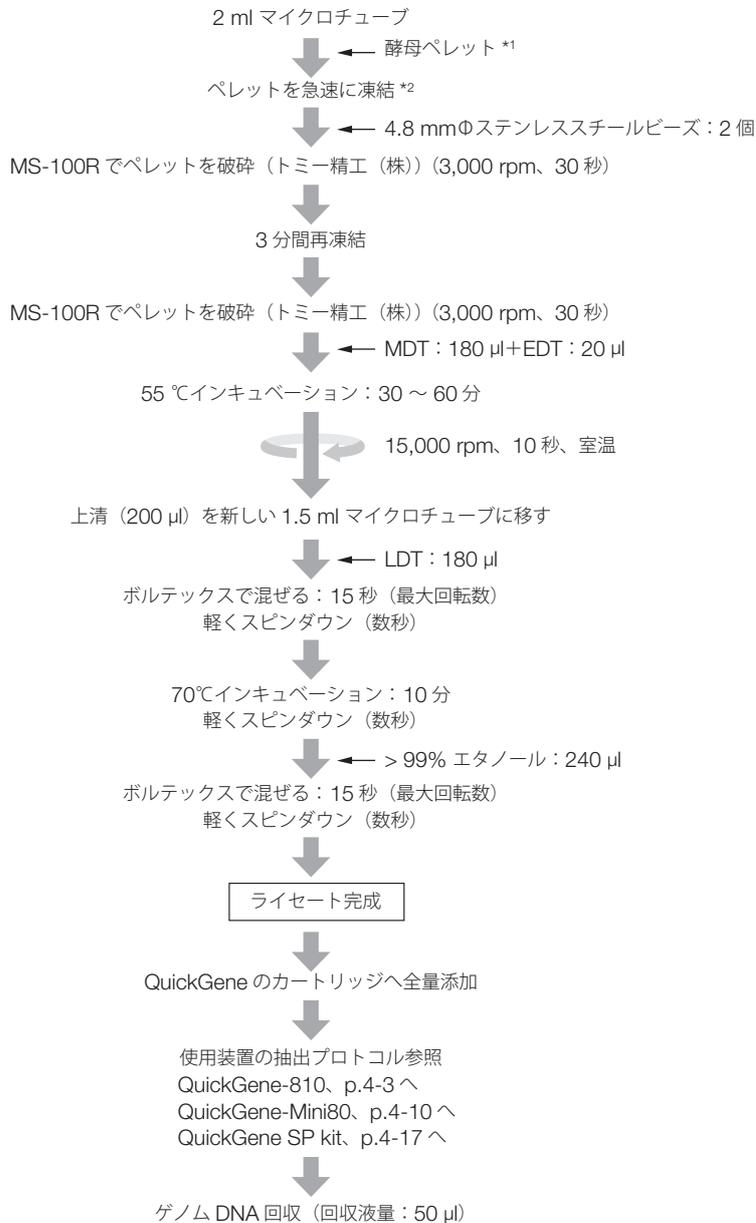
- 電気泳動図  
データなし
- ゲノム DNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし
- その他  
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

## 酵母からのゲノム DNA 抽出（ビーズホモジナイズ法）

### プロトコル

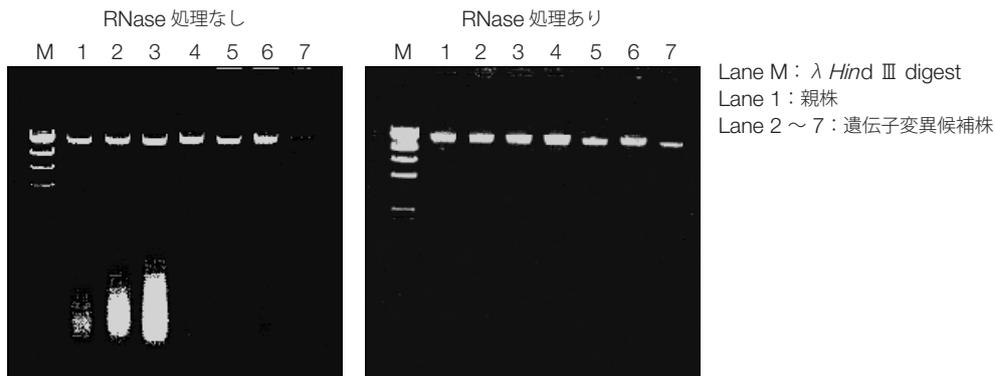


\*1 30℃で16時間、5 ml YPAD 中で培地を振とう後、全酵母細胞を遠心で集菌する [OD600=app.3]。

\*2 チューブを、10 分以上ドライアイス-エタノールに浸す。

結果

電気泳動図



ゲノム DNA の収量 (RNase 処理なし)

	収量 (μg)
1	79.4
2	111.1
3	127.8
4	35.0
5	30.2
6	53.3
7	10.7

タンパク質の混入: A260/280

	純度 (A260/280)
1	2.12
2	2.13
3	2.12
4	2.01
5	1.85
6	1.99
7	1.67

カオトロピック塩の混入: A260/230

データなし

その他

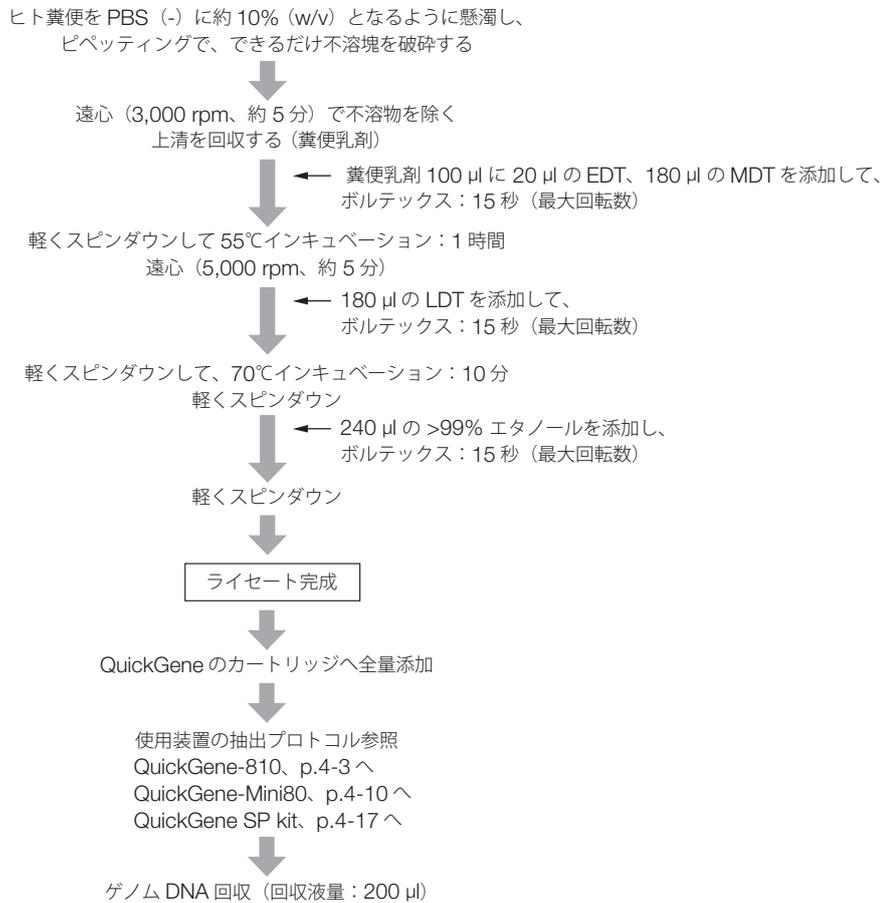
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

## ヒト糞便からのピロリ菌ゲノム DNA 抽出

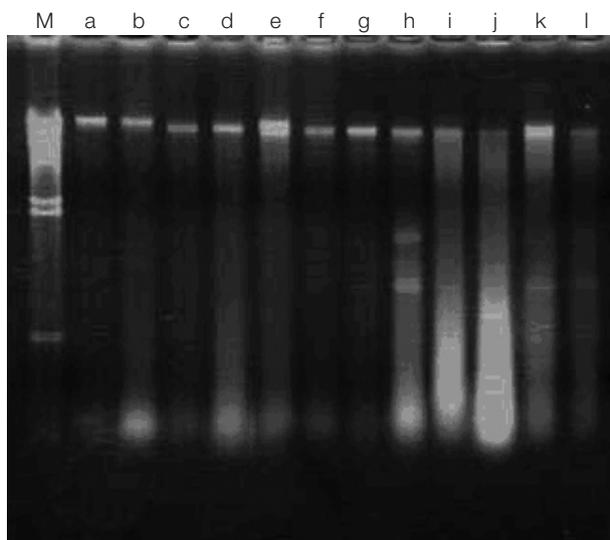
### プロトコル



### 結果

#### 電気泳動図

ヒト糞便由来 DNA のアガロース電気泳動図 (1.5% アガロースゲル)



M : marker ( $\lambda$ -Hind III)  
a, g : No.1 (糞便、ピロリ陽性)  
b, h : No.2 (糞便、ピロリ陽性)  
c, i : No.3 (糞便、ピロリ陽性)  
d, j : No.4 (糞便、ピロリ陽性)  
e, k : No.5 (糞便、ピロリ陰性)  
f, l : No.6 (糞便、ピロリ陰性)

a, f : QuickGene  
g, l : A 社

## ■ ゲノム DNA の収量

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
QuickGene	0.48	1.92	0.40	1.48	3.28	1.32
A社 スピнкаラム法	2.48	0.76	1.36	4.8	5.68	0.48

QuickGene システムの方が収量の低い検体が認められたが、アガロース電気泳動像から、A社キットで精製した標品の方で、分解によると思われる低分子量の物質が多く認められた。紫外線吸収による算出では、低分子量の物質を含めた値となっており、収量が高く出ていることが考えられた。以上の結果から、QuickGene システムの方が、分解の少ないゲノム DNA が効率良く精製されていると考えられる。

## ■ タンパク質の混入：A260/280

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
QuickGene	1.73	2.10	1.74	1.90	2.03	1.96
A社 スピнкаラム法	1.83	1.76	1.72	1.70	1.65	1.73

## ■ カオトロピック塩の混入：A260/230

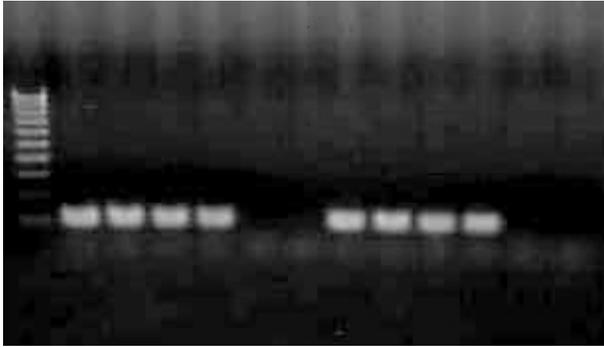
データなし

## ■ その他

### • PCR

ピロリ菌 16S rRNA をコードするゲノム DNA の nested PCR による検出

M a b c d e f g h i j k l



M : マーカー (100 bp ladder)

a, g : No.1 (糞便、ピロリ陽性)

b, h : No.2 (糞便、ピロリ陽性)

c, i : No.3 (糞便、ピロリ陽性)

d, j : No.4 (糞便、ピロリ陽性)

e, k : No.5 (糞便、ピロリ陰性)

f, l : No.6 (糞便、ピロリ陰性)

a, f : QuickGene

g, l : A社

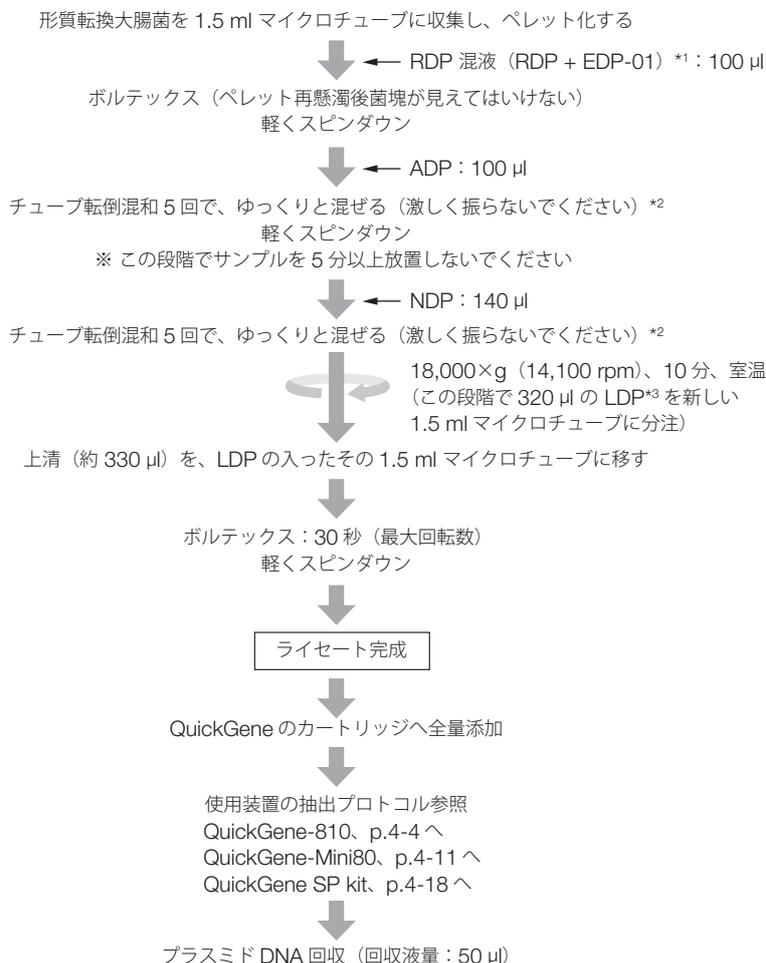
ヒト糞便から QuickGene で調製した DNA を用いて nested PCR にて、テストメイトラピッドピロリ抗原キットで陽性と判定された患者の糞便からピロリ菌の DNA を検出することができた。

## ■ 共通プロトコルサンプル

データなし

## 大腸菌からのプラスミド DNA 抽出

### プロトコル



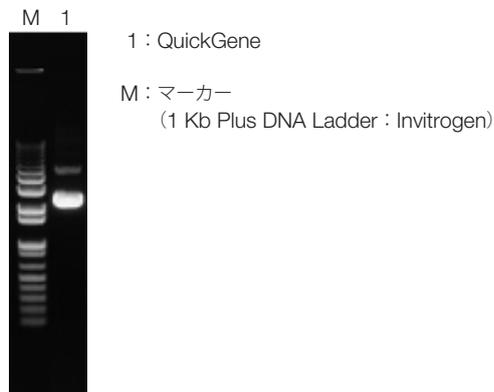
\*1 抽出を始める前に、EDP-01 の全量を PDP ボトルに添加し、よく混ぜてください。PDP 混液を貯蔵する場合は、冷蔵 (2~8 $^{\circ}$ C) 保存し、6 ヶ月以内に使用することを推奨します。

\*2 ADP または NDP 添加後直ぐにチューブを 5 回転倒混和で混ぜてください。激しい混合はゲノム DNA の多くの共精製を起こします。混合がゆっくりすぎると液体の不十分な混合が起こり、プラスミド DNA の収量低下を生じます。

\*3 使用前に 44 ml の >99% エタノールをボトルに添加し、ボトルの穏やかな転倒混和でよく混ぜてください。

### 結果

#### 電気泳動図



■ プラスミド DNA の収量

キット	収量
QuickGene	21.4 µg

■ タンパク質の混入：A260/280

キット	A260/280
QuickGene	1.99

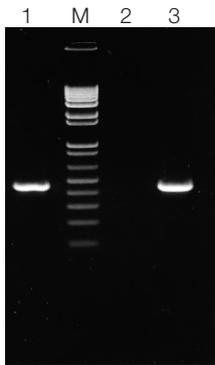
■ カオトロピック塩の混入：A260/230

キット	A260/230
QuickGene	2.49

■ その他

• PCR

*GAPDH* をターゲットに使用し、QuickGene システムで抽出した 5 ng のテンプレートに対して PCR を行った。



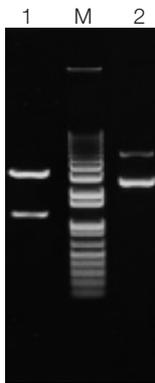
1 : QuickGene  
2 : ネガティブコントロール  
3 : ポジティブコントロール

M: マーカー (100 bp DNA Ladder : Invitrogen)

5 ng のテンプレートから PCR 増幅が可能である。

• *Not I* and *Xho I* での制限酵素切断

QuickGene システムを用いて形質転換大腸菌から抽出したプラスミド DNA に対して制限酵素処理を行った。制限エンドヌクレアーゼ (*Not I* および *Xho I* のそれぞれに 0.5 µl) を 10 µl の反応溶液 (1 µl の抽出プラスミドを含む) に添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。



1 : QuickGene (*Not I* + *Xho I*)  
2 : None

M : マーカー (1 Kb Plus DNA Ladder : Invitrogen)

これらの結果から、制限酵素処理が行えることがわかる。

■ 共通プロトコルサンプル

フォスミド



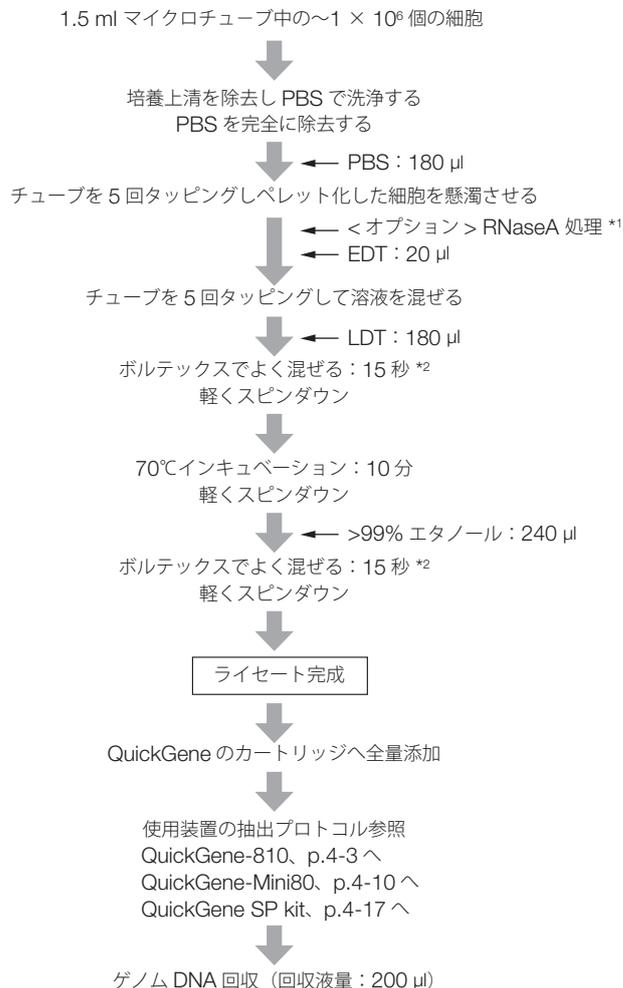
## 3-VIII 章

### 培養細胞からのゲノム DNA抽出

---

## ヒト HepG2 培養細胞からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



\*1 RNaseA : 20  $\mu$ l  
チューブを 5 回タッピングして溶液を混ぜる。  
軽くスピンドウン  
常温で 2 分間放置

\*2 ボルテックスで完全に混ぜる  
(最大回転数)  
ボルテックスで混合が不十分ならば、タッピング、ピペッティングあるいは転倒混和を使用。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### ゲノム DNA の収量

HepG2 細胞の数	収量 ( $\mu$ g)
$5 \times 10^5$ 個	5.2

#### タンパク質の混入 : A260/280

HepG2 細胞の数	A260/280
$5 \times 10^5$ 個	1.7

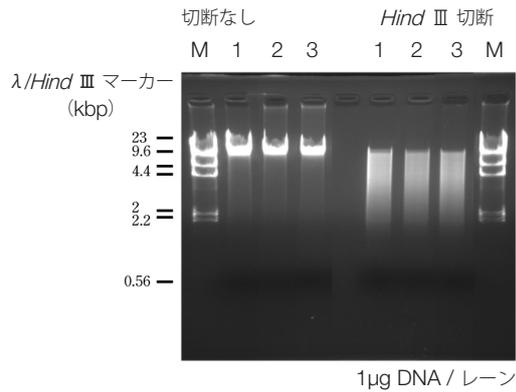
#### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

■ その他

● 制限酵素切断

QuickGene 抽出システムと試薬を用いて数種の細胞株から抽出されたゲノム DNA の *Hind* III 制限酵素切断断片の AGE



QuickGene-810 (自動核酸抽出システム) および QuickGene DNA tissue kit S を用いて抽出したゲノム DNA が *Hind* III 制限酵素で効果的に切断された。

M :  $\lambda$ /*Hind* III digest

1 : HepG2 細胞株からのゲノム DNA (0.5 × 10<sup>6</sup> 個の細胞)

2 : Huh6 細胞株からのゲノム DNA (0.5 × 10<sup>6</sup> 個の細胞)

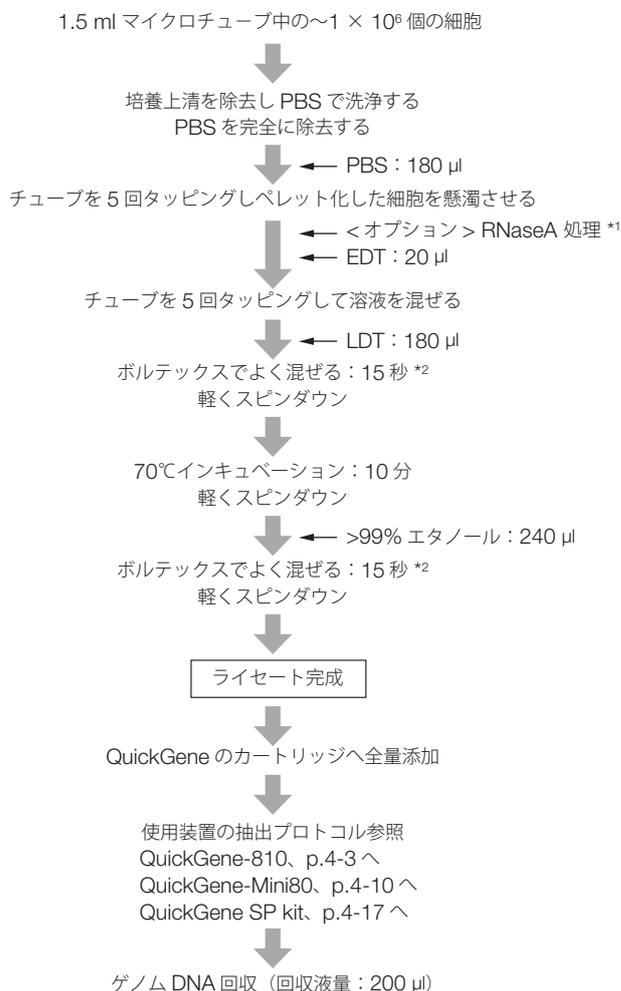
3 : Huh6 細胞株からのゲノム DNA (0.5 × 10<sup>6</sup> 個の細胞)

■ 共通プロトコルサンプル

ラット PC-12 培養細胞、マウス ES 培養細胞

## ヒト Huh6 培養細胞からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



\*1 RNaseA : 20  $\mu$ l  
チューブを 5 回タッピングして溶液を混ぜる。  
軽くスピンドウン  
常温で 2 分間放置

\*2 ボルテックスで完全に混ぜる (最大回転数)  
ボルテックスで混合が不十分ならば、タッピング、ピペッティングあるいは転倒混和を使用。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### ゲノム DNA の収量

Huh6 細胞の数	収量 ( $\mu$ g)
Huh6	7.6
Huh6 から由来	6.6

#### タンパク質の混入 : A260/280

Huh6 細胞の数	A260/280
Huh6	1.8
Huh6 から由来	1.7

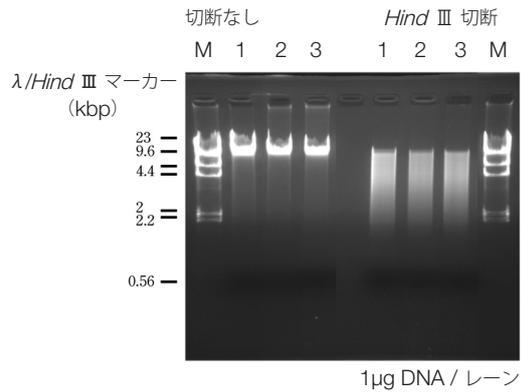
#### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

■ その他

● 制限酵素切断

QuickGene 抽出システムおよび試薬を用いて数種の細胞株から抽出したゲノム DNA の *Hind* III 制限酵素切断断片の AGE



QuickGene-810 (自動核酸抽出システム) および QuickGene DNA tissue kit S で抽出したゲノム DNA が *Hind* III で効果的に切断された。

M : λ/*Hind* III digest

1 : HepG2 細胞株からのゲノム DNA (0.5 × 10<sup>6</sup> 個の細胞)

2 : Huh6 細胞株からのゲノム DNA (0.5 × 10<sup>6</sup> 個の細胞)

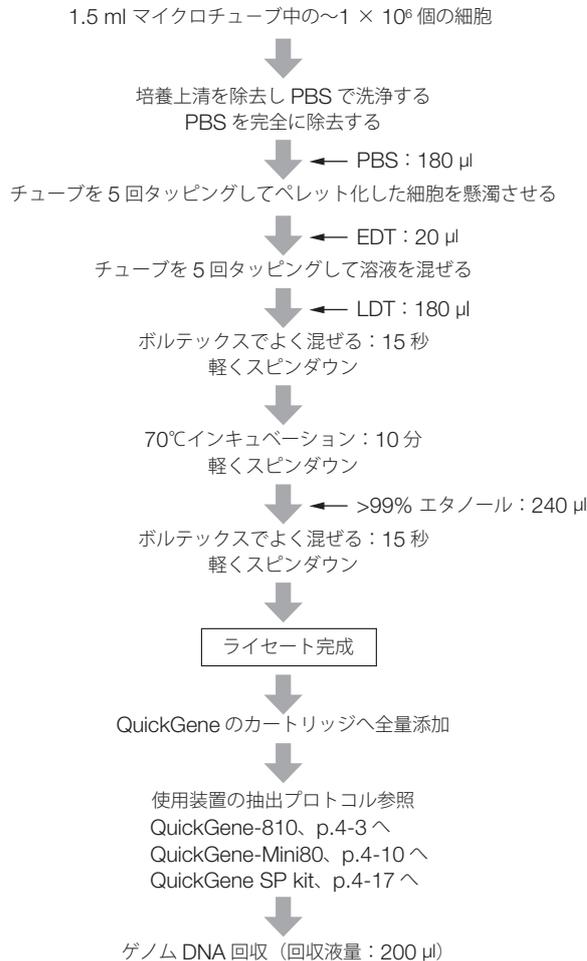
3 : Huh6 細胞株からのゲノム DNA (0.5 × 10<sup>6</sup> 個の細胞)

■ 共通プロトコルサンプル

ラット PC-12 培養細胞、マウス ES 培養細胞

## マウス ES 培養細胞からのゲノム DNA 抽出

### プロトコル



### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### ゲノム DNA の収量

ES 細胞の数	収量 (μg)
1 × 10 <sup>6</sup> 個	約 1.0

#### タンパク質の混入 : A260/280

データなし

#### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

#### その他

データなし

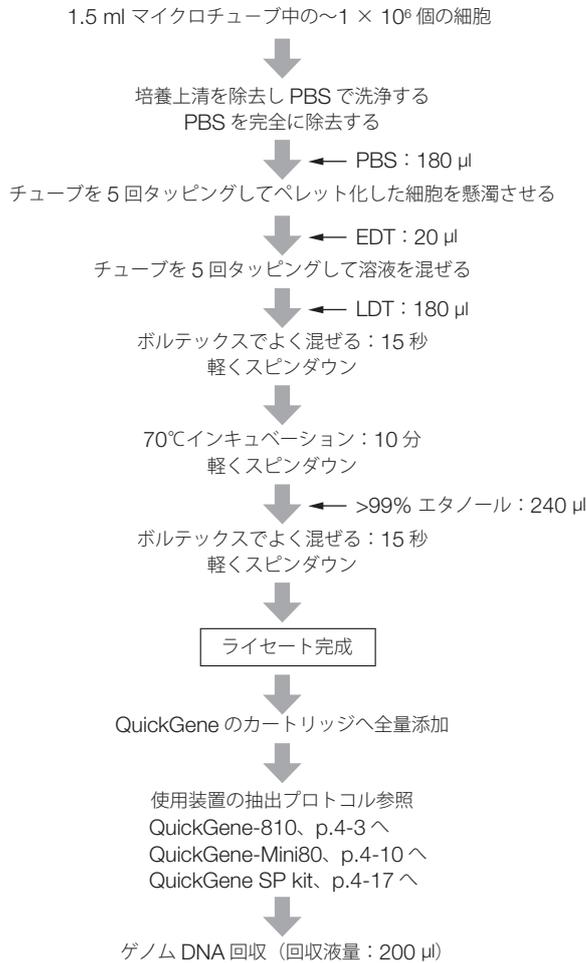
### 共通プロトコルサンプル

ヒト培養細胞株、ラット PC-12 培養細胞

DG-4

# ラット PC-12 培養細胞からのゲノム DNA 抽出

## プロトコル



## 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ ゲノム DNA の収量

PC-12 細胞の数	収量 (μg)
1 × 10 <sup>6</sup> 個	約 15.0

■ タンパク質の混入 : A260/280

PC-12 細胞の数	A260/280
1 × 10 <sup>6</sup> 個	1.45

■ カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

■ その他

データなし

## 共通プロトコルサンプル

ヒト培養細胞株、マウス ES 培養細胞



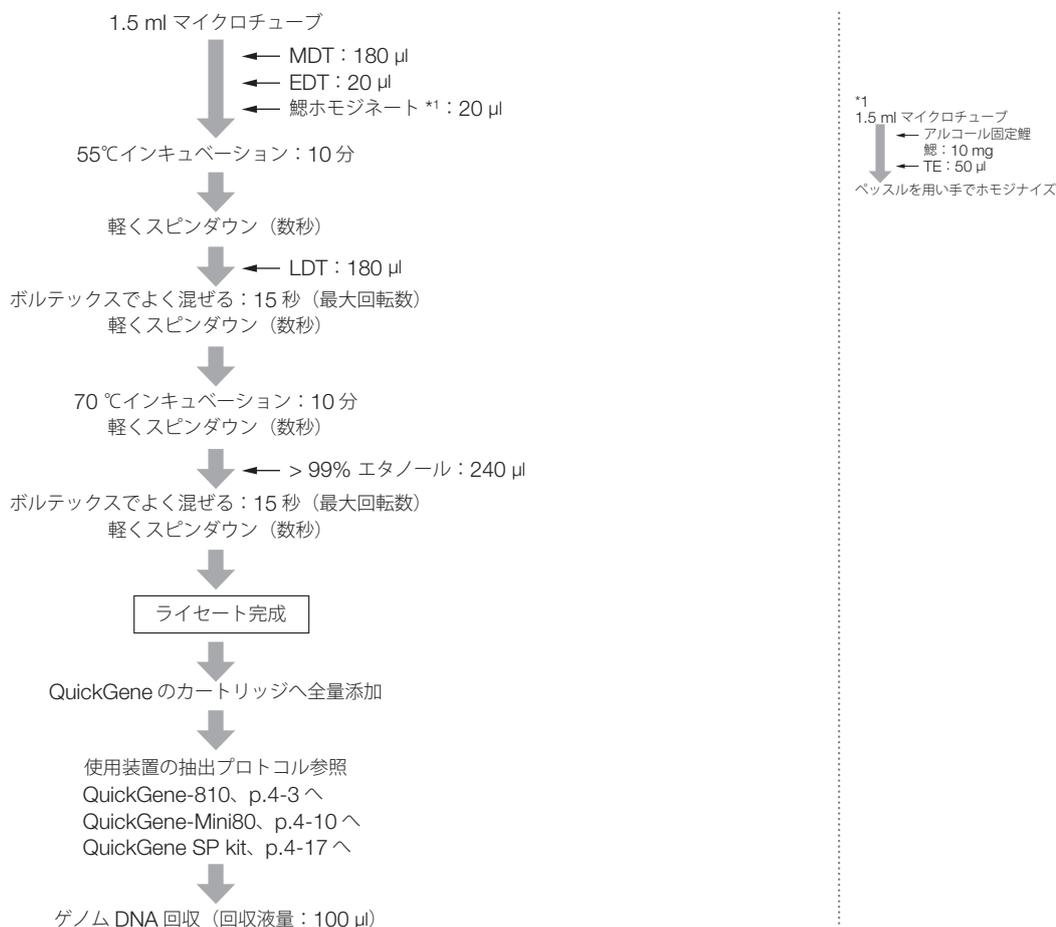
## 3-IX 章

### ウイルスからのゲノム DNA抽出

---

# コイヘルペスウイルス (KHV) 感染魚の鰓 (エラ) からのゲノム DNA 抽出

## プロトコル



## 結果

### 電気泳動図

データなし

### ゲノム DNA の収量

	No.	収量 ( $\mu$ g)
健康魚	1	4.24
	2	4.07
感染魚	1	0.67
	2	1.28
	3	2.41
	4	2.35

■ タンパク質の混入：A260/280

	No.	A/260/280
健康魚	1	2.19
	2	2.27
感染魚	1	2.04
	2	2.39
	3	2.10
	4	1.99

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

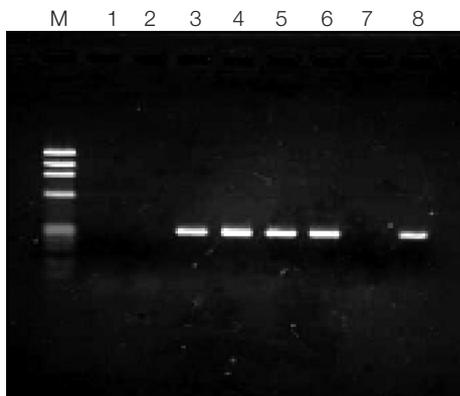
■ その他

● PCR

QuickGene-810 システムを用いて抽出した DNA をテンプレートとして PCR を行った。

PCR の方法 は、Yuasa et al, Improvement of a PCR method with the Sph 1-5 primer set for the detection of Koi herpesvirus (KHV), Fish Pathology, 40, 37-39 (2005) に従って行った。

プライマー：Sph I -5F, Sph I -5R



M：φ x 174-Hae III digest  
 1：健康魚 No.1  
 2：健康魚 No.2  
 3：感染魚 No.1  
 4：感染魚 No.2  
 5：感染魚 No.3  
 6：感染魚 No.4  
 7：ネガティブコントロール  
 8：ポジティブコントロール

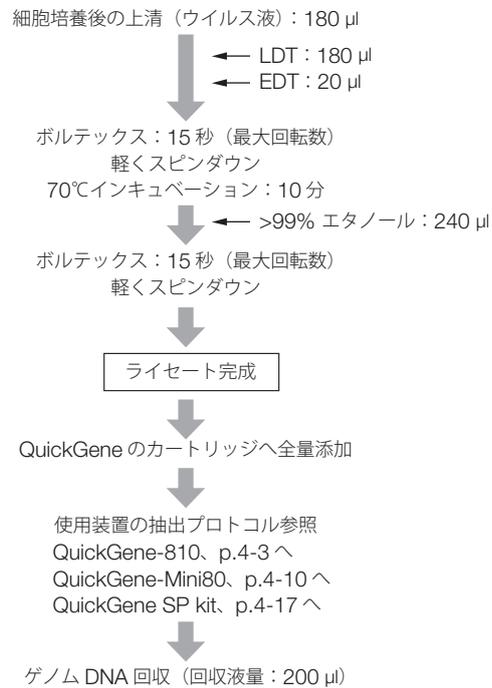
この PCR の結果、感染魚 No.1-4 でポジティブコントロールと同様の増幅産物が確認された。

■ 共通プロトコルサンプル

データなし

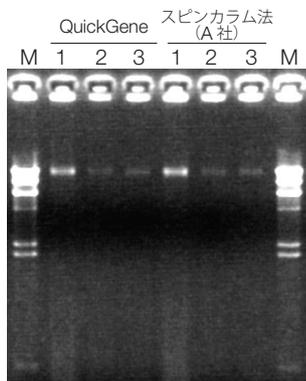
# ヒト単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) ウイルス液からのゲノム DNA 抽出

## プロトコル



## 結果

### 電気泳動図



電気泳動条件 : 1.5% アガロース / 1 × TAE

M :  $\lambda$  -Hind III  
1 : No.1 VR3 (野生株)  
2 : No.2 d41 (UL41 欠損変異株)  
3 : No.3 d13 (UL13 欠損変異株)

抽出したゲノム DNA に分解は認められなかった。

### ゲノム DNA の収量

サンプル	No.1	No.2	No.3
QuickGene	324 ng	32 ng	51 ng
スピんカラム法 (A社)	351 ng	36 ng	40 ng

### タンパク質の混入 : A260/280

サンプル	No.1	No.2	No.3
QuickGene	2.23	2.01	2.14
スピんカラム法 (A社)	1.98	2.41	1.92

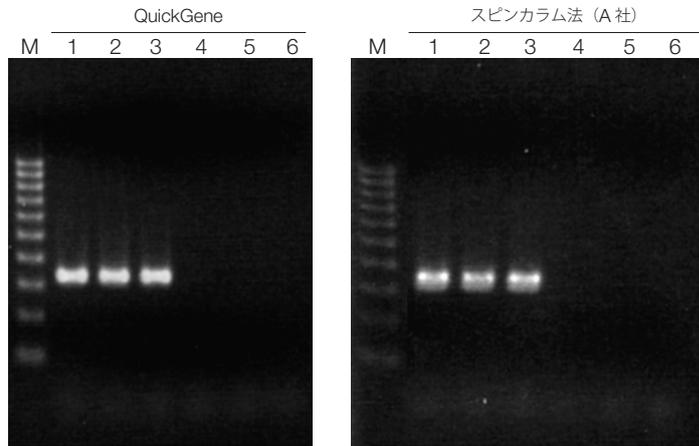
### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

■ その他

● PCR

QuickGene システムおよびスピンカラム法 (A 社) を用いて HSV-1 遺伝子から抽出したゲノム DNA で、HSV-1 遺伝子の検出を、HSV-1 に特異的なプライマーおよび HSV-2 に特異的なプライマーを使用した PCR により行った。



電気泳動条件：2% アガロース / 1 × TAE

M：100 bp DNA Ladder  
 1：No.1 VR3/HSV-1 プライマー  
 2：No.2 d41/HSV-1 プライマー  
 3：No.3 d13/HSV-1 プライマー  
 4：No.1 VR3/HSV-2 プライマー  
 5：No.2 d41/HSV-2 プライマー  
 6：No.3 d13/HSV-2 プライマー

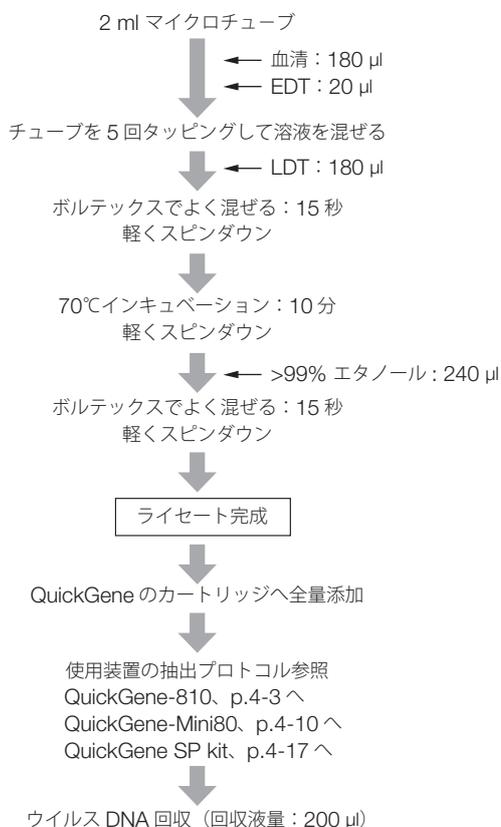
いずれのゲノム DNA からでも PCR 産物を検出できた。

■ 共通プロトコルサンプル

データなし

## 血清からの HBV DNA 抽出

### プロトコル



### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ ウイルス DNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

データなし

### 共通プロトコルサンプル

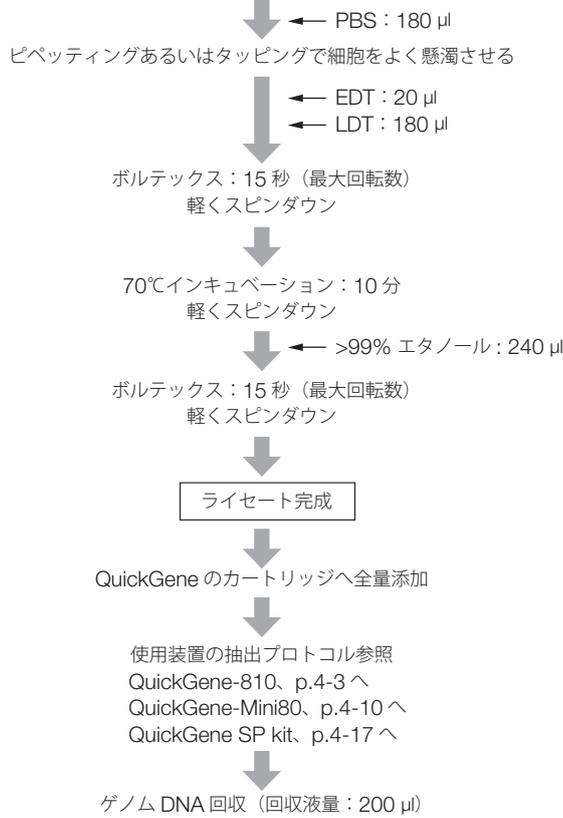
データなし

DH-4

ヒト子宮頸癌細胞株からのヒトパピローマウイルス (HPV) DNA 抽出

■ プロトコル

1.5 ml マイクロチューブに回収した細胞ペレット (上限  $1 \times 10^6$  個の細胞)

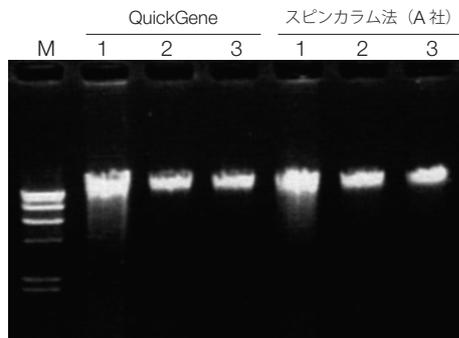


DH-4

■ 結果

細胞株 : HeLa (HPV18 10 ~ 50 コピー)  
: SiHa (HPV16 1 ~ 2 コピー)  
: CasKi (HPV16 400 ~ 600 コピー)

■ 電気泳動図



電気泳動条件 : 1.5% アガロース /  $1 \times$  TAE

M :  $\lambda$ -Hind III  
1 : HeLa  
2 : SiHa  
3 : CasKi

抽出したゲノム DNA に分解は認められなかった。

### ゲノム DNA の収量

サンプル	HeLa	SiHa	CasKi
QuickGene	23.5 $\mu$ g	11.6 $\mu$ g	13.5 $\mu$ g
スピнкаラム法 (A 社)	26.2 $\mu$ g	10.5 $\mu$ g	7.3 $\mu$ g

### タンパク質の混入：A260/280

サンプル	HeLa	SiHa	CasKi
QuickGene	2.00	1.94	1.93
スピнкаラム法 (A 社)	1.81	1.94	2.15

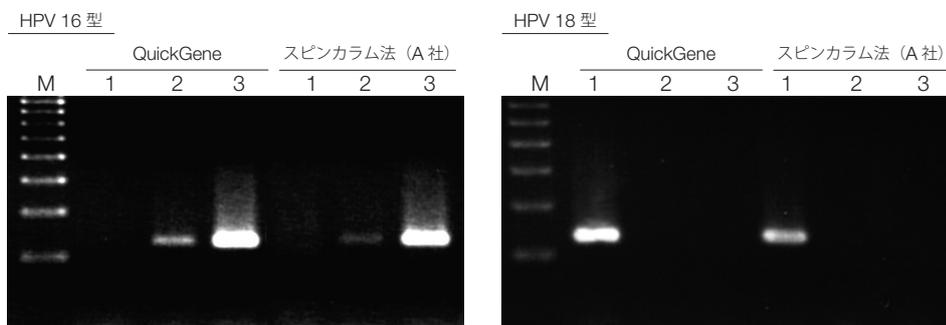
### カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

### その他

#### • PCR

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて抽出したゲノム DNA で、HPV の 16 型と 18 型のウイルスゲノム DNA の検出を、PCR 法により行った。



QuickGene システムを用いて抽出した HPV 感染細胞 DNA から、感染細胞中 1 から 2 コピーの HPV ゲノム DNA を PCR により検出することができた。

### 共通プロトコルサンプル

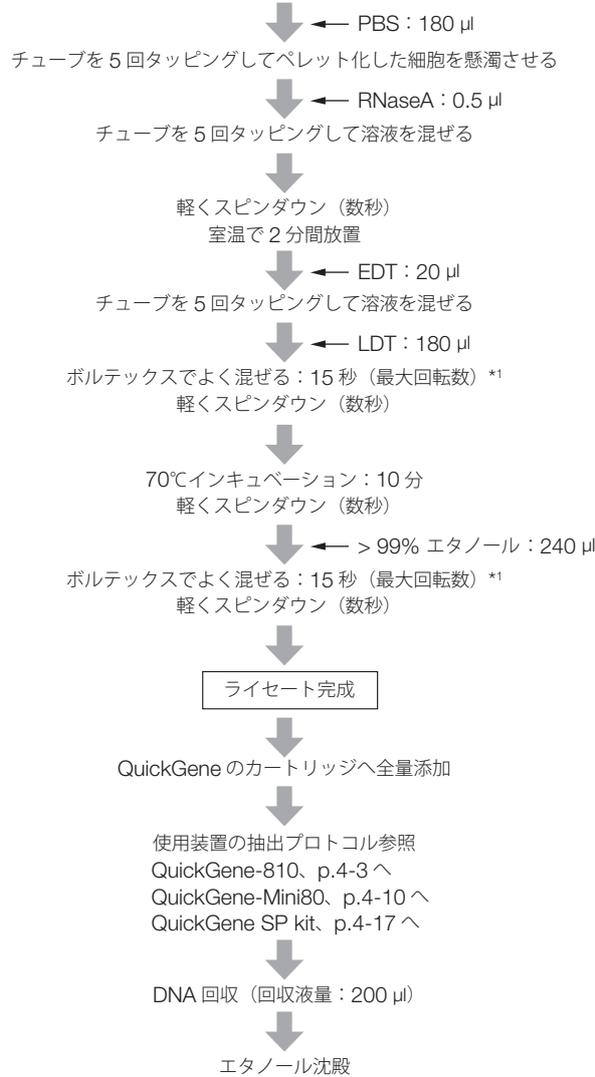
データなし

DH-5

サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染細胞からのウイルス DNA 抽出

プロトコル

細胞を 1.5 ml マイクロチューブに回収し、ペレット化する (1.5 ml マイクロチューブ中に  $\sim 1 \times 10^6$  個の細胞)



\*1 ボルテックスで完全に混ぜる (最大回転数)  
ボルテックスで不十分ならばタッピング、ピペッティングあるいは転倒混和で混合

結果

■ 電気泳動図  
データなし

■ ウイルス DNA の収量 (µg)

感染後時間 (h)	1.5		3		6		24	
ウイルス	mock	SIV	mock	SIV	mock	SIV	mock	SIV
細胞数	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$8 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$9.2 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^6$
QuickGene-810	7.6	7.9	3.0	8.0	4.5	8.0	8.2	7.4
Spin column	3.8	4.3	3.0	2.5	5.4	5.5	4.7	3.4

■ タンパク質の混入：A260/280

感染後時間 (h)	1.5		3		6		24	
ウイルス	mock	SIV	mock	SIV	mock	SIV	mock	SIV
QuickGene-810	1.81	1.80	1.79	1.75	1.80	1.80	1.80	1.82
スピнкаラム (A社)	1.85	1.85	1.80	1.81	1.79	1.77	1.81	1.82

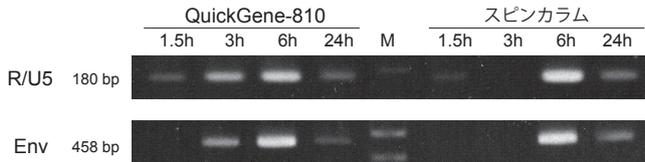
■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

● PCR の AGE・DNA の断片

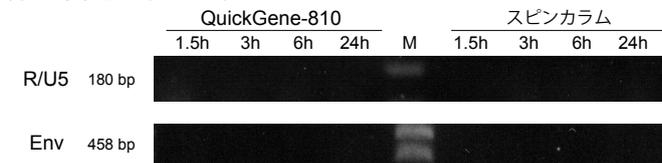
SIV 感染細胞



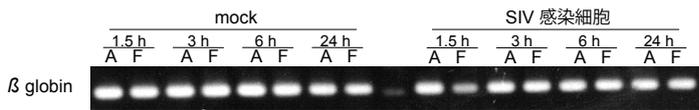
QuickGene システムおよびスピнкаラムを用いて、SIV 感染細胞から抽出した DNA 1 µg で PCR を行った。

この PCR の結果、QuickGene-810 システムでは、感染 1.5 および 3 時間後に抽出した DNA の増幅産物の電気泳動バンドも検出できた。

非感染細胞 (mock)



M：マーカー (ladder)



F：QuickGene-810  
A：スピнкаラム

■ 共通プロトコルサンプル

データなし

## 3-XI-i 章

動物血液からの total RNA抽出

---

**RA-a-1**

# 白血球からの total RNA 抽出

## プロトコル

溶血後の白血球を 1.5 ml マイクロチューブ中にペレット化する  
(白血球の最大数は  $1.5 \times 10^7$  個)

↓  
チューブをピペティングしてペレットをほぐす

← LRB (2-ME 添加済み) \*1 : 520  $\mu$ l

ボルテックスでよく混ぜる : 30 秒 (最大回転数)  
軽くスピンドウン

← >99% エタノール : 250  $\mu$ l

ボルテックスでよく混ぜる : 5 分 (最大回転数) \*2  
軽くスピンドウン

ライセート完成

↓  
QuickGene のカートリッジへ全量添加

↓  
使用装置の抽出プロトコル参照  
QuickGene-810、p.4-5 へ  
QuickGene-Mini80、p.4-12 へ

↓  
total RNA 回収 (回収液量 : 50  $\mu$ l)

\*1 1 ml の LRB 当たり 10  $\mu$ l の 2-ME を添加してください。

\*2 ボルテックス時にビーズ (シリコニア 5mm $\phi$ ) 1 個を入れると、より効果的にホモジナイズできます。その際には 2 ml マイクロチューブを御利用ください。

## 結果

### 電気泳動図

データなし

### total RNA の収量

	白血球の数	QuickGene	スピнкаラム法 (A 社) *1	自動磁気ビーズ法 *2
DNase 処理あり	$2 \times 10^6$	0.6	0.4	0.7
	$1 \times 10^7$	4.5	3.8	-
	$1.5 \times 10^7$	6.5	-	-
DNase 処理なし	$1.0 \times 10^7$	5.0	4.2	-

\*1 : スピнкаラム法に対しては白血球の最大数は  $1 \times 10^7$

\*2 : 自動磁気ビーズ法に対しては白血球の最大数は  $2 \times 10^6$

### タンパク質の混入 : A260/280

	白血球の数	QuickGene	スピнкаラム法 (A 社) *1	自動磁気ビーズ法 *2
DNase 処理あり	$2 \times 10^6$	2.20	2.04	2.46
	$1 \times 10^7$	2.21	2.09	-
	$1.5 \times 10^7$	2.10	-	-
DNase 処理なし	$1.0 \times 10^7$	2.17	2.10	-

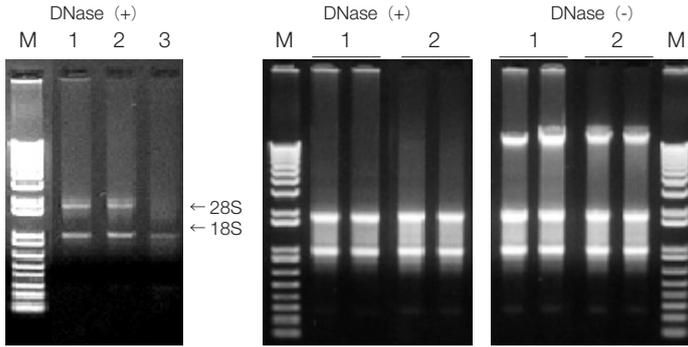
\*1 : スピнкаラム法に対しては白血球の最大数は  $1 \times 10^7$

\*2 : 自動磁気ビーズ法に対しては白血球の最大数は  $2 \times 10^6$

■ Total RNA の電気泳動

白血球の数： $2 \times 10^6$

白血球の数： $1 \times 10^7$



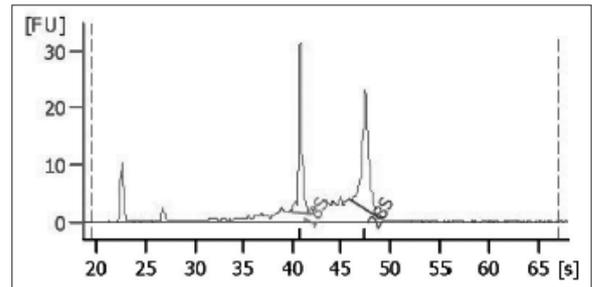
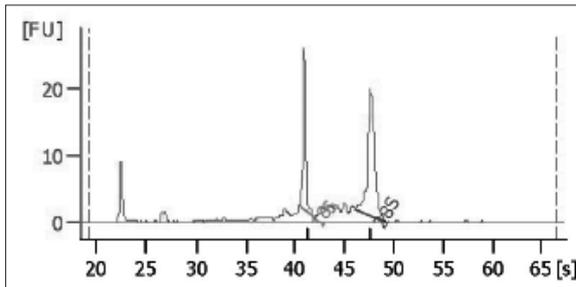
電気泳動条件：1% アガロース /  $1 \times$  TAE

M：マーカー  
(1Kb Plus DNA Ladder：Invitrogen)  
1：QuickGene  
2：スピнкаラム法 (A 社)  
3：自動磁気ビーズ法

■ Total RNA の品質 (DNase 処理あり)

QuickGene (白血球の数： $1 \times 10^7$ )

スピнкаラム法 (A 社) (白血球の数： $1 \times 10^7$ )

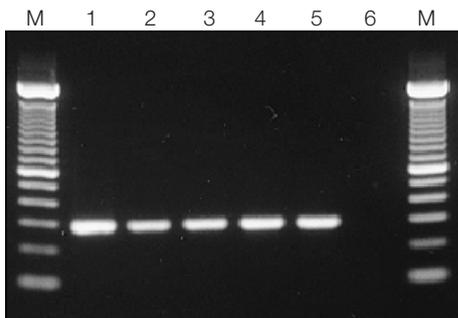


	白血球の数	QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)	自動磁気ビーズ法
RIN	$2 \times 10^6$	7.7	6.5	5.0
	$1 \times 10^7$	9.2	8.8	-
28S / 18S	$2 \times 10^6$	1.5	0.8	0.0
	$1 \times 10^7$	1.6	1.2	-

RIN (RNA integrity number：アジレント (Agilent))：アレイ等に対し利用できる RNA 品質の指標になる値 最良値：RIN=10

■ その他

● RT-PCR



M：マーカー (100bp DNA Ladder：Invitrogen)  
1：ポジティブコントロール  
2,3：QuickGene  
4,5：スピнкаラム法 (A 社)  
6：ネガティブコントロール

● リアルタイム PCR

$1 \mu\text{g}$  の total RNA 当たりの GAPDH コピー数 ( $1 \times 10^7$  個の白血球からの抽出に対して)

QuickGene	$3.15 \times 10^7$
スピнкаラム法 (A 社)	$1.11 \times 10^7$

使用機種：リアルタイム PCR システムライトサイクラー (Roche)  
使用試薬：LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I  
LightCycler ヒト GAPDH プライマーセット

■ 共通プロトコルサンプル

データなし



## 3-XI-ii 章

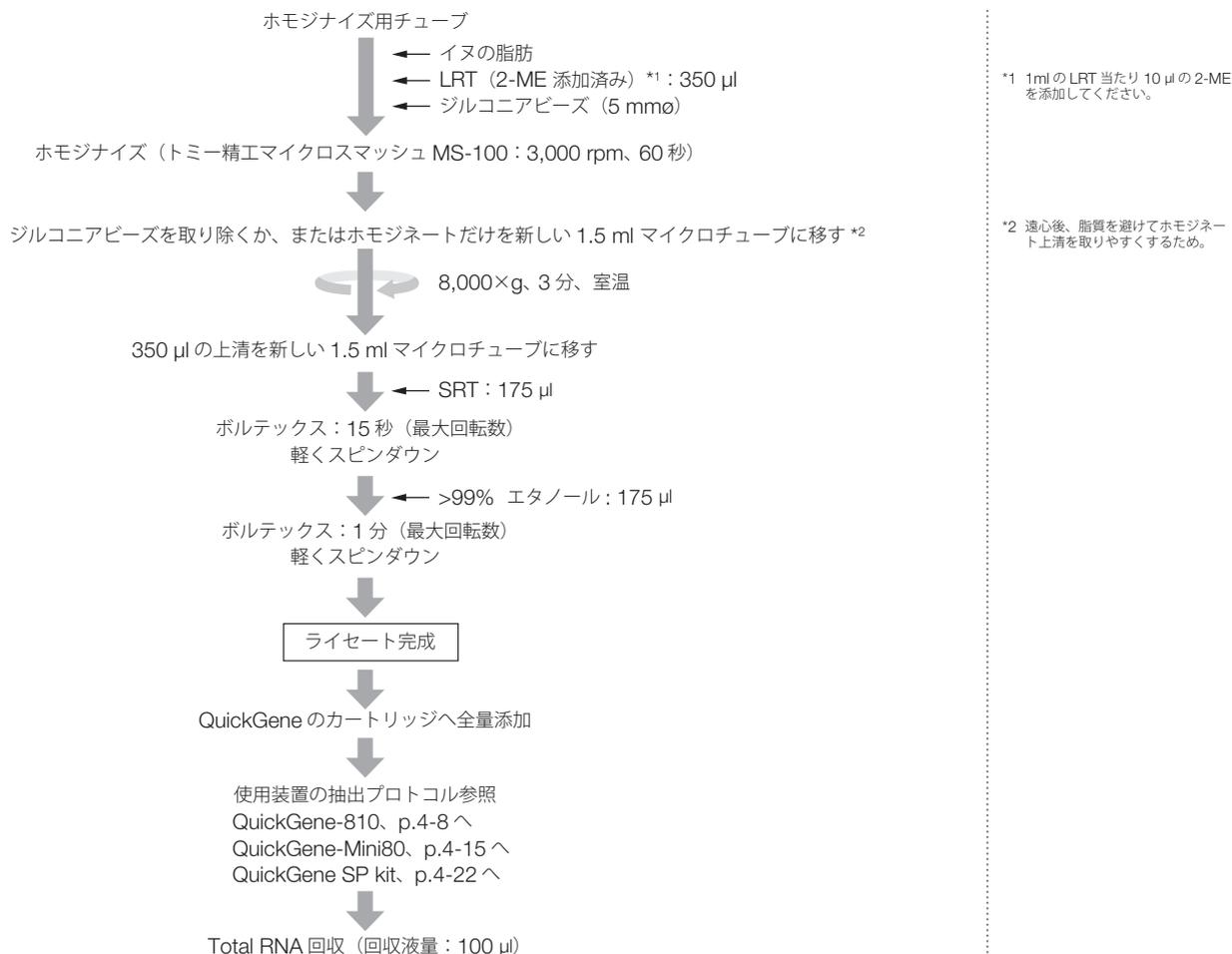
動物組織からの total RNA抽出

---

RA-b-1

# イヌの脂肪組織からの total RNA 抽出

## プロトコル



## 結果

イヌあるいはネコの脂肪組織から total RNA を抽出した。

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

組織の量	QuickGene (µg)	競合 A 社キット (µg)
30 mg	0.5	0.8
100 mg	2.3	-
200 mg	4.6	4.2
400 mg	28.0	-

### タンパク質の混入 : A260/280

組織の量	QuickGene (µg)	競合 A 社キット (µg)
30 mg	1.88	1.58
100 mg	2.12	-
200 mg	2.16	2.17
400 mg	2.00	-

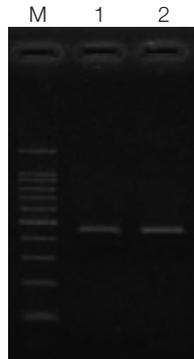
■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

• RT-PCR

QuickGene システムを用いて、イヌやネコの脂肪組織から抽出された total RNA に対して、イヌ PPAR gamma (695-1130) あるいはネコ PPAR gamma (695-1130) に対する RT-PCR 増幅を ReverTra Ace (TOYOBO) を用いて行った。



M：マーカー（100 bp DNA Ladder：TOYOBO）

1：イヌ PPAR gamma（695-1130）

2：ネコ PPAR gamma（695-1130）

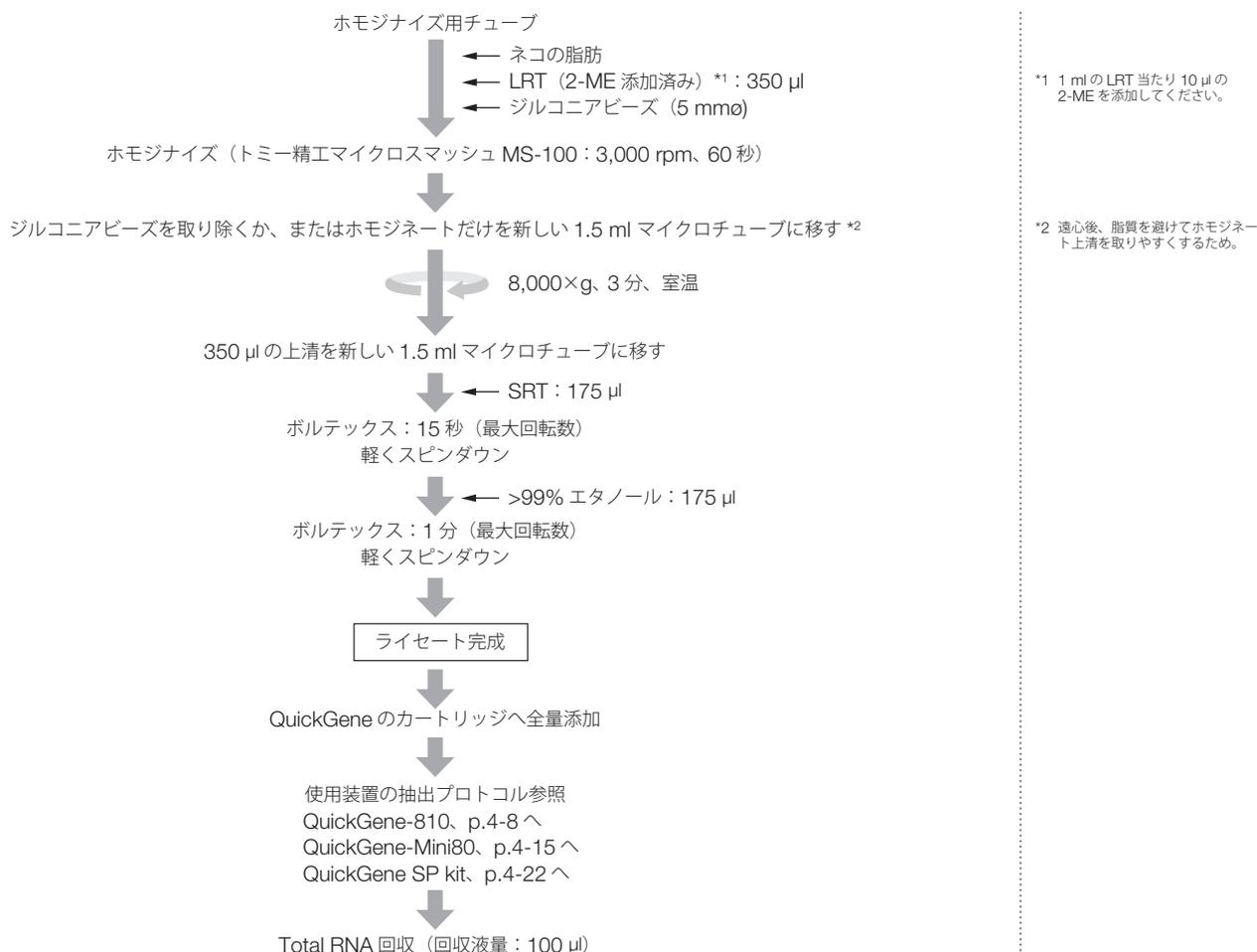
■ 共通プロトコルサンプル

イヌの皮膚、ネコの脂肪組織

**RA-b-2**

# ネコの脂肪組織からの total RNA 抽出

## プロトコル



## 結果

イヌあるいはネコの脂肪組織から total RNA を抽出した。

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

組織の量	QuickGene (µg)	競合 A 社キット (µg)
30 mg	0.5	0.8
100 mg	2.3	-
200 mg	4.6	4.2
400 mg	28.0	-

### タンパク質の混入 : A260/280

組織の量	QuickGene (µg)	競合 A 社キット (µg)
30 mg	1.88	1.58
100 mg	2.12	-
200 mg	2.16	2.17
400 mg	2.00	-

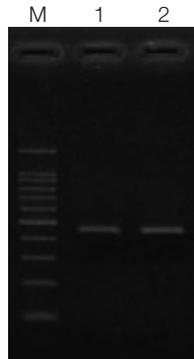
■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

• RT-PCR

QuickGene システムを用いて、イヌやネコの脂肪組織から抽出された total RNA に対して、イヌ PPAR gamma (695-1130) あるいはネコ PPAR gamma (695-1130) に対する RT-PCR 増幅を ReverTra Ace (TOYOBO) を用いて行った。



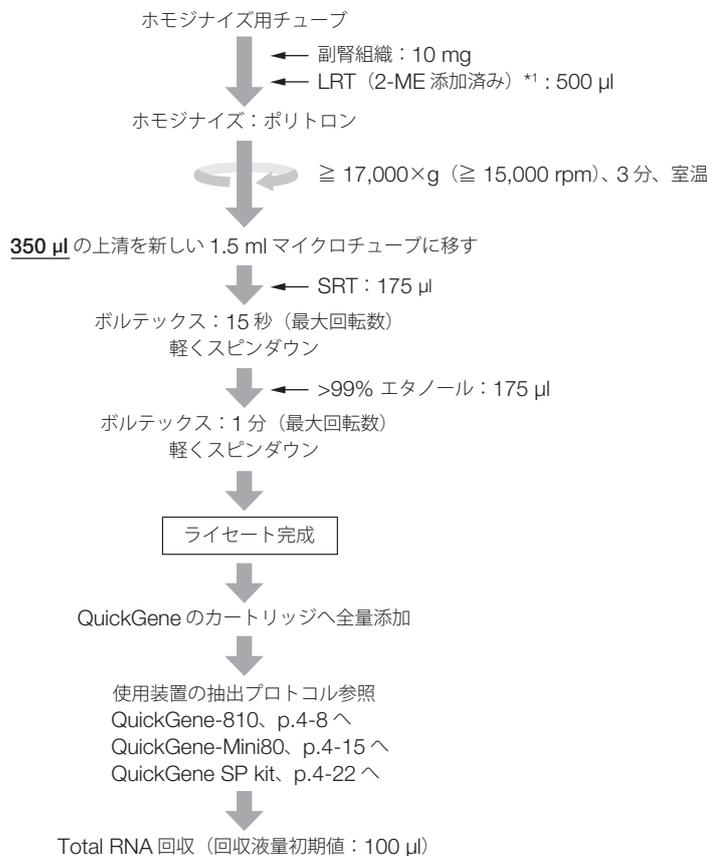
M：マーカー（100 bp DNA Ladder：TOYOBO）  
 1：イヌ PPAR gamma（695-1130）  
 2：ネコ PPAR gamma（695-1130）

■ 共通プロトコルサンプル

イヌの皮膚、イヌの脂肪組織

## マウスの副腎からの total RNA 抽出

### プロトコル



\*1 1 ml の LRT 当たり 10  $\mu$ l の 2-ME を添加してください。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### Total RNA の収量

副腎の量	収量 ( $\mu$ g)
約 10 mg	1.0

#### タンパク質の混入：A260/280

副腎の量	A260/280
約 10 mg	1.5

#### カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

#### その他

データなし

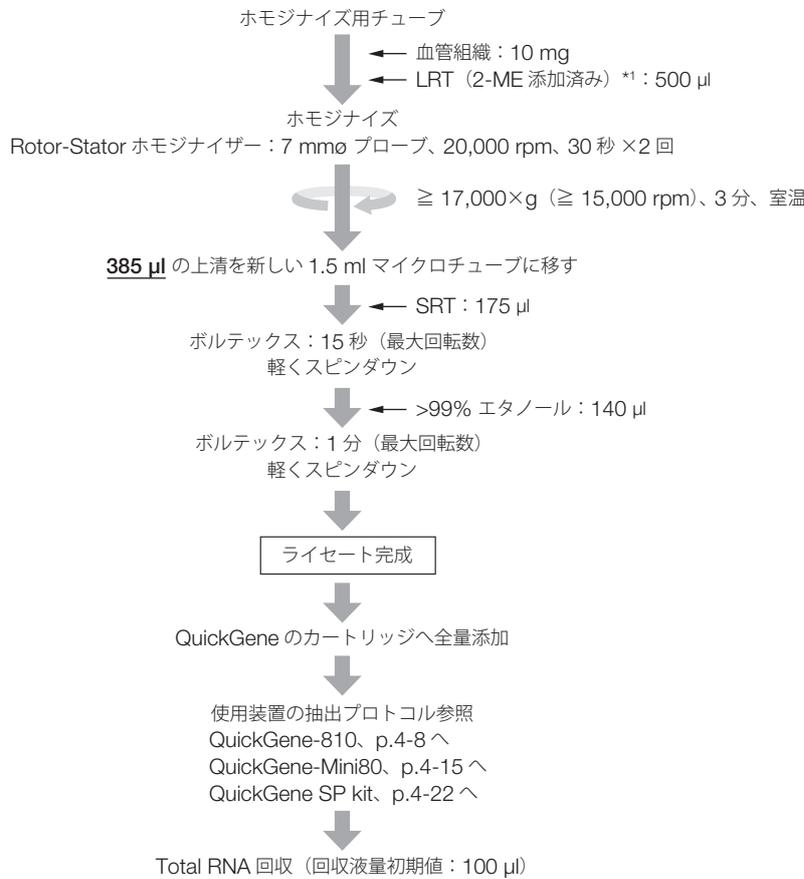
### 共通プロトコルサンプル

データなし

RA-b-4

ウサギの血管からの total RNA 抽出

プロトコル



\*1 1 ml の LRT 当たり 10 µl の 2-ME を添加してください。

RA-b-4

結果

■ 電気泳動図

データなし

■ Total RNA の収量

血管の量	収量 (µg)
10 mg	1.0

■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

データなし

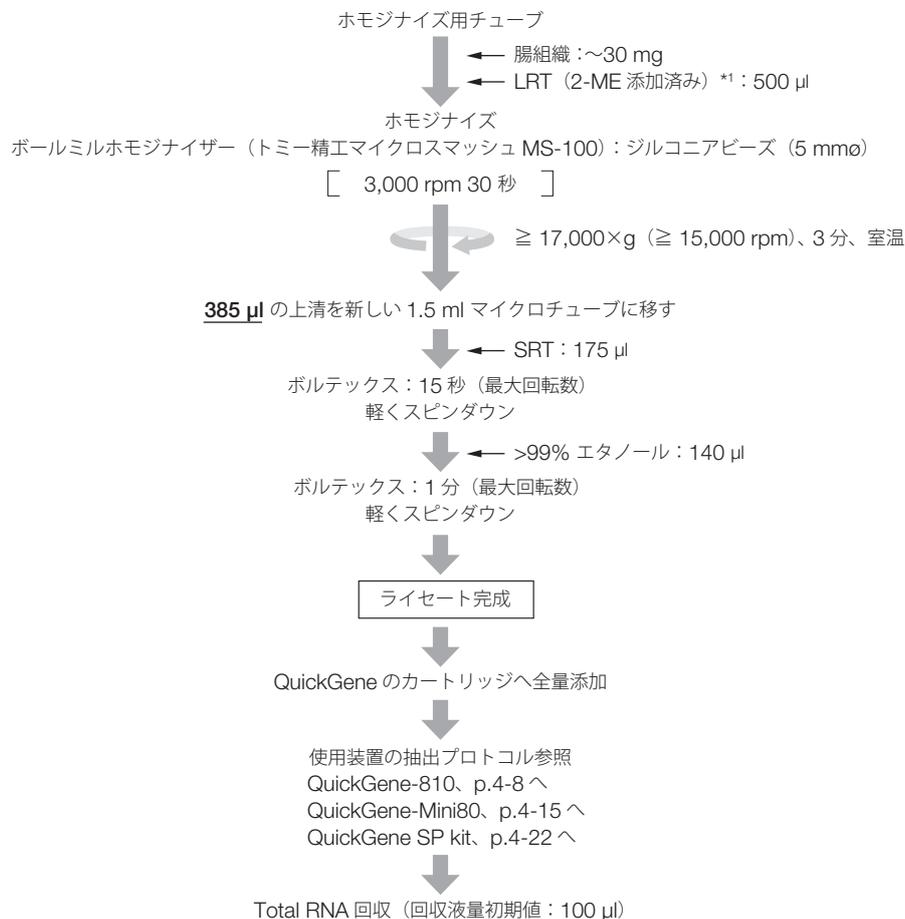
共通プロトコルサンプル

データなし

**RA-b-5**

**ネコの腸からの total RNA 抽出**

**プロトコル**



\*1 1 ml の LRT 当たり 10 µl の 2-ME を添加してください。

**結果**

■ 電気泳動図

データなし

■ Total RNA の収量

腸の量	収量 (µg)
30 mg	13.8

■ タンパク質の混入：A260/280

腸の量	A260/280
30 mg	1.78

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

データなし

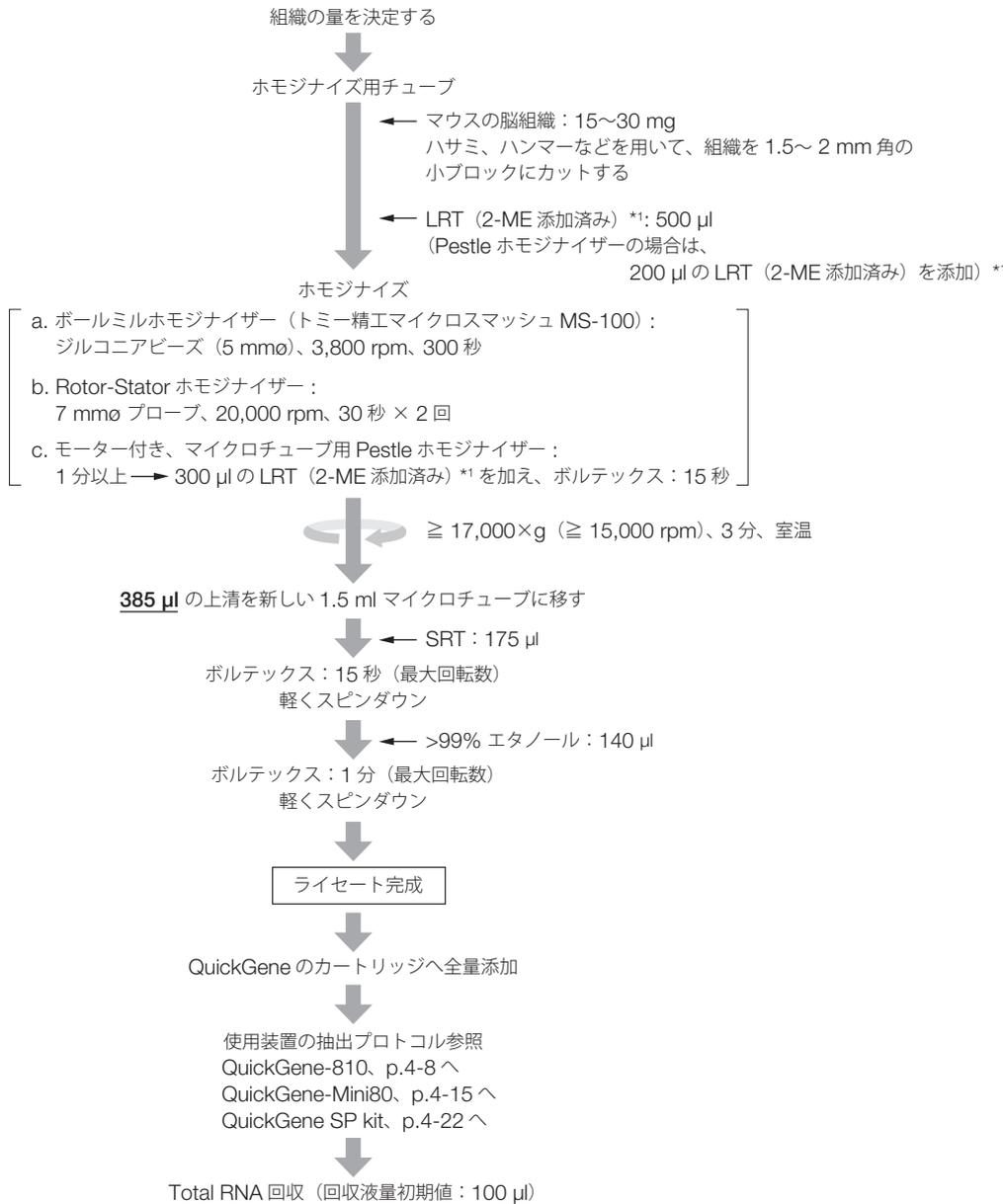
**共通プロトコルサンプル**

データなし

RA-b-6

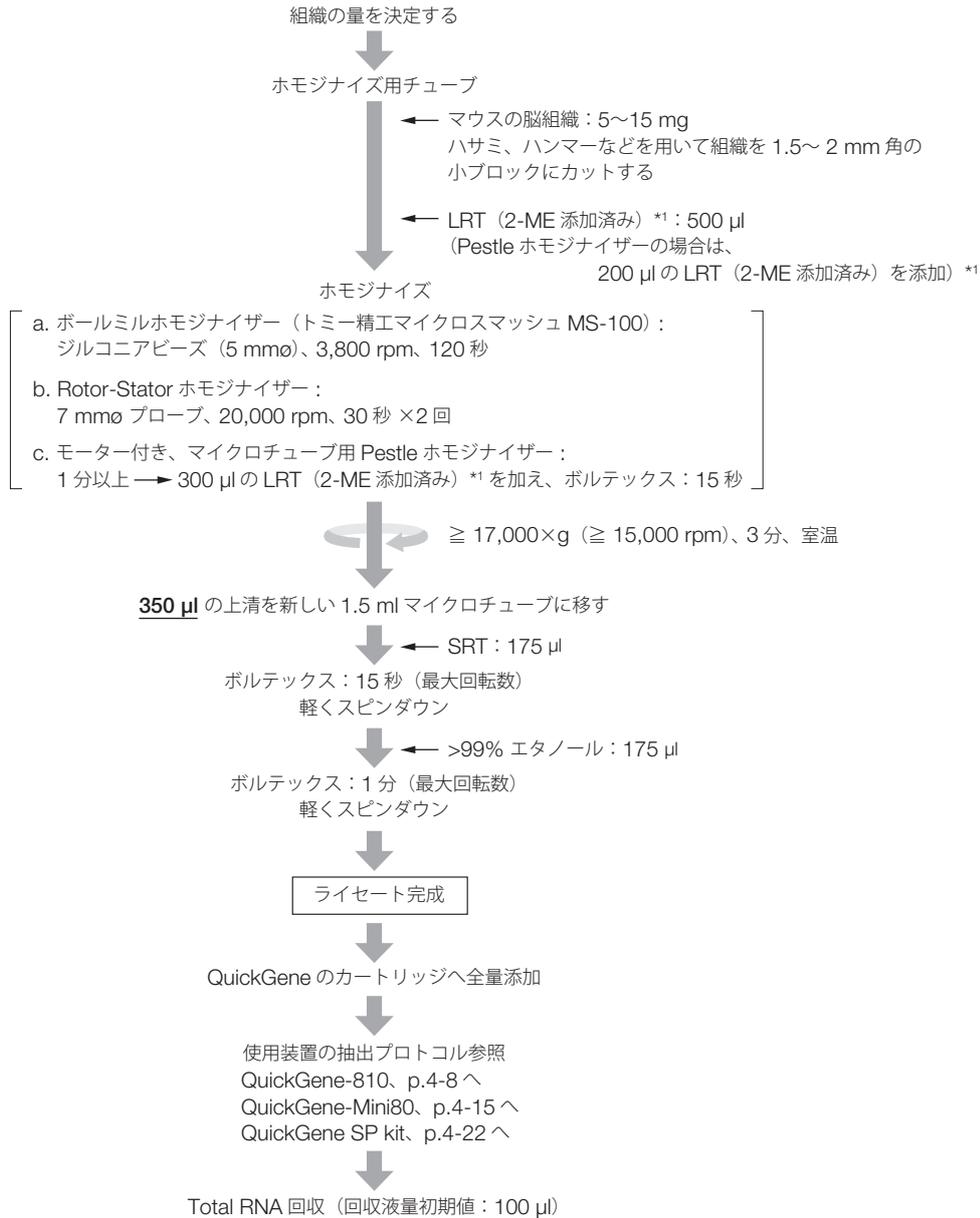
マウスの脳からの total RNA 抽出

プロトコル 1 (15-30 mg)



\*1 1 ml の LRT 当たり 10 µl の 2-ME を添加してください。

## プロトコル 2 (5-15 mg)

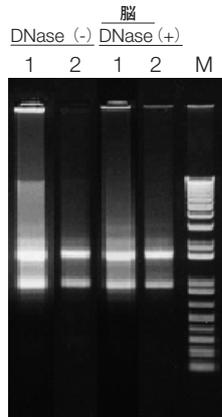


\*1 1 ml の LRT 当たり 10  $\mu$ l の 2-ME を添加してください。

## 結果

### 電気泳動図

QuickGene システム（ボールミルホモジナイザーを用いて）と競合 A 社キット（スピンカラム法を用いて）、マウス脳組織から抽出された total RNA で、非変性アガロースゲル電気泳動を行った。



M : マーカー (1 kb PLUS DNA Ladder : Invitrogen)  
1 : QuickGene (MS-100 を用いて)  
2 : 競合 A 社キット (スピンカラム法)

< 電気泳動条件 >  
1% アガロース / 1 × TAE

### Total RNA の収量

組織	ボールミルホモジナイザー (MS-100)			Rotor-Stator ホモジナイザー		
	組織量	DNase (+)	DNase (-)	組織量	DNase (+)	DNase (-)
脳	40 mg	21 µg	21 µg	40 mg	20 µg	21 µg

### タンパク質の混入 : A260/280

組織	組織量	A260/280	
		DNase (+)	DNase (-)
脳	40 mg	2.11	2.17

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

組織	組織量	A260/230	
		DNase (+)	DNase (-)
脳	40 mg	2.11	1.95

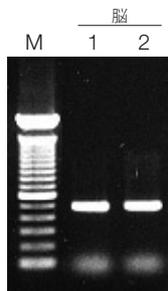
### その他

#### • RT-PCR

QuickGene システム（ボールミルホモジナイザーを用いて）と競合 A 社キット（スピンカラム法）を用いて抽出された total RNA に対して RT-PCR を行った。

< 室温反応条件 >  
テンプレート : マウス脳からの Total RNA (DNase 処理あり) 500 ng  
酵素 : SuperScript II (Invitrogen)

< PCR 条件 >  
テンプレート : Total RNA (10 pg/µl) 相当量の cDNA  
プライマー : G3PDH プライマー  
酵素 : Takara Taq Hot Start Version (TaKaRa)

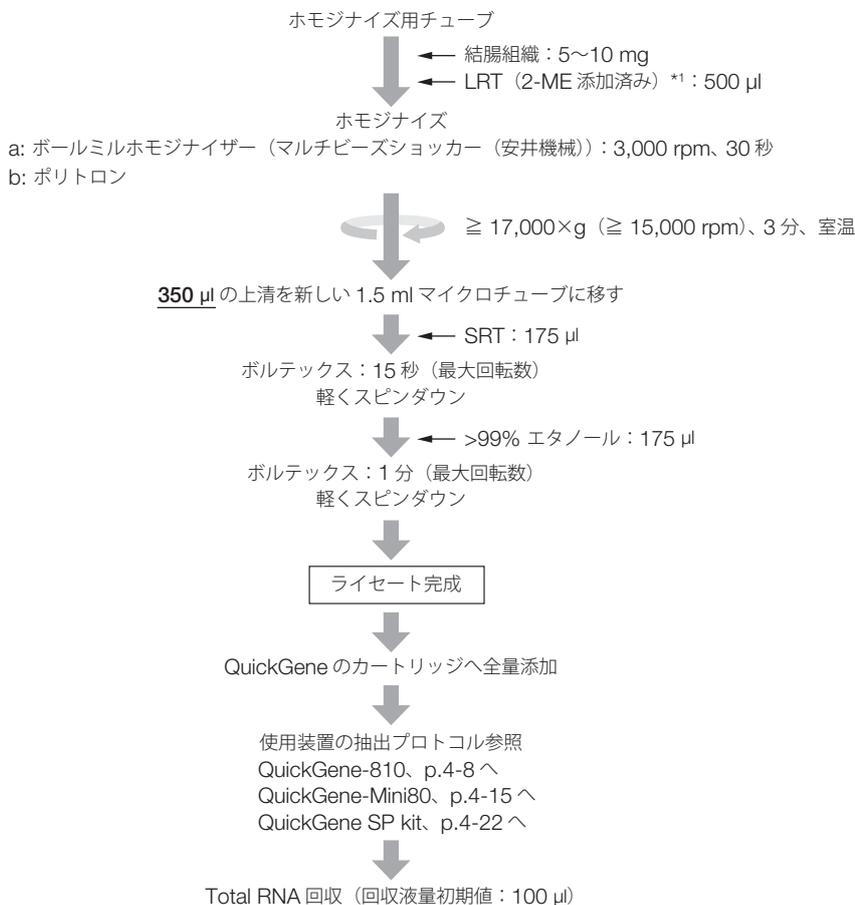


< 電気泳動条件 >  
1% アガロース / 1 × TAE

M : マーカー (100 bp DNA Ladder : Invitrogen)  
1 : QuickGene  
2 : 競合 A 社キット (スピンカラム法)

## 共通プロトコルサンプル

マウス精巣、マウス肝臓、マウス肺、マウス腎臓、マウス脾臓

**RA-b-7**
**マウス結腸からの total RNA 抽出**
**プロトコル**


\*1 1 ml の LRT 当たり 10  $\mu$ l の 2-ME を添加してください。

**結果**
**電気泳動図**

データなし

**Total RNA の収量**

結腸の量	収量 ( $\mu$ g)
a：約 5 mg	約 8.0
b：約 10 mg	3.0

**タンパク質の混入：A260/280**

結腸の量	A260/280
b：約 10 mg	2.7

**カオトロピック塩の混入：A260/230**

データなし

**その他**

データなし

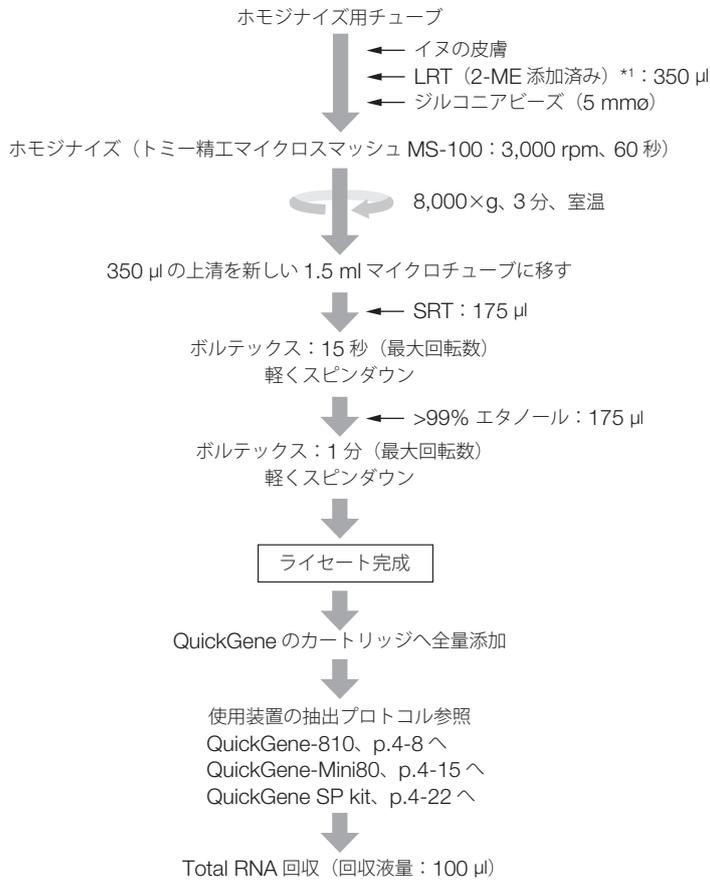
**共通プロトコルサンプル**

データなし

RA-b-8

イヌの皮膚からの total RNA 抽出

プロトコル



\*1 1 ml の LRT 当たり 10 µl の 2-ME を添加してください。

結果

■ 電気泳動図  
データなし

■ Total RNA の収量

組織の量	収量 (µg)	
	QuickGene	競合 A 社キット
1 mm <sup>2</sup>	検出限界以下	検出限界以下

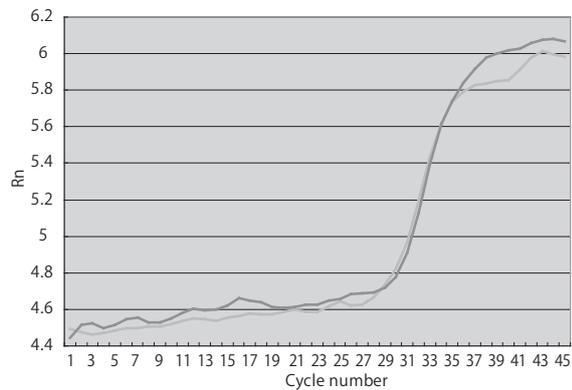
■ タンパク質の混入 : A260/280  
データなし

■ カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし

■ その他

● ワンステップ リアルタイム RT-PCR

イヌの皮膚から抽出した total RNA で、QuantiTect プローブ RT-PCR キット (QIAGEN) と ABI PRISM7000 Sequence Detection system (Applied Biosystems) を使用してワンステップ リアルタイム RT-PCR を行い、GAPDH を増幅した。



Total RNA の収量は、吸光光度計での測定では検出限界以下であったが、ワンステップ リアルタイム RT-PCR は非常に良好な結果を示した。

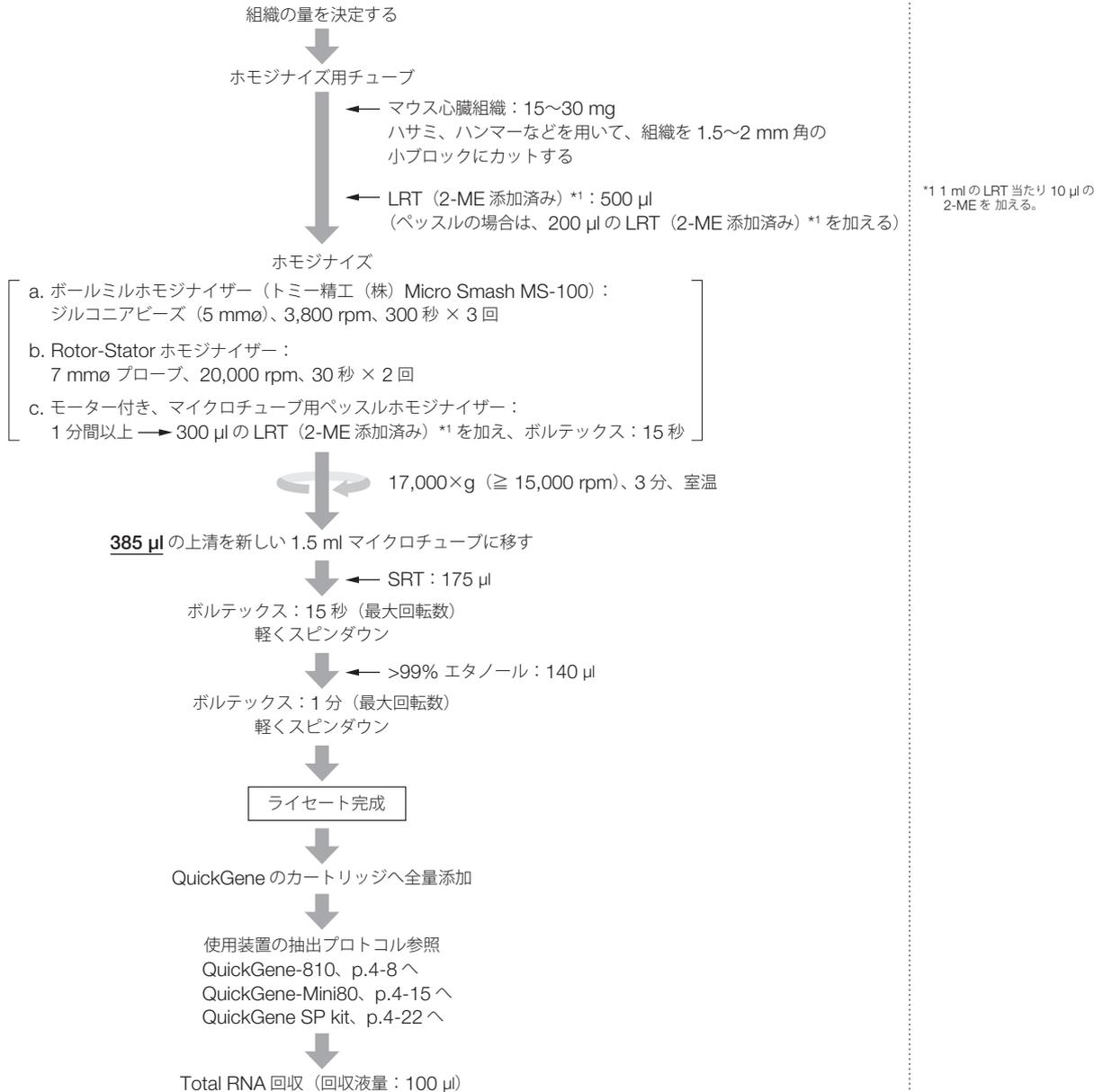
\* 両方とも QuickGene システムで抽出した total RNA に対するデータである。

■ 共通プロトコルサンプル

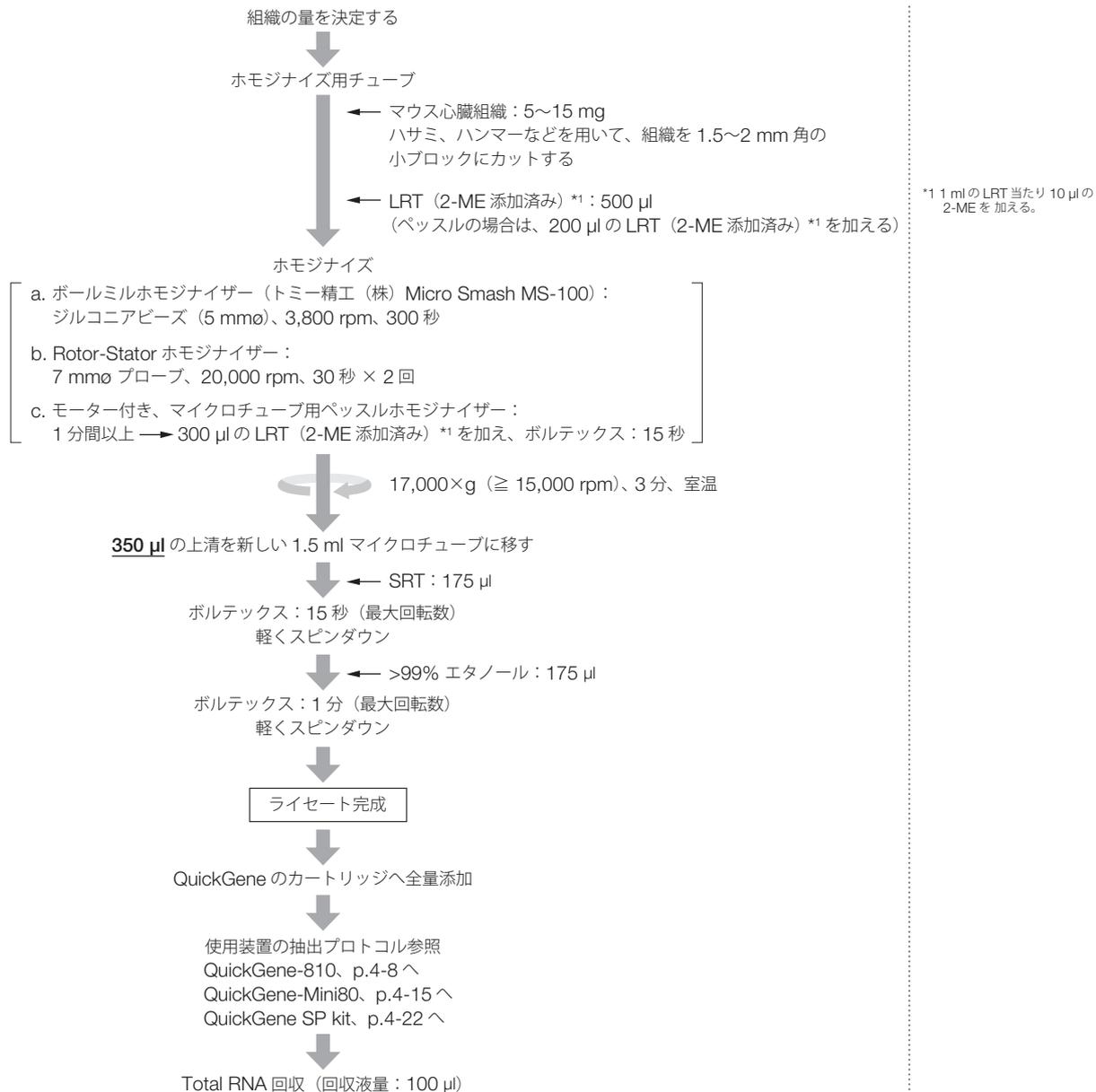
ネコの脂肪組織、イヌの脂肪組織

## マウス心臓からの total RNA 抽出

### プロトコル 1 (15-30 mg)



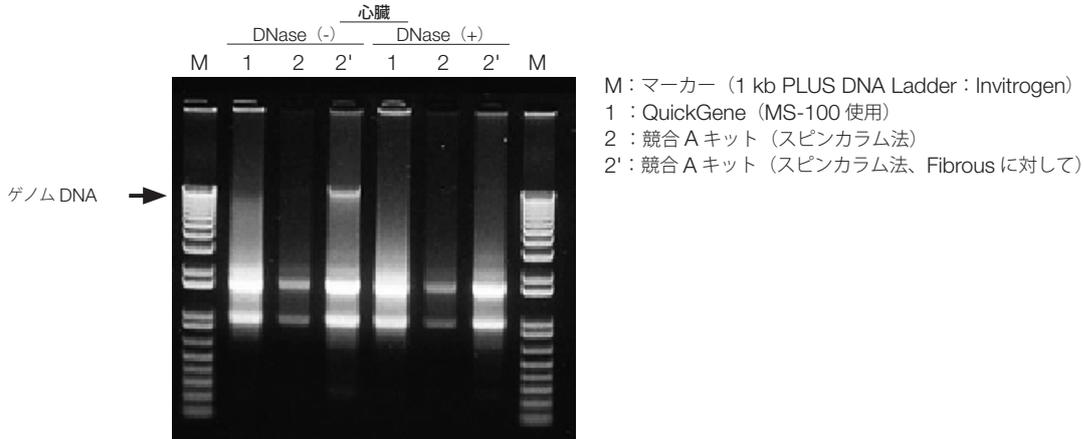
## ■ プロトコル 2 (5-15 mg)



## 結果

### 電気泳動図

Total RNA で、非変性アガロースゲル電気泳動を行った。  
電気泳動条件：1% アガロース / 1 × TAE



心臓に対して、競合 A 社キット (スピнкаラム法) の場合よりもゲノム DNA 混入の少ない total RNA 抽出が QuickGene システムで可能である。

### Total RNA の収量

組織	ボールミルホモジナイザー (MS-100)			Rotor-Stator ホモジナイザー		
	組織の量	DNase (+)	DNase (-)	組織の量	DNase (+)	DNase (-)
心臓	30 mg	21 µg	23 µg	5 mg	4 µg	4 µg

### タンパク質の混入：A260/280

組織	組織の量	A260/280	
		DNase (+)	DNase (-)
心臓	30 mg	2.37	2.33

(ボールミルホモジナイザー使用)

### カオトロピック塩の混入：A260/230

組織	組織の量	A260/230	
		DNase (+)	DNase (-)
心臓	30 mg	2.18	2.16

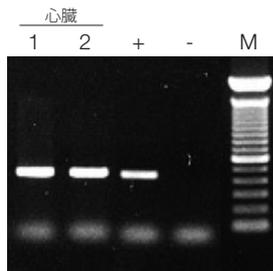
(ボールミルホモジナイザー使用)

### その他

#### • RT-PCR

Total RNA で、RT-PCR を行った。

< RT 反応条件 >  
 テンプレート：マウス心臓からの total RNA (DNase 処理あり) 500 ng  
 酵素：SuperScript II (Invitrogen)  
 < PCR 条件 >  
 テンプレート：Total RNA (10 pg/µl) 相当量の cDNA  
 プライマー：G3PDH プライマー  
 酵素：Takara Taq Hot Start Version (TaKaRa)  
 < 電気泳動条件 >  
 1% アガロース / 1 × TAE



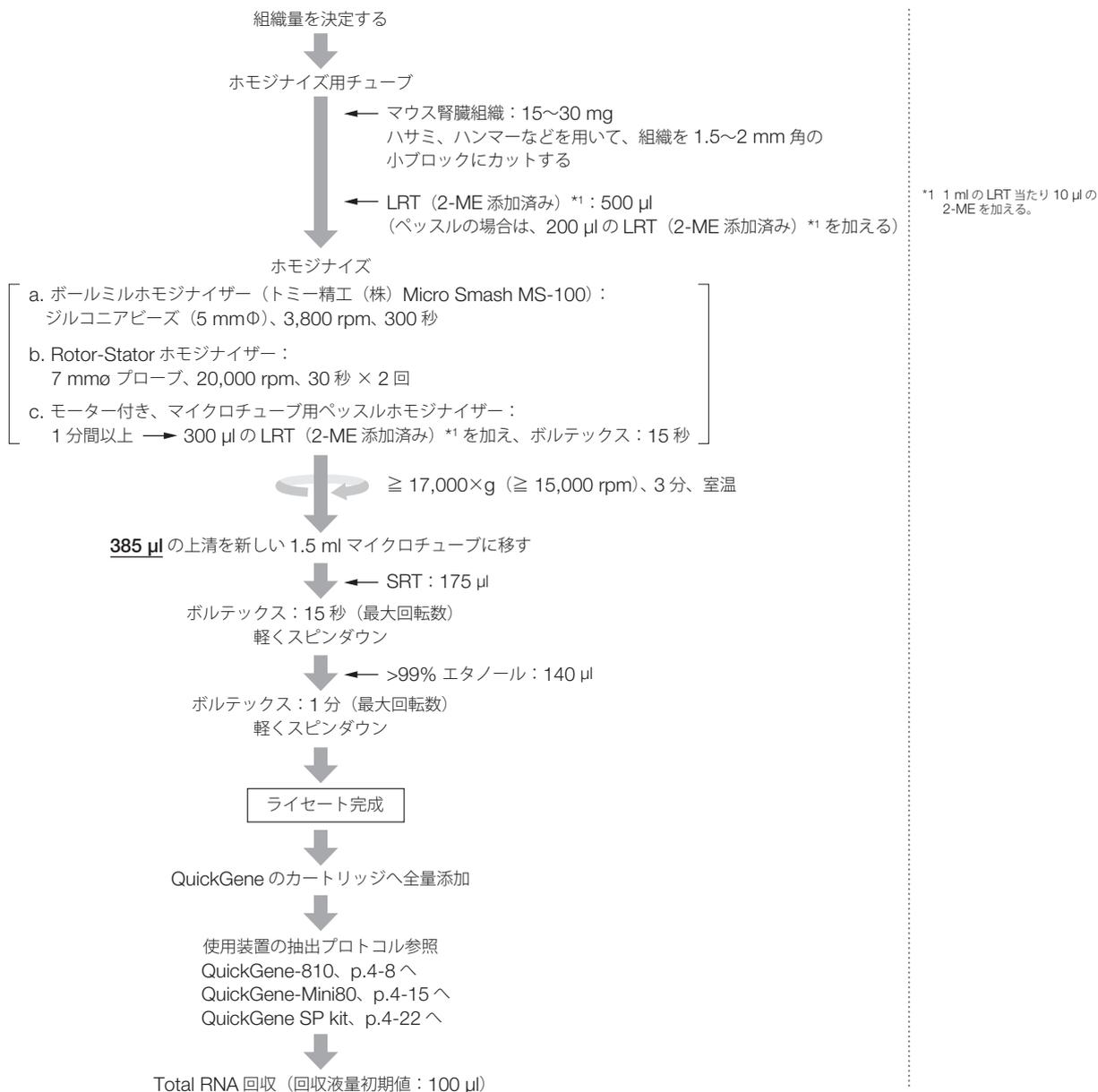
M : マーカー (100 bp DNA Ladder : Invitrogen)  
 1 : QuickGene  
 2 : 競合 A キット (スピнкаラム法)  
 + : ポジティブコントロール (mLiver RNA : Clontech)  
 - : ネガティブコントロール (RNase-free water)

## 共通プロトコルサンプル

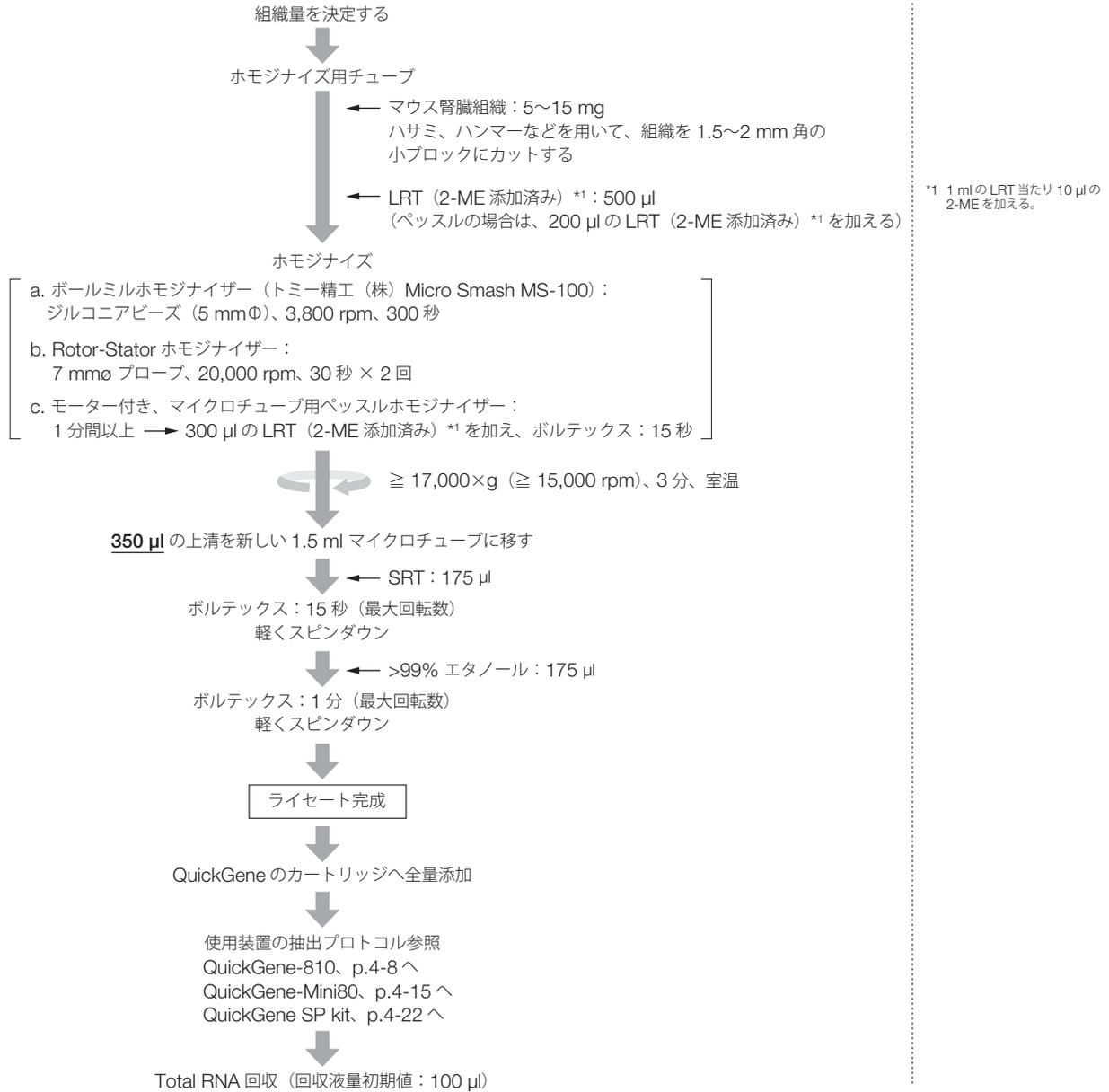
マウス小腸、マウス胃

## マウス腎臓からの total RNA 抽出

### プロトコル 1 (15-30 mg)



プロトコル 2 (5-15 mg)

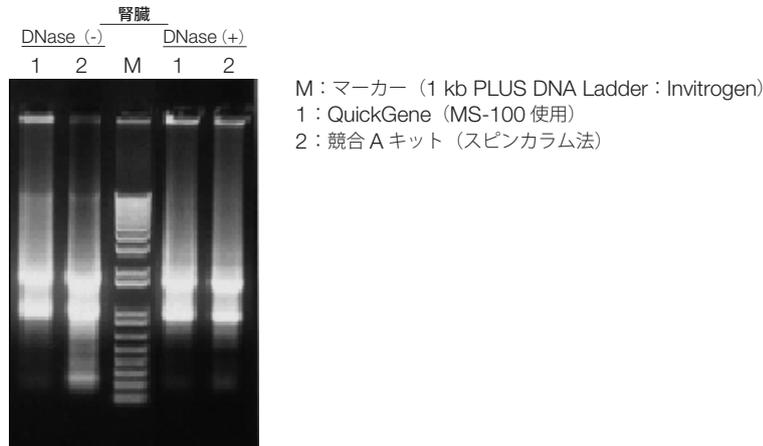


## 結果

### 電気泳動図

QuickGene システム（ボールミルホモジナイザー使用）および競合 A キット（スピнкаラム法）を用いてマウス腎臓組織から抽出された total RNA で、非変性アガロースゲル電気泳動を行った。

電気泳動条件：1% アガロース / 1 × TAE



### Total RNA の収量

組織	ボールミルホモジナイザー（MS-100）			Rotor-Stator ホモジナイザー		
	組織の量	DNase (+)	DNase (-)	組織の量	DNase (+)	DNase (-)
腎臓	30 mg	55 µg	54 µg	5 mg	16 µg	13 µg

### タンパク質の混入：A260/280

組織	組織の量	A260/280	
		DNase (+)	DNase (-)
腎臓	30 mg	2.30	2.17

### カオトロピック塩の混入：A260/230

組織	組織の量	A260/230	
		DNase (+)	DNase (-)
腎臓	30 mg	2.21	2.09

### その他

#### • RT-PCR

QuickGene システム（ボールミルホモジナイザー使用）および競合 A キット（スピнкаラム法）を用いて抽出した total RNA で RT-PCR を行った。

< RT 反応条件 >

テンプレート：マウス腎臓からの total RNA（DNase 処理あり）500 ng

酵素：SuperScript II（Invitrogen）

< PCR 条件 >

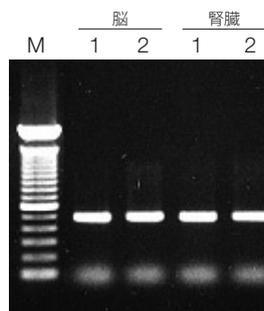
テンプレート：Total RNA（10 pg/µl）相当量の cDNA

プライマー：G3PDH プライマー

酵素：Takara Taq Hot Start Version（TaKaRa）

< 電気泳動条件 >

1% アガロース / 1 × TAE



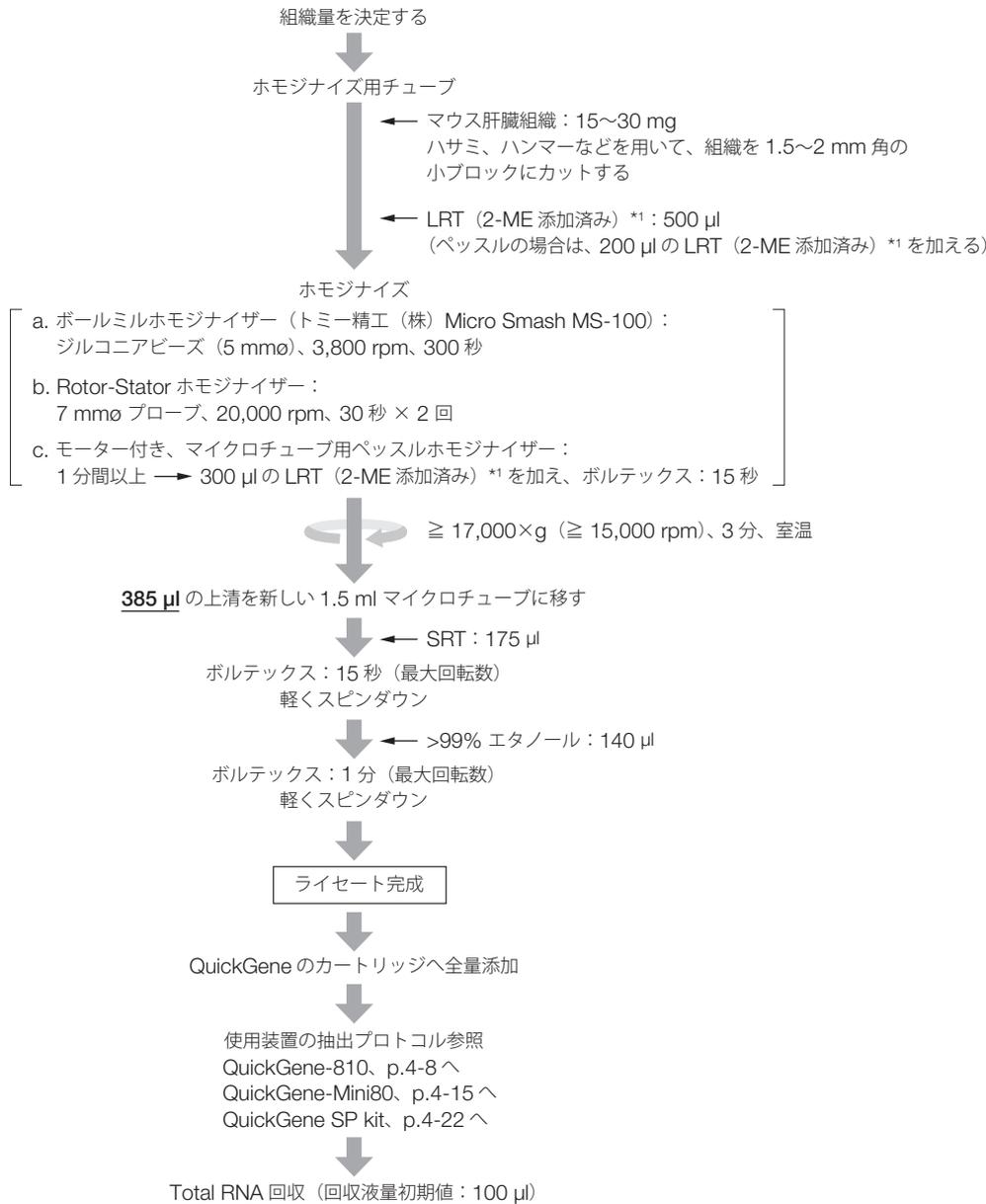
## 共通プロトコルサンプル

マウス精巣、マウス肝臓、マウス脳、マウス肺、マウス脾臓

RA-b-11

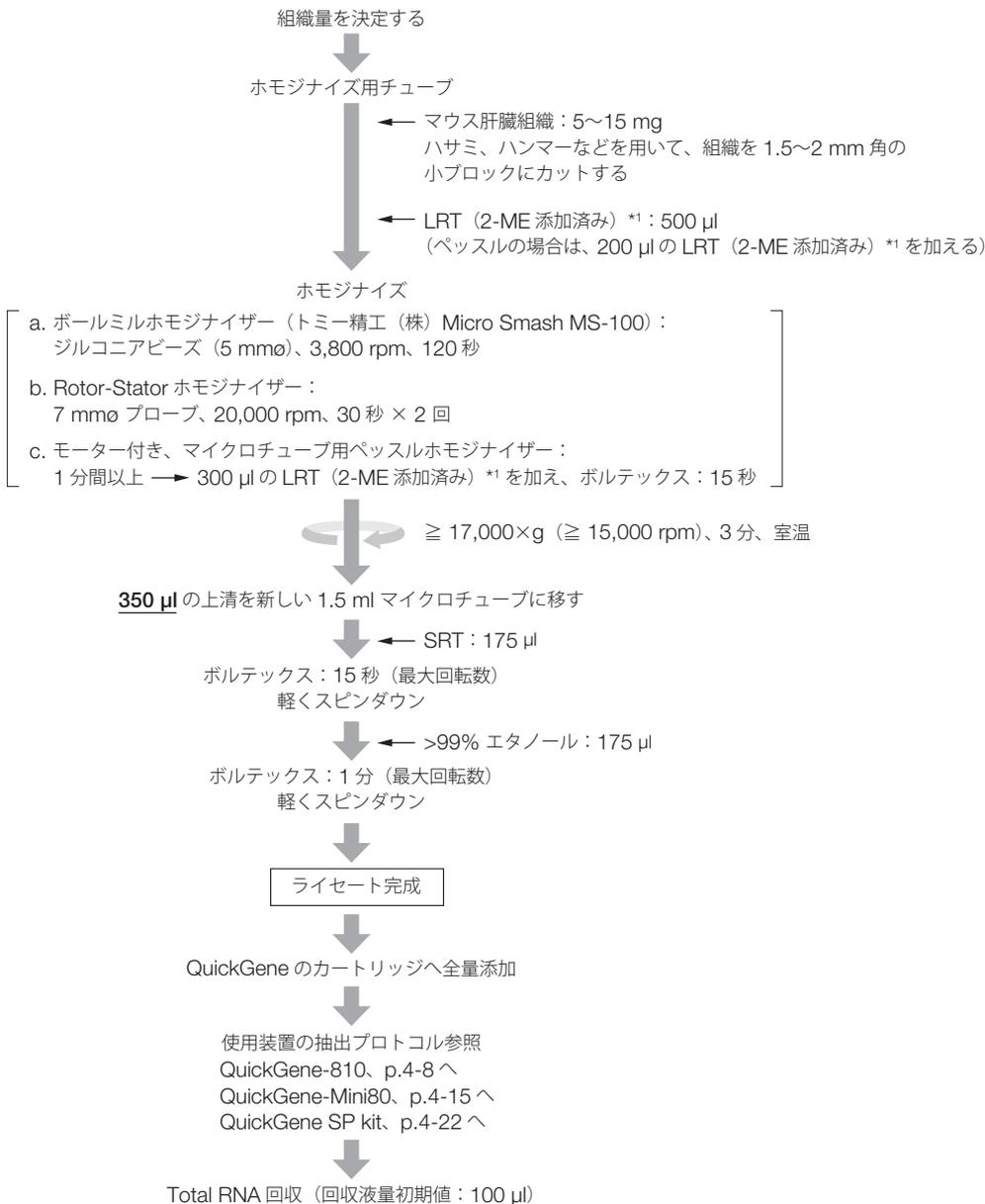
マウス肝臓からの total RNA 抽出

プロトコル 1 (15-30 mg)



\*1 1 ml の LRT 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

## プロトコル 2 (5-15 mg)



\*1 1 ml の LRT 当たり 10  $\mu$ l の 2-ME を加える。

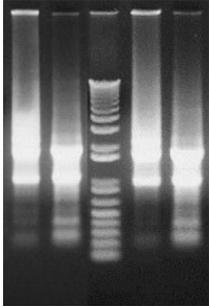
## 結果

### 電気泳動図

QuickGene システム（ボールミルホモジナイザー使用）および競合 A キット（スピнкаラム法）を用いてマウスの肝臓組織から抽出した total RNA で非変性アガロースゲル電気泳動を行った。

電気泳動条件：1% アガロース / 1 × TAE

肝臓  
DNase (-) DNase (+)  
1 2 M 1 2



M：マーカー（1 kb PLUS DNA Ladder：Invitrogen）  
1：QuickGene（MS-100 使用）  
2：競合 A キット（スピнкаラム法）

### Total RNA の収量

組織	ボールミルホモジナイザー（MS-100）			Rotor-Stator ホモジナイザー		
	組織の量	DNase (+)	DNase (-)	組織の量	DNase (+)	DNase (-)
肝臓	5 mg	23 µg	25 µg	5 mg	33 µg	27 µg
	30 mg	122 µg	142 µg	15 mg	54 µg	55 µg

### タンパク質の混入：A260/280

組織	組織の量	A260/280	
		DNase (+)	DNase (-)
肝臓	5 mg	2.24	2.18
	30 mg	2.21	2.20

### カオトロピック塩の混入：A260/230

組織	組織の量	A260/230	
		DNase (+)	DNase (-)
肝臓	5 mg	2.06	1.99
	30 mg	2.21	2.26

### その他

#### • RT-PCR

QuickGene システム（ボールミルホモジナイザー使用）および競合 A キット（スピнкаラム法）を用いて抽出した total RNA で RT-PCR を行った。

< RT 反応条件 >

テンプレート：マウス肝臓からの total RNA（DNase 処理あり）500 ng  
酵素：SuperScript II（Invitrogen）

< PCR 条件 >

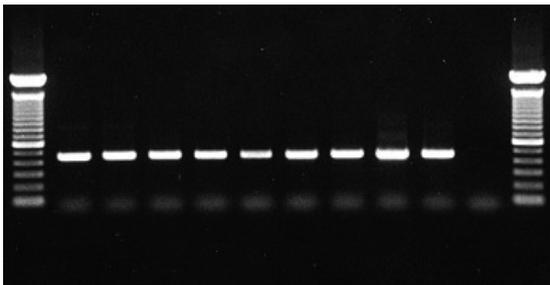
テンプレート：Total RNA（10 µg/µl）相当量の cDNA  
プライマー：G3PDH プライマー

酵素：Takara Taq Hot Start Version（TaKaRa）

< 電気泳動条件 >

1% アガロース / 1 × TAE

肝臓 肺 脾臓 胸腺  
M 1 2 1 2 1 2 1 2 + - M



M：マーカー（100 bp DNA Ladder：Invitrogen）

1：QuickGene

2：競合 A キット（スピнкаラム法）

+：ポジティブコントロール（mLiver RNA：Clontech）

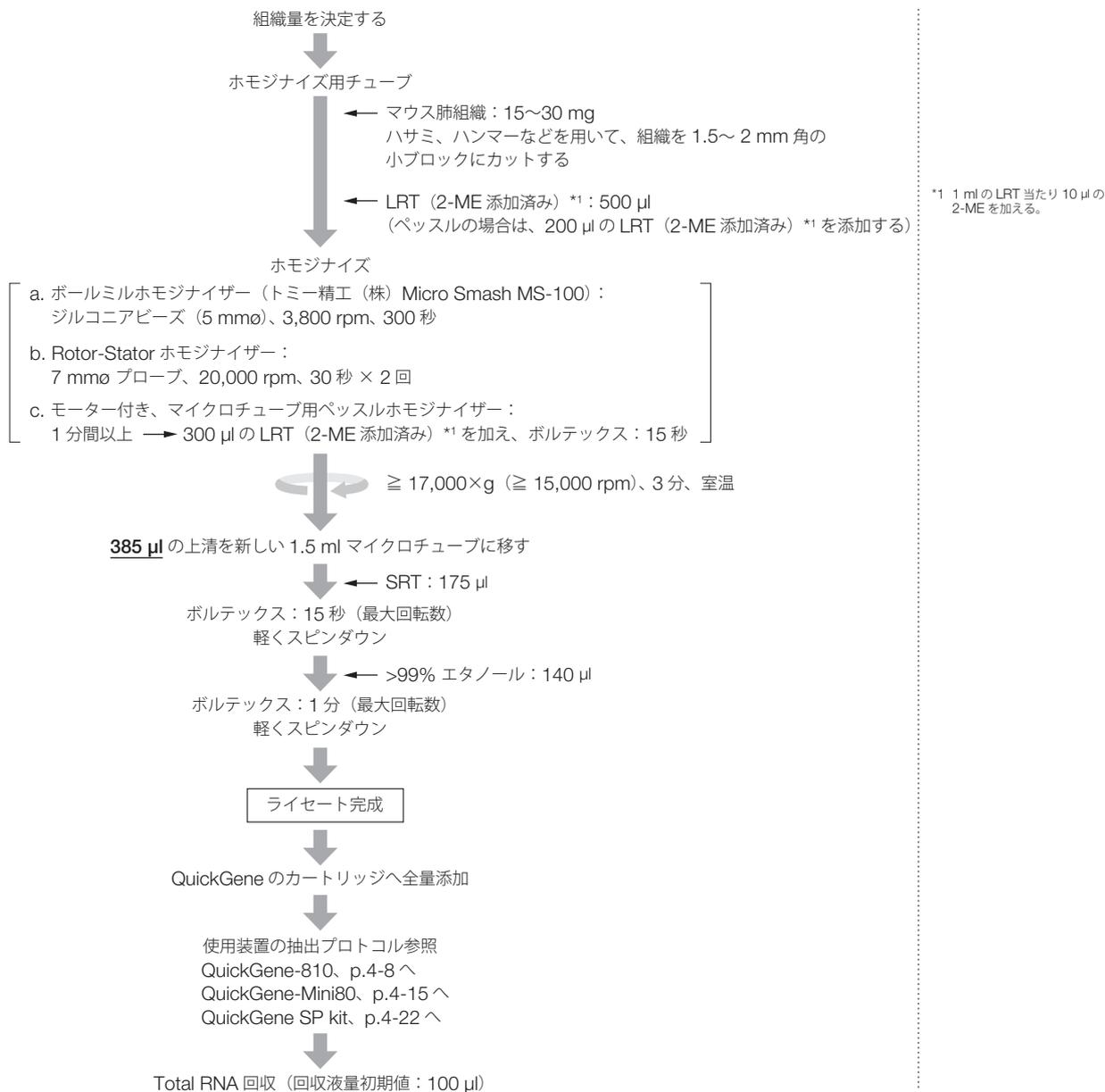
-：ネガティブコントロール（RNase-free water）

## 共通プロトコルサンプル

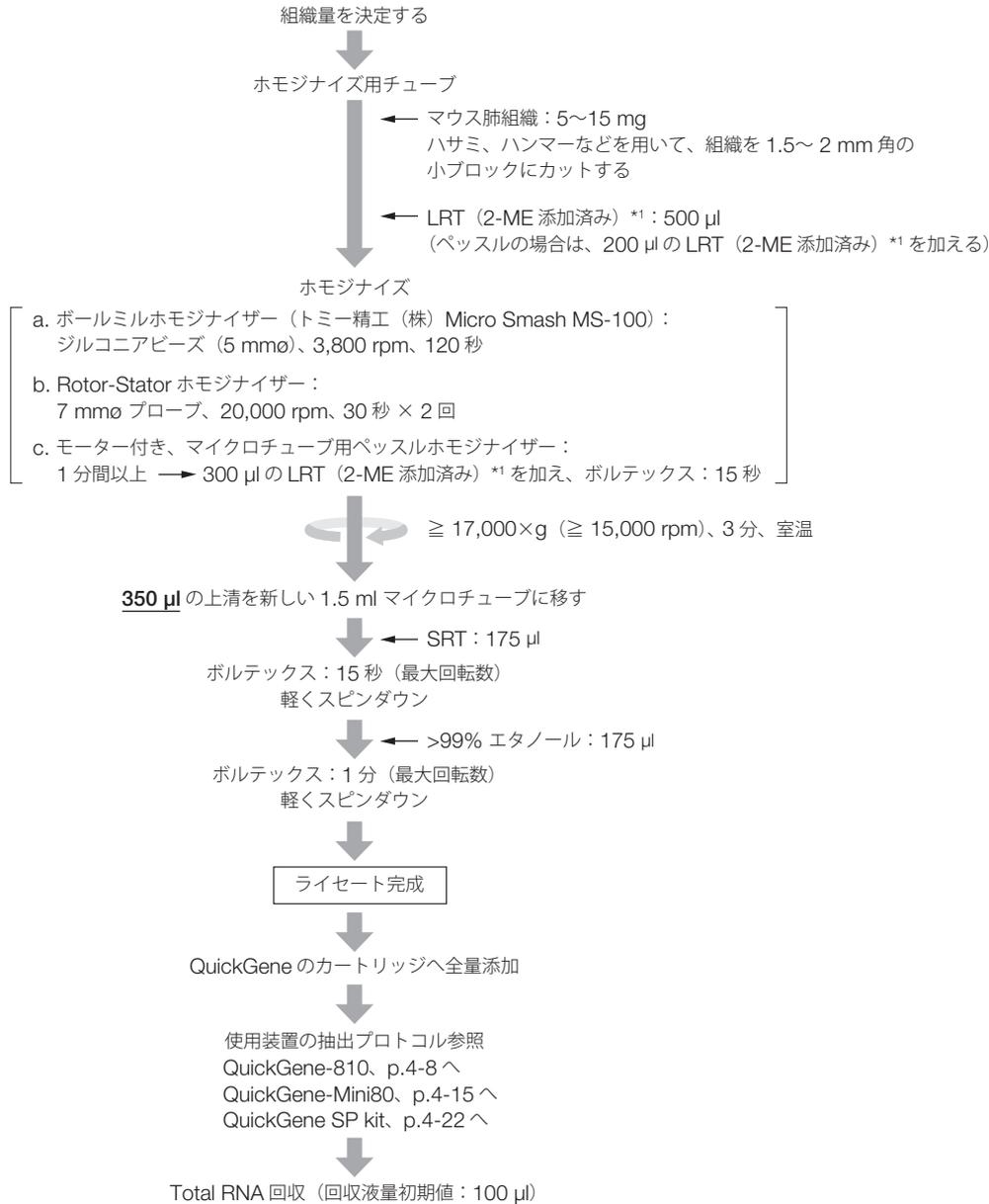
マウス精巣、マウス脳、マウス肺、マウス腎臓、マウス脾臓

## マウス肺からの total RNA 抽出

### プロトコル 1 (15-30 mg)



プロトコル 2 (5-15 mg)



\*1 1 ml の LRT 当たり 10  $\mu$ l の 2-ME を加える。

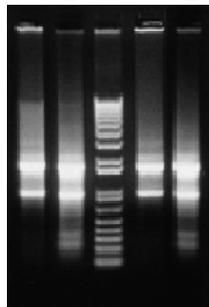
## 結果

### 電気泳動図

QuickGene システム（ボールミルホモジナイザー使用）および競合 A キット（スピнкаラム法）を用いてマウスの肺組織から抽出した total RNA で非変性アガロースゲル電気泳動を行った。

電気泳動条件：1% アガロース / 1 × TAE

肺  
DNase(-) DNase(+)  
1 2 M 1 2



M：マーカー（1 kb PLUS DNA Ladder：Invitrogen）

1：QuickGene（MS-100 使用）

2：競合 A キット（スピнкаラム法）

### Total RNA の収量

組織	ボールミルホモジナイザー（MS-100）			Rotor-Stator ホモジナイザー		
	組織の量	DNase (+)	DNase (-)	組織の量	DNase (+)	DNase (-)
肺	30 mg	29 µg	28 µg	15 mg	7 µg	7 µg

### タンパク質の混入：A260/280

組織	組織の量	A260/280	
		DNase (+)	DNase (-)
肺	30 mg	2.18	2.19

### カオトロピック塩の混入：A260/230

組織	組織の量	A260/230	
		DNase (+)	DNase (-)
肺	30 mg	2.16	2.05

### その他

#### • RT-PCR

QuickGene システム（ボールミルホモジナイザー使用）および競合 A キット（スピнкаラム法）を用いて抽出した total RNA で RT-PCR を行った。

< RT 反応条件 >

テンプレート：マウス肺からの total RNA（DNase 処理あり）500 ng

酵素：SuperScript II（Invitrogen）

< PCR 条件 >

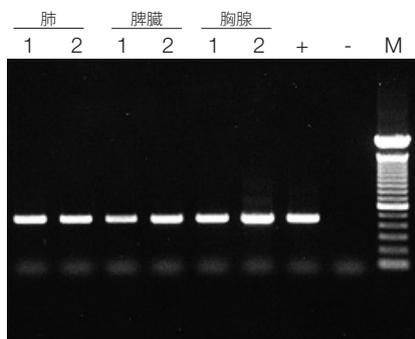
テンプレート：Total RNA（10 pg/µl）相当量の cDNA

プライマー：G3PDH プライマー

酵素：Takara Taq Hot Start Version（TaKaRa）

< 電気泳動条件 >

1% アガロース / 1 × TAE



M：マーカー（100 bp DNA Ladder：Invitrogen）

1：QuickGene

2：競合 A キット（スピнкаラム法）

+：ポジティブコントロール（mLiver RNA：Clontech）

-：ネガティブコントロール（RNase- フリー水）

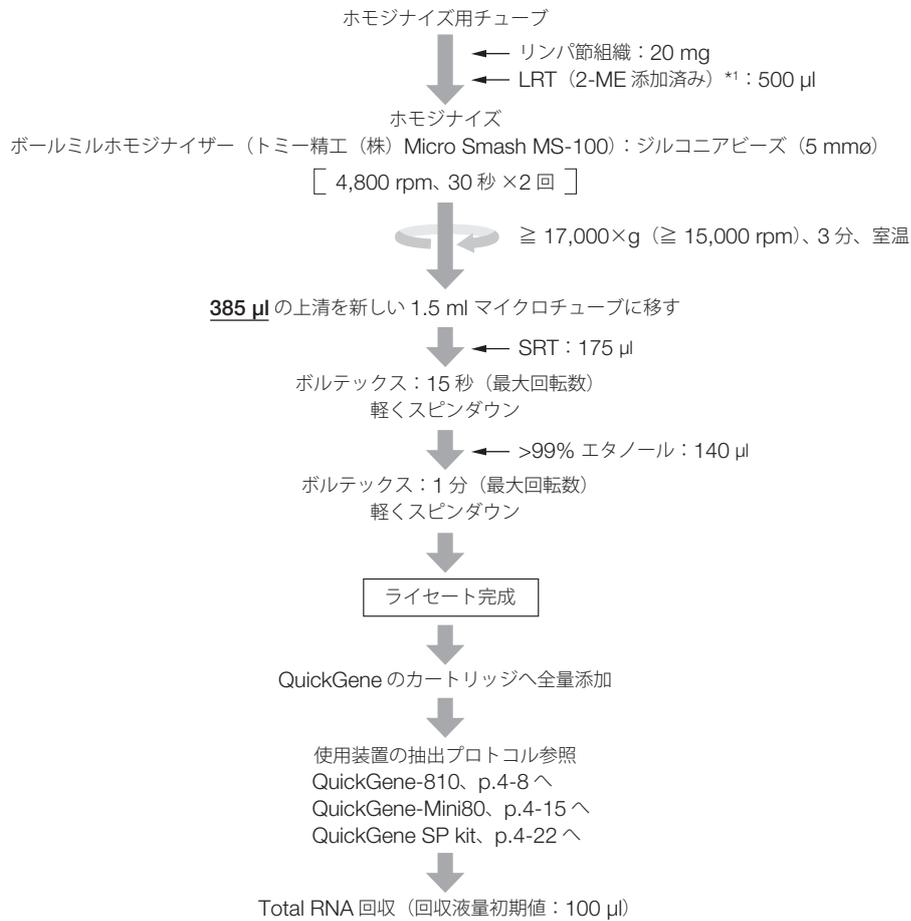
## 共通プロトコルサンプル

マウス精巣、マウス肝臓、マウス脳、マウス腎臓、マウス脾臓

RA-b-13

マウスリンパ節からの total RNA 抽出

プロトコル



\*1 1 ml の LRT 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

結果

電気泳動図

データなし

Total RNA の収量

リンパ節の量	収量 (µg)
20 mg	6.8

タンパク質の混入：A260/280

リンパ節の量	A260/280
20 mg	2.0

カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

その他

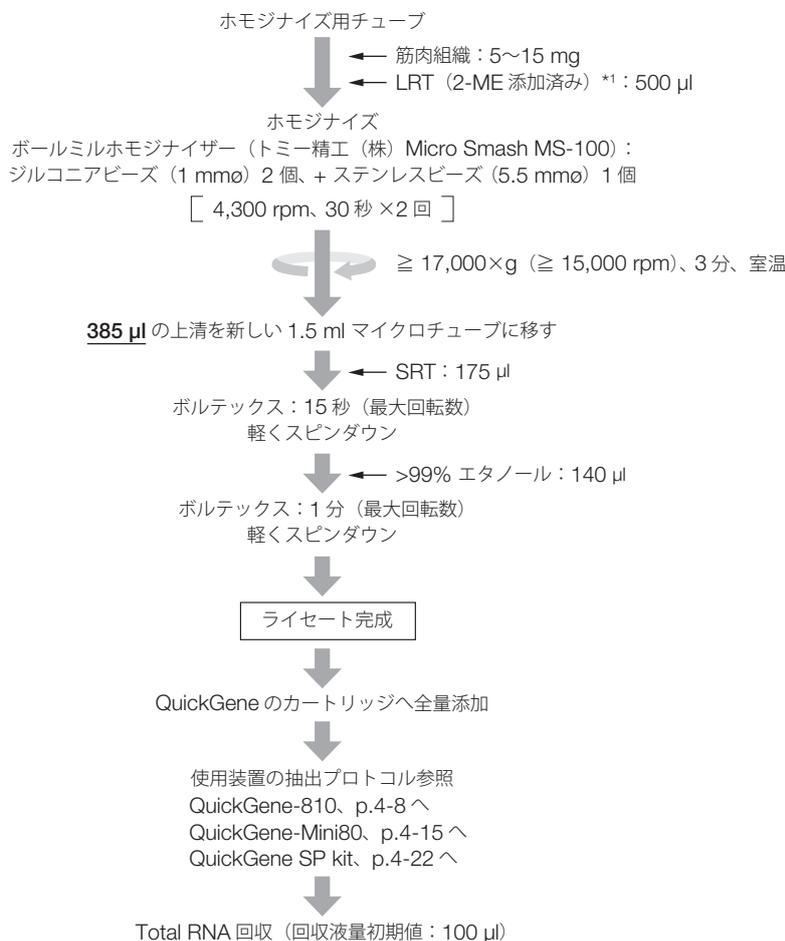
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

## ラット筋肉からの total RNA 抽出

### プロトコル



\*1 1 ml の LRT 当たり 10  $\mu$ l の 2-ME を加える。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### Total RNA の収量

筋肉の量	収量 ( $\mu$ g)
8.8 mg	2.0

#### タンパク質の混入：A260/280

データなし

#### カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

#### その他

データなし

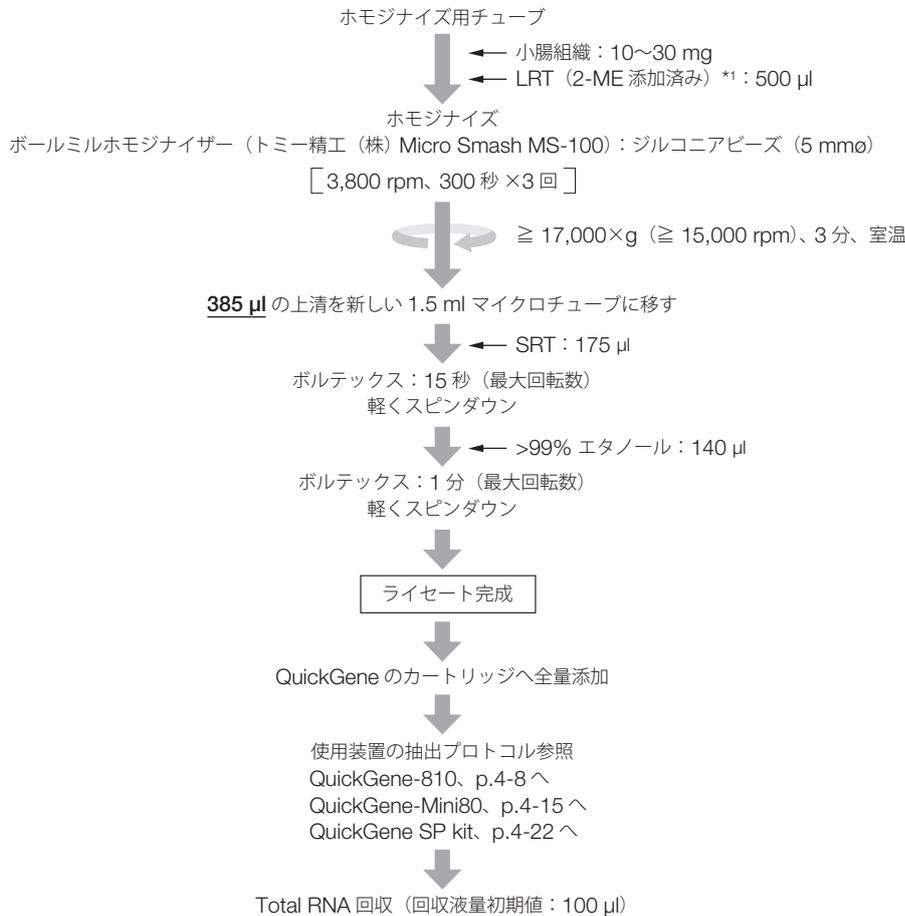
### 共通プロトコルサンプル

データなし

RA-b-15

マウス小腸からの total RNA 抽出

■ プロトコル



\*1 1 ml の LRT 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

RA-b-15

■ 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ Total RNA の収量

小腸の量	収量 (µg)
14.7 mg	4.4

■ タンパク質の混入：A260/280

小腸の量	A260/280
14.7 mg	2.01

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

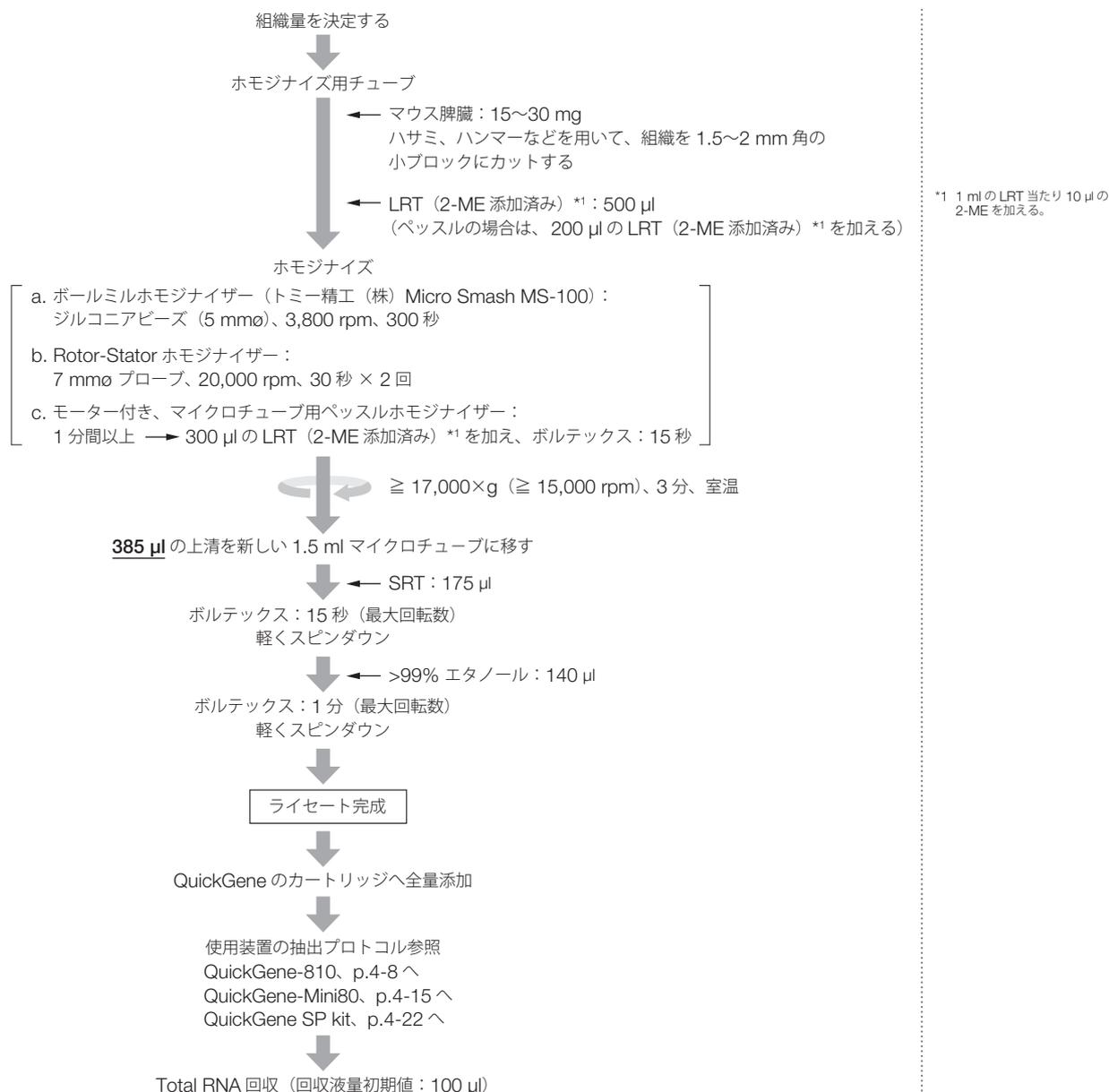
データなし

■ 共通プロトコルサンプル

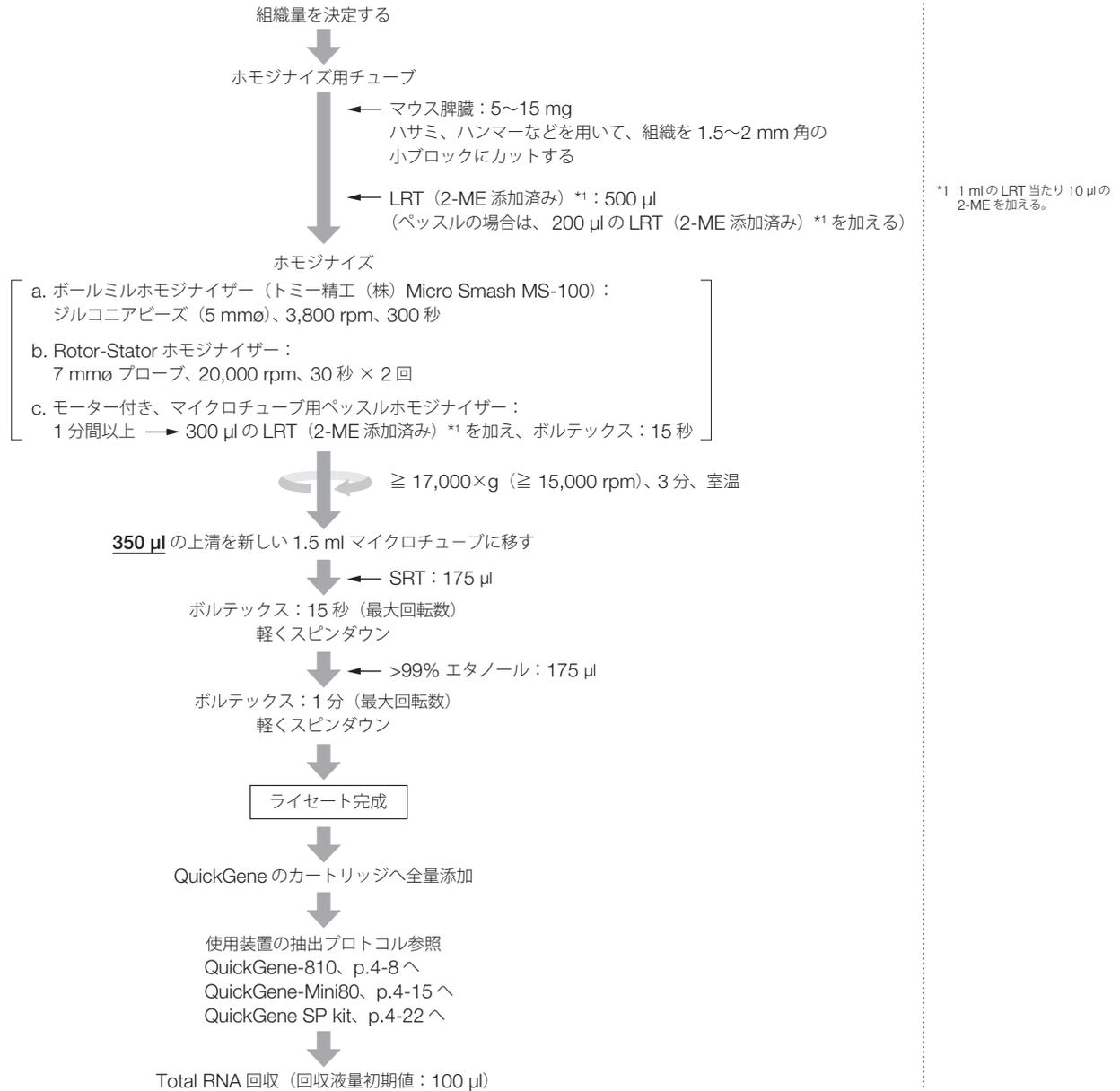
マウス心臓

## マウス脾臓からの total RNA 抽出

### プロトコル 1 (15-30 mg)



プロトコル 2 (5-15 mg)

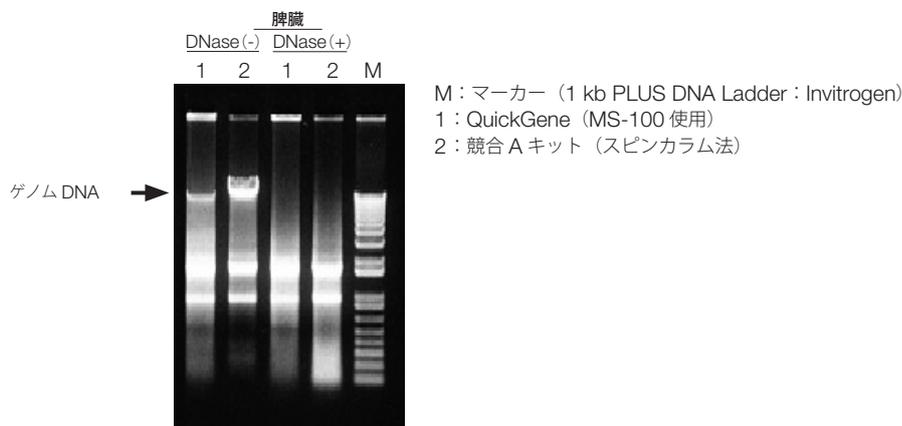


## 結果

### 電気泳動図

QuickGene システム（ボールミルホモジナイザー使用）および競合 A キット（スピнкаラム法）を用いて、マウスの脾臓組織から抽出した total RNA で非変性アガロースゲル電気泳動を行った。

電気泳動条件：1% アガロース / 1 × TAE



### Total RNA の収量

組織	ボールミルホモジナイザー（MS-100）			Rotor-Stator ホモジナイザー		
	組織の量	DNase (+)	DNase (-)	組織の量	DNase (+)	DNase (-)
脾臓	30 mg	48 µg	54 µg	20 mg	32 µg	31 µg

### タンパク質の混入：A260/280

組織	組織の量	A260/280	
		DNase (+)	DNase (-)
脾臓	30 mg	2.05	2.30

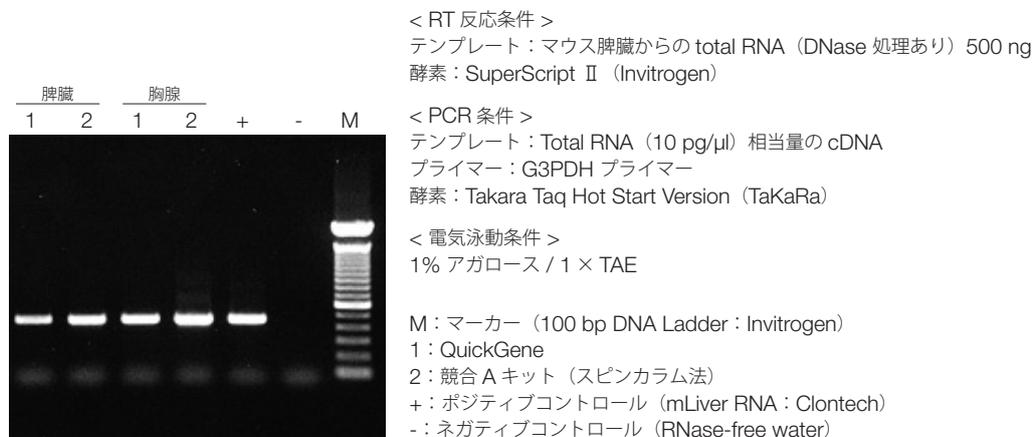
### カオトロピック塩の混入：A260/230

組織	組織の量	A260/230	
		DNase (+)	DNase (-)
脾臓	30 mg	2.23	2.09

### その他

#### ● RT-PCR

QuickGene システム（ボールミルホモジナイザー使用）および競合 A キット（スピнкаラム法）を用いて抽出した total RNA で RT-PCR を行った。



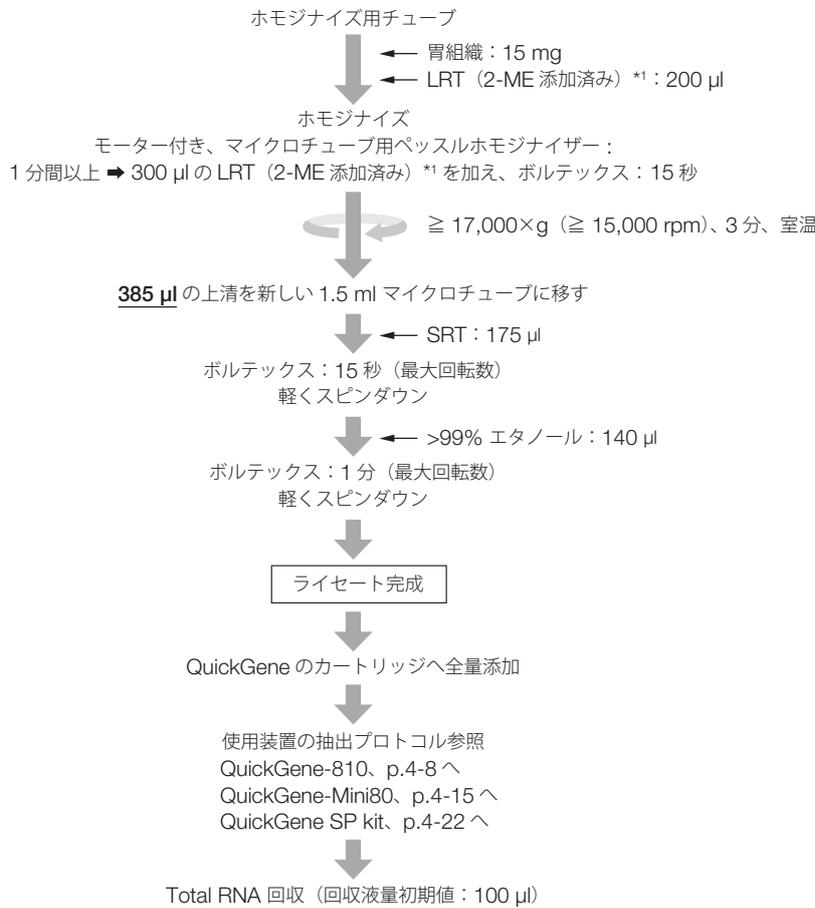
## 共通プロトコルサンプル

マウス精巣、マウス肝臓、マウス脳、マウス肺、マウス腎臓

RA-b-17

ヒトの胃からの total RNA 抽出

プロトコル



\*1 1 ml の LRT 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

結果

■ 電気泳動図

データなし

■ Total RNA の収量

胃の量	収量 (µg)
15 mg	2.0

■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

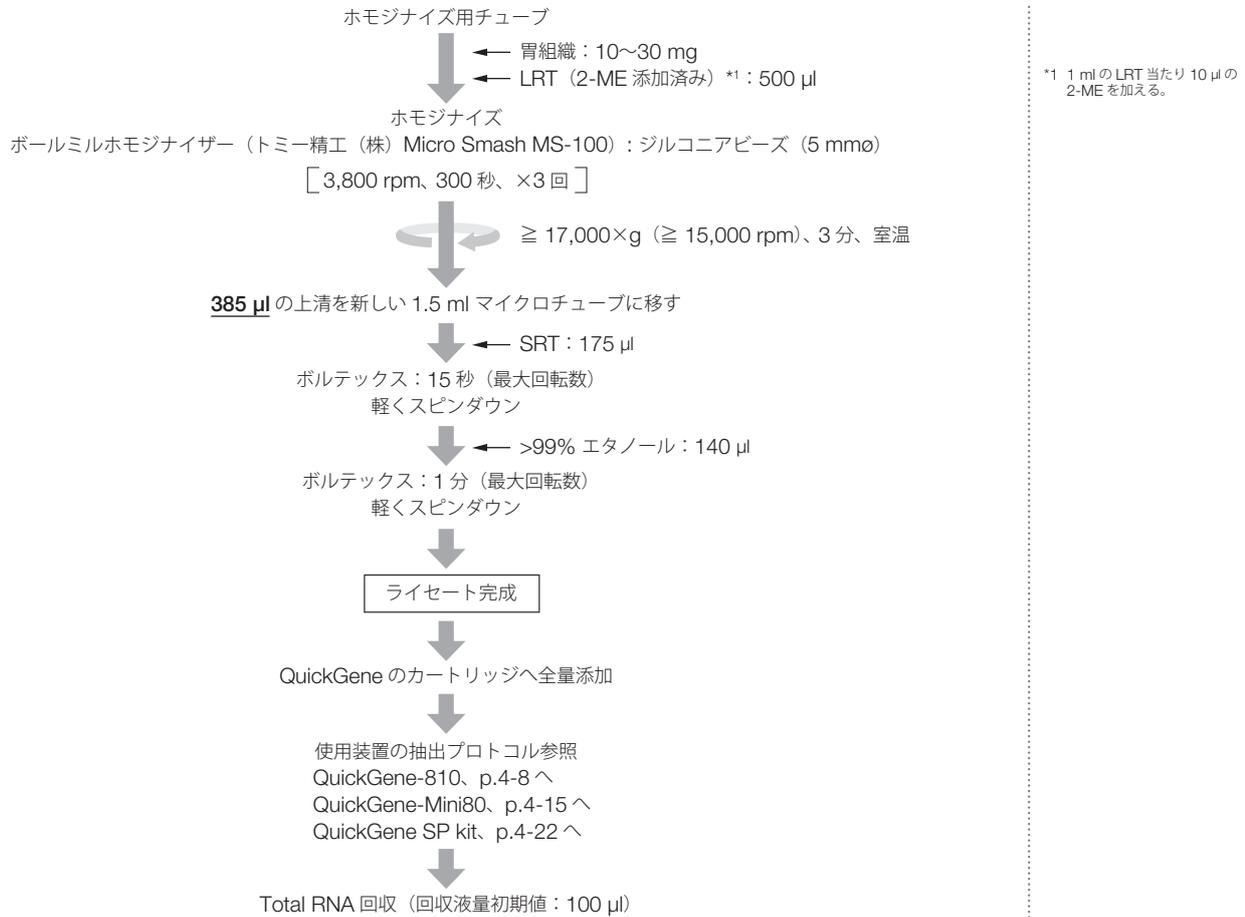
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

## マウス胃からの total RNA 抽出

### プロトコル



### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### Total RNA の収量

胃の量	収量 (µg)
11.1 mg	12.6

#### タンパク質の混入：A260/280

胃の量	A260/280
11.1 mg	2.06

#### カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

#### その他

データなし

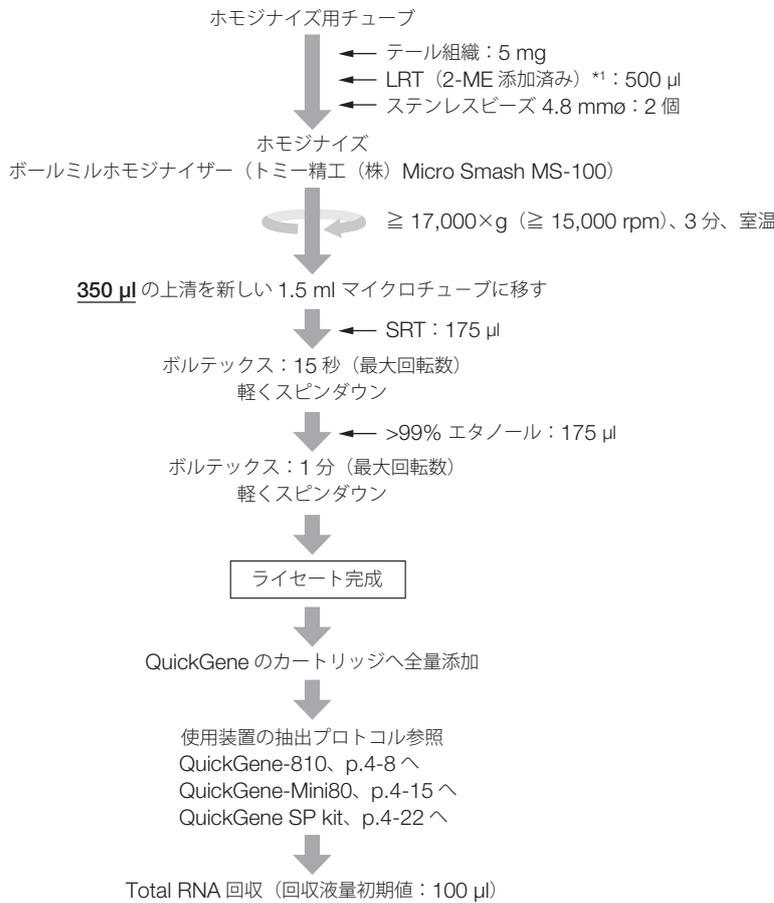
### 共通プロトコルサンプル

マウス心臓

RA-b-19

マウス尾からの total RNA 抽出

プロトコル



\*1 1 ml の LRT 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

RA-b-19

結果

電気泳動図

データなし

Total RNA の収量

テールの量	収量 (µg)
約 5 mg	4.0

タンパク質の混入 : A260/280

テールの量	A260/280
約 5 mg	2.36

カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

その他

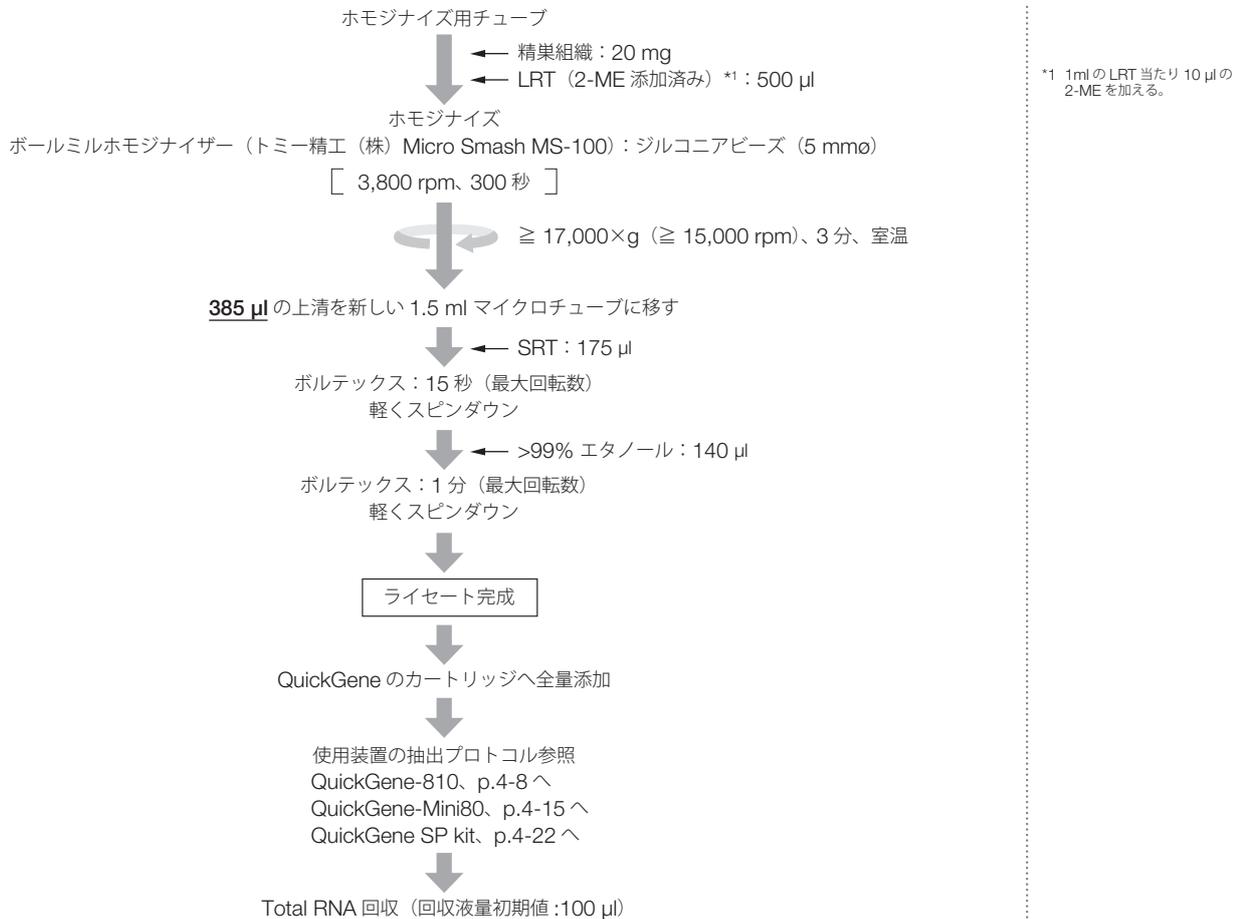
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

## マウス精巢からの total RNA 抽出

### プロトコル



### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### Total RNA の収量

精巣の量	収量 (µg)
20 mg	20

#### タンパク質の混入：A260/280

精巣の量	A260/280
20 mg	2.0

#### カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

#### その他

データなし

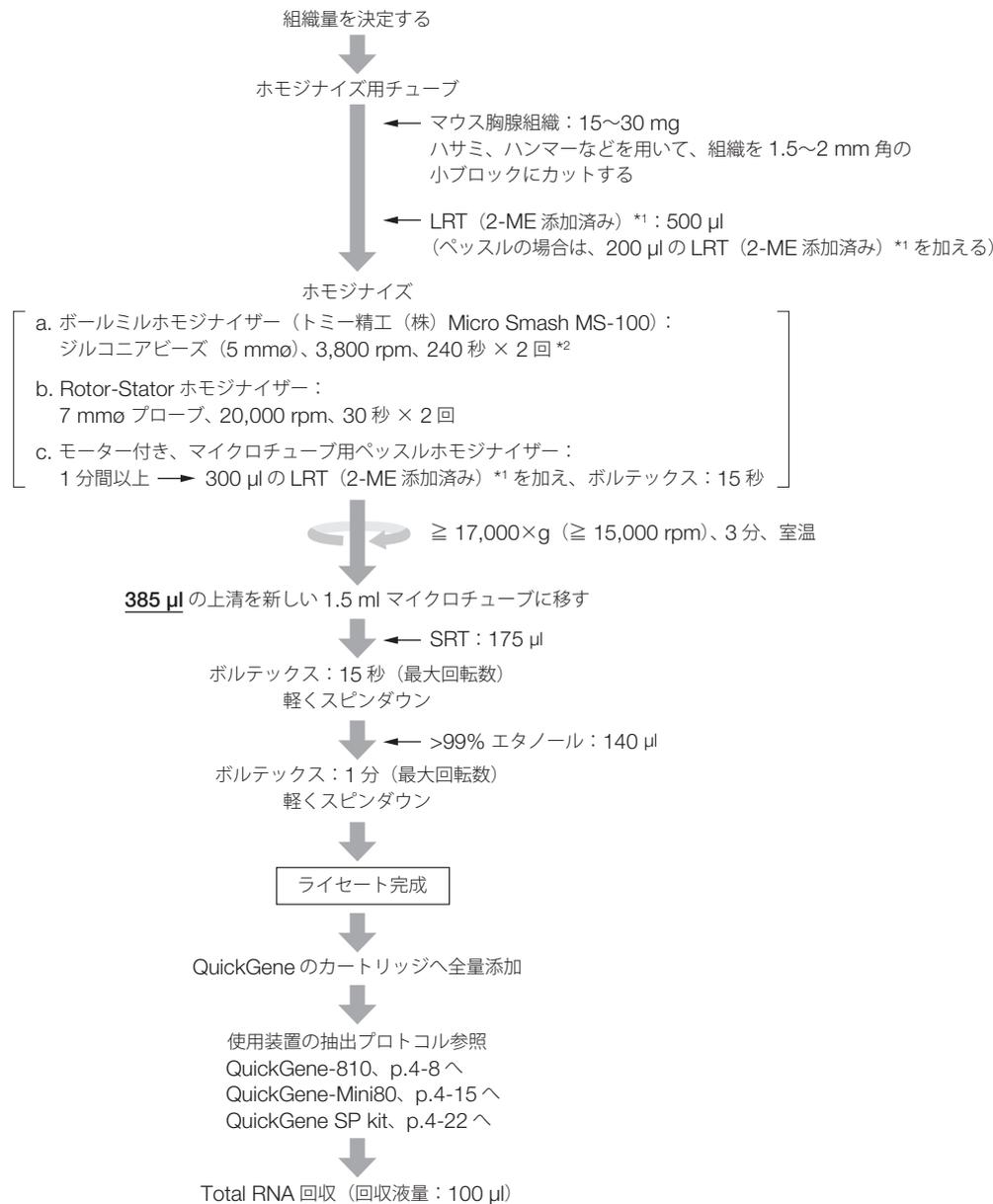
### 共通プロトコルサンプル

マウス肝臓、マウス脳、マウス肺、マウス腎臓、マウス脾臓

RA-b-21

マウス胸腺からの total RNA 抽出

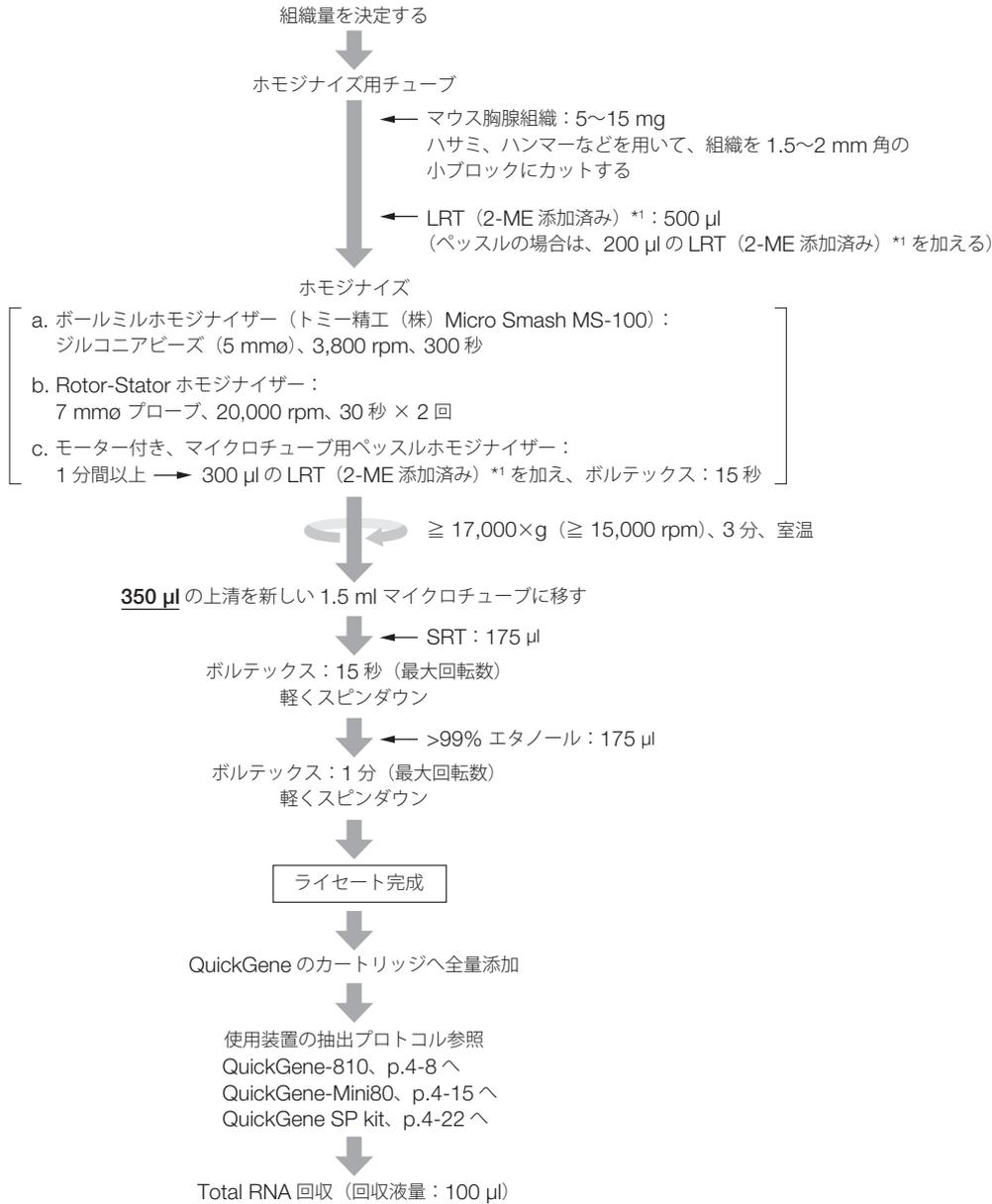
プロトコル 1 (15-30 mg)



\*1 1 ml の LRT 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

\*2 胸腺の場合は、トミー Micro Smash MS-100R (クーラー付き) の方が、MS-100 に比べて収量が上がります。

## プロトコル 2 (5-15 mg)

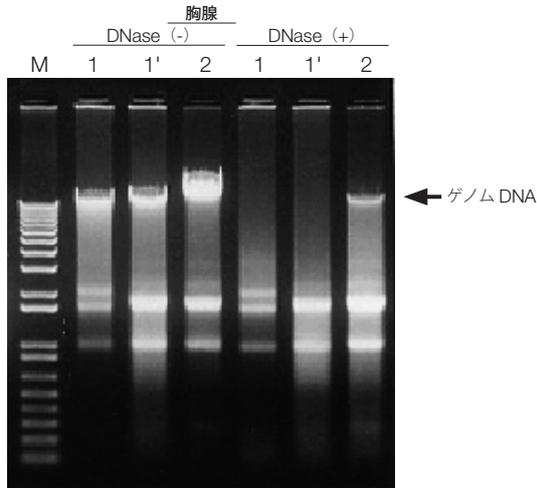


\*1 1 ml の LRT 当たり 10  $\mu$ l の 2-ME を加える。

## 結果

### 電気泳動図

Total RNA で非変性アガロースゲル電気泳動を行った。  
電気泳動条件：1% アガロース / 1 × TAE



M：マーカー（1 kb PLUS DNA Ladder：Invitrogen）  
1：QuickGene（MS-100 使用）  
1'：QuickGene（MS-100R（クーラー付き）使用）  
2：競合 A キット（スピнкаラム法）

胸腺などに対して、QuickGene システムで、競合 A キット（スピнкаラム法）の場合よりもゲノム DNA 混入の少ない total RNA の抽出ができる。

### Total RNA の収量

組織	ボールミルホモジナイザー（MS-100）			Rotor-Stator ホモジナイザー		
	組織の量	DNase (+)	DNase (-)	組織の量	DNase (+)	DNase (-)
胸腺	30 mg	43 µg	27 µg	5 mg	19 µg	17 µg

### タンパク質の混入：A260/280

組織	組織の量	A260/280	
		DNase (+)	DNase (-)
胸腺	30 mg	2.17	2.17

### カオトロピック塩の混入：A260/230

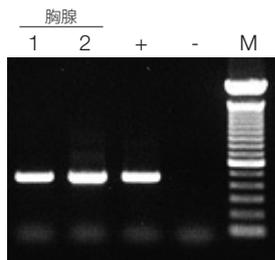
組織	組織の量	A260/230	
		DNase (+)	DNase (-)
胸腺	30 mg	2.15	2.17

### その他

#### • RT-PCR

Total RNA で RT-PCR を行った。

< RT 反応条件 >  
 テンプレート：マウス胸腺からの total RNA（DNase 処理あり）500 ng  
 酵素：SuperScript II（Invitrogen）  
 < PCR 条件 >  
 テンプレート：Total RNA（10 pg/µl）相当量の cDNA  
 プライマー：G3PDH プライマー  
 酵素：Takara Taq Hot Start Version（TaKaRa）  
 < 電気泳動条件 >  
 1% アガロース / 1 × TAE



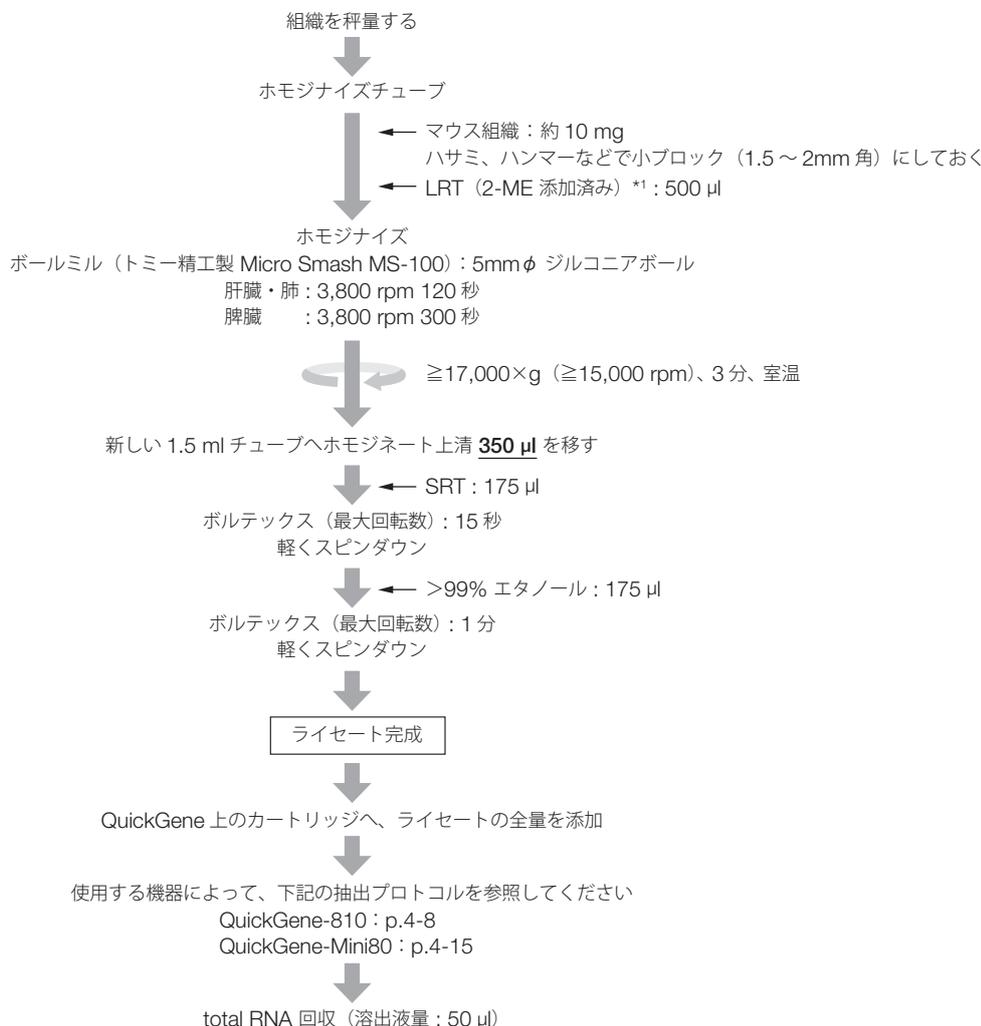
M：マーカー（100 bp DNA Ladder：Invitrogen）  
 1：QuickGene  
 2：競合 A キット（スピнкаラム法）  
 +：ポジティブコントロール（mLiver RNA：Clontech）  
 -：ネガティブコントロール（RNase-free water）

## 共通プロトコルサンプル

データなし

# DNA チップ“ジェノパール®”※のためのマウス組織からの total RNA 抽出

## プロトコル

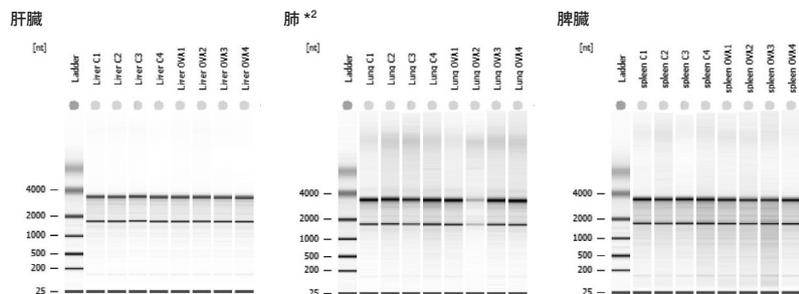


\*1 1 ml の LRT に対して、10 µl の 2-ME を添加してください

## 結果

### 電気泳動図

QuickGene システム（ボールミル型ホモジナイザー使用）を用いて各マウス組織から total RNA を抽出した。



2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.)

\*2 2 サンプル分を抽出し、あわせて後、濃縮した結果

※ “ジェノパール®” は、三菱レイヨン株式会社の登録商標です。

## total RNA の収量

組織	収量 (μg)							
	C1	C2	C3	C4	OVA1	OVA2	OVA3	OVA4
肝臓	65.9	56.2	59.5	72.2	63.0	50.6	69.7	96.1
肺 *3	10.6	5.1	4.9	8.1	9.3	2.5	6.2	6.2
脾臓	33.2	23.6	40.8	30.0	27.6	24.5	32.2	47.4

\*3 2 サンプル分を抽出し、あわせて後、濃縮した結果

## タンパク質の混入：A260/280

データなし

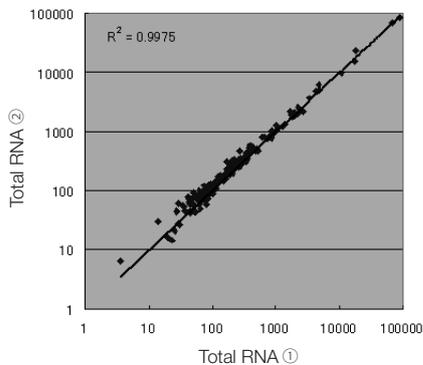
## カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

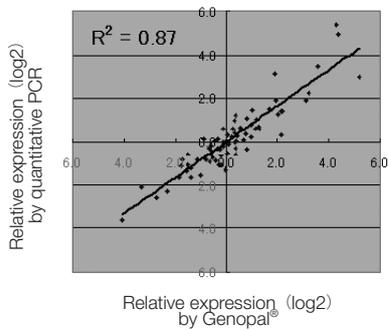
## その他

### ● “ジェノパール®” 解析

マウス 209 遺伝子を搭載した三菱レイヨン製マウス版アレルギーチップ ARIM-GX を用いて、標準プロトコルに従って、マウス各サンプルの各遺伝子の蛍光強度を測定し、各群間の発現差 (log<sub>2</sub> ratio) を算出した。



同一の組織サンプルからそれぞれ抽出した total RNA を用いて調製した aRNA の “ジェノパール®” による解析データは、高い再現性を示した (R<sup>2</sup>=0.99 以上)。



アレルギーチップ “ジェノパール®” と定量 PCR により得られた発現差の数値データ (log<sub>2</sub> ratio) は、高い相関を示した (R<sup>2</sup>=0.87)。

## 共通プロトコルサンプル

データなし

※ “ジェノパール®” は、三菱レイヨン株式会社の登録商標です。



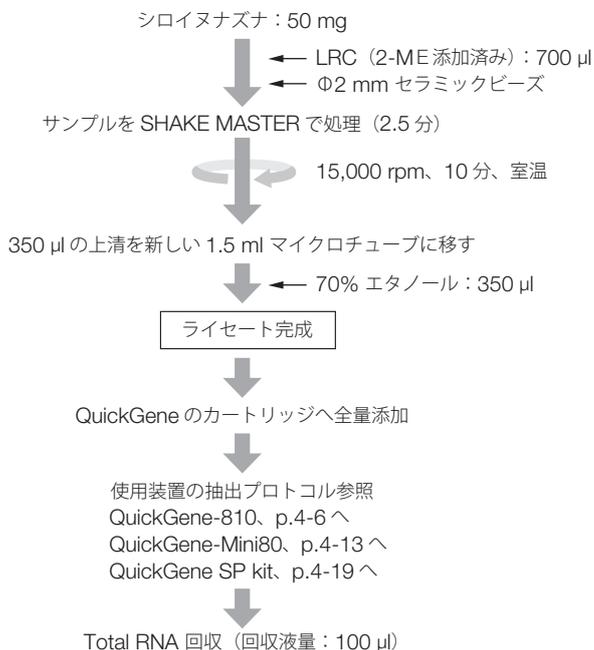
## 3-XII 章

### 植物組織からの total RNA抽出

---

## シロイヌナズナからの total RNA 抽出

### プロトコル



### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ Total RNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

データなし

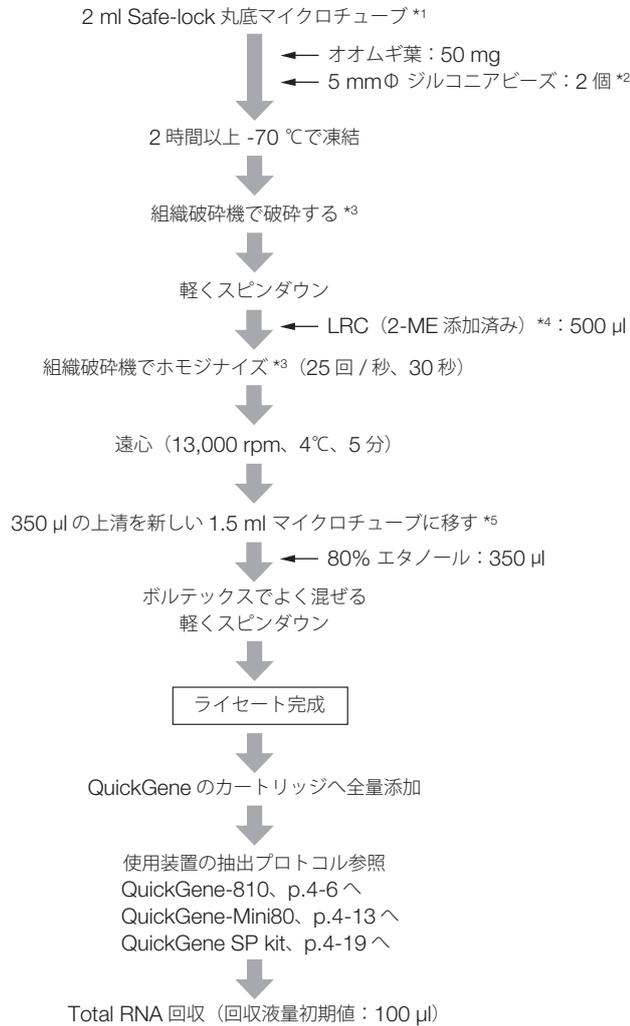
### 共通プロトコルサンプル

データなし

RB-2

オオムギ葉からの total RNA 抽出

プロトコル



\*1 エッペンドルフ社 (Eppendorf Co.Ltd.)

\*2 ニッカトー社 (NIKKATO Co.Ltd.)

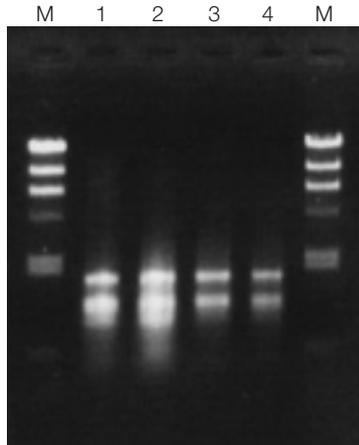
\*3 ティッシュライザー (Tissue-Lyser) (Mixer MIH 3000 (QIAGEN Co.Ltd.)) 組織破砕機のホルダーを、前もって -20°C に冷却してください。破砕法については、組織破砕機のマニュアルに従ってください。

\*4 1 ml の LRC 当たり 10 µl の 2-ME を加えてください。

\*5 繊維が多少混じていても結果に影響はありません。

## 結果

### 電気泳動図



電気泳動条件  
0.8% アガロースゲル  
TAE  
2  $\mu$ l のサンプル / ウエル

M:  $\lambda$ -Hind III (100 ng)  
1: コムギ葉 (*gramineae*)  
2: オオムギ葉 (*gramineae*)  
3: *Chenopodium quinoa* 葉 (*Chenopodiaceae*)  
4: *Nicotiana benthamiana* 葉 (*solanaceae*)

### Total RNA の収量

オオムギ葉	12.2 $\mu$ g
-------	--------------

### タンパク質の混入：A260/280

オオムギ葉	2.12
-------	------

### カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

### その他

データなし

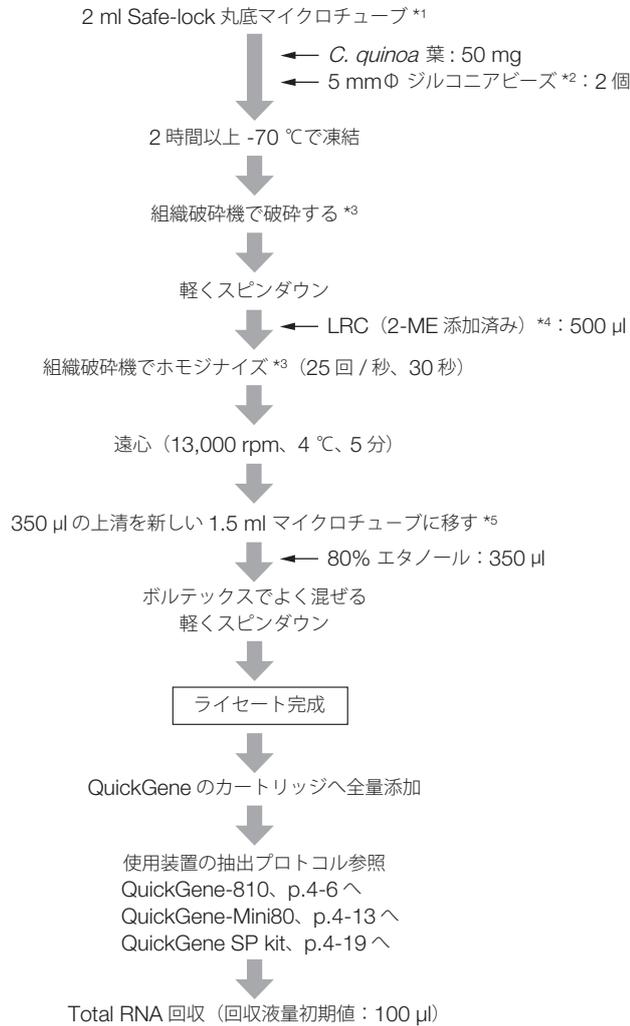
## 共通プロトコルサンプル

*N.benthamiana* 葉、*C. quinoa* 葉、コムギ葉

RB-3

キノア (キヌア、キンワ) 葉からの total RNA 抽出

プロトコル



\*1 エッペンドルフ社 (Eppendorf Co.Ltd.)

\*2 ニッカトー社 (NIKKATO Co.Ltd.)

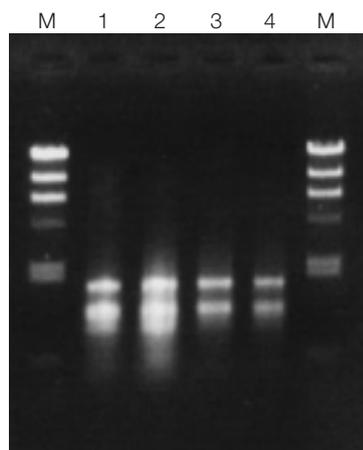
\*3 ティッシュライザー (TissueLyzer) (Mixer MIH 3000 (QIAGEN Co.Ltd.)) 組織破砕機のホルダーを、前もって -20°C に冷却してください。破砕法については、組織破砕機のマニュアルに従ってください。

\*4 1ml の LRC 当たり 10 µl の 2-ME を加えてください。

\*5 繊維が多少混じていても結果に影響しません。

## 結果

### 電気泳動図



電気泳動条件  
0.8% アガロースゲル  
TAE  
2  $\mu$ l のサンプル / ウエル

M:  $\lambda$ -Hind III (100 ng)  
1: コムギ葉 (*gramineae*)  
2: オオムギ葉 (*gramineae*)  
3: *Chenopodium quinoa* 葉 (*Chenopodiaceae*)  
4: *Nicotiana benthamiana* 葉 (*solanaceae*)

### Total RNA の収量

<i>C. quinoa</i> 葉	3.88 $\mu$ g
--------------------	--------------

### タンパク質の混入：A260/280

<i>C. quinoa</i> 葉	2.02
--------------------	------

### カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

### その他

データなし

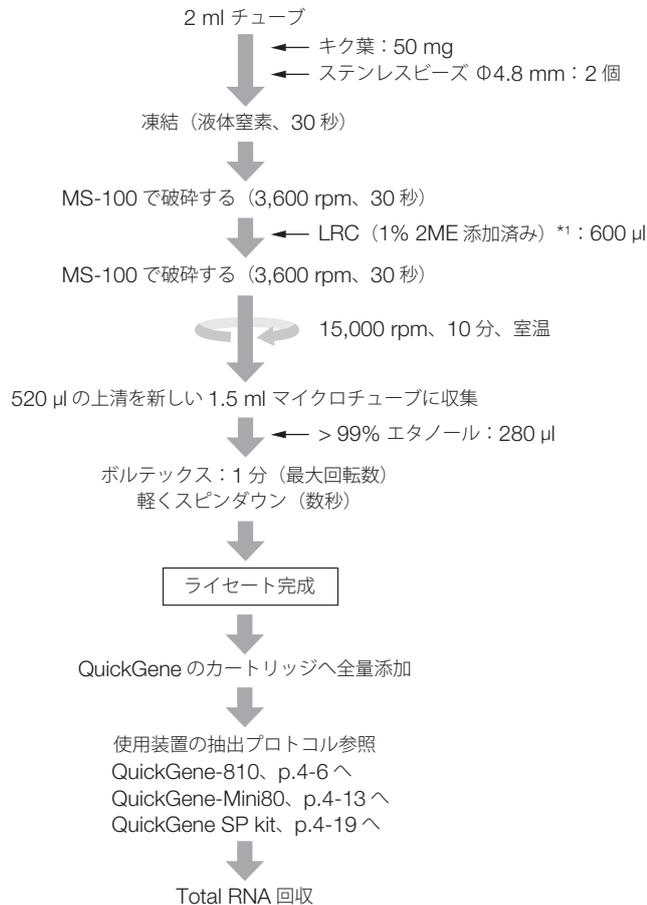
## 共通プロトコルサンプル

*N.benthamiana* 葉、オオムギ葉、コムギ葉

RB-4

キク(菊) 葉からの total RNA 抽出

プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

RB-4

結果

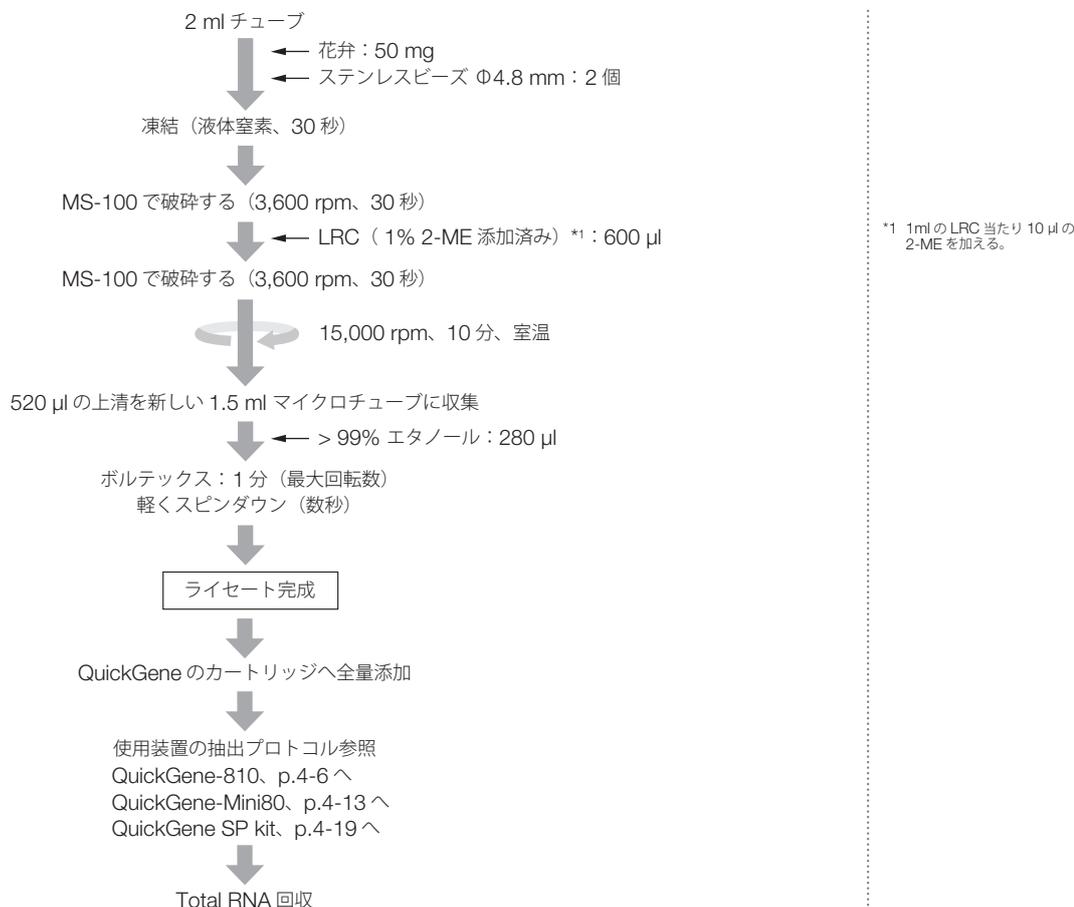
- 電気泳動図  
データなし
- Total RNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入：A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入：A260/230  
データなし
- その他  
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

## 花卉からの total RNA 抽出

### プロトコル



### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ Total RNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

データなし

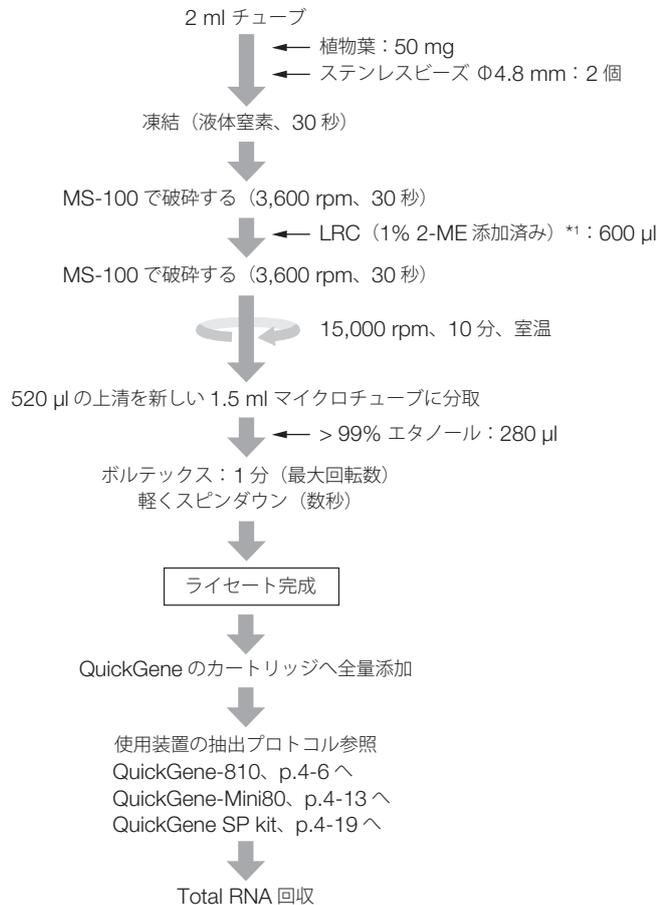
### 共通プロトコルサンプル

データなし

RB-6

植物からの total RNA 抽出

プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

RB-6

結果

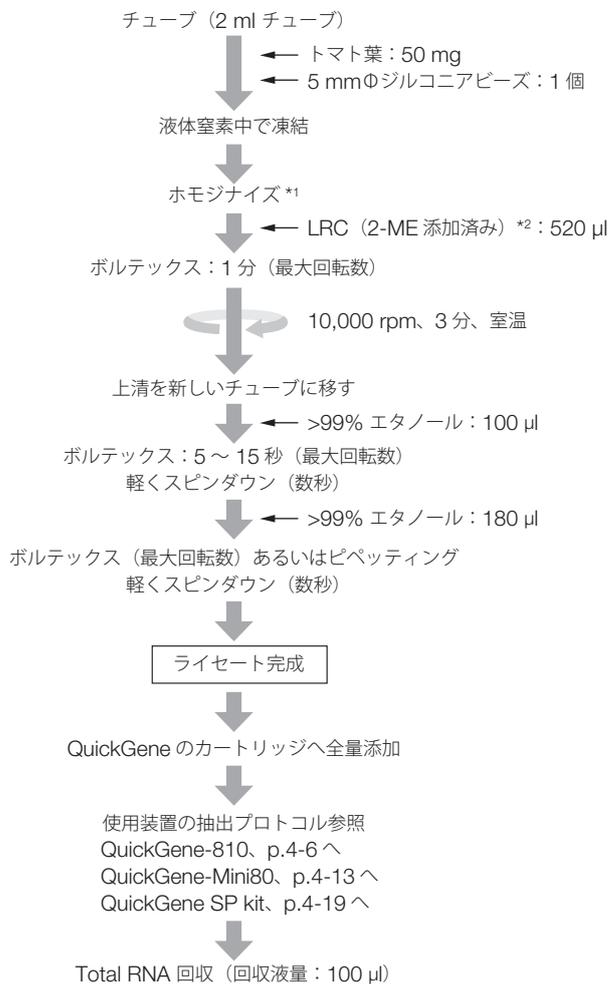
- 電気泳動図  
データなし
- Total RNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入：A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入：A260/230  
データなし
- その他  
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

## トマト葉からの total RNA 抽出

### プロトコル



\*1 ホモジナイザー (MS-100) :  
トミー精工 (株) 製品  
ビーズ :  
ジルコニア /5mmΦ、  
1個 (Cat.No.ZB-50)  
チューブ :  
2ml チューブ (Cat.No.72893)  
ホモジナイズ条件 :  
2,500 rpm、10 秒あるいは  
3,000 rpm、10 秒

\*2 1ml の LRC 当たり 10 μl の  
2-ME を加える。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### Total RNA の収量

トマト葉の量	収量 (μg)	平均収量 (μg)
25 mg	6.3	5.3
	4.2	
50 mg	9.2	7.8
	6.2	
	8.0	

**■ タンパク質の混入：A260/280**

トマト葉の量	A260/280	A260/280 の平均値
25 mg	2.03	2.02
	2.02	
50 mg	2.01	2.00
	2.00	
	1.99	

**■ カオトロピック塩の混入：A260/230**

トマト葉の量	A260/230	A260/230 の平均値
25 mg	1.55	1.54
	1.62	
50 mg	1.62	1.65
	1.66	
	1.66	

**■ その他**

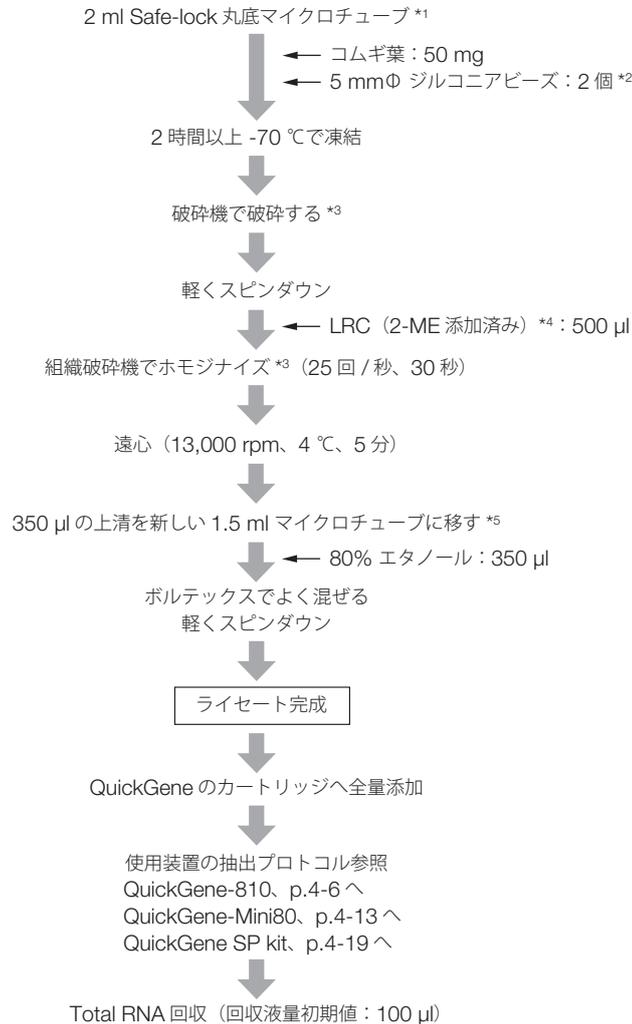
データなし

**■ 共通プロトコルサンプル**

データなし

## コムギ（小麦）葉からの total RNA 抽出

### プロトコル



\*1 エッペンドルフ社 (Eppendorf Co.Ltd.)

\*2 ニッカトー社 (NIKKATO Co.Ltd.)

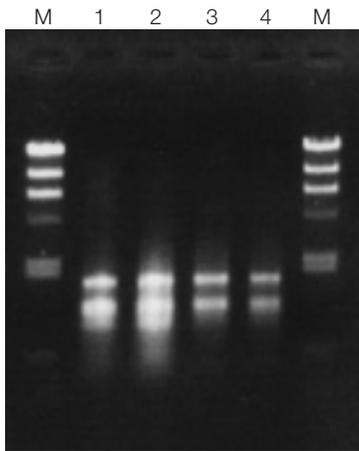
\*3 ティッシュライザー (Tissue-Lyser) (Mixer MIH 3000 (QIAGEN Co.Ltd.)) 組織破碎機のホルダーを、前もって -20°C に冷却してください。破碎法については、組織破碎機のマニュアルに従ってください。

\*4 1 ml の LRC 当たり 10 µl の 2-ME を加えてください。

\*5 繊維がいくらか混じっていても結果に影響はありません。

結果

電気泳動図



電気泳動条件  
0.8% アガロースゲル  
TAE  
2  $\mu$ l のサンプル / ウエル

M :  $\lambda$ -Hind III (100 ng)  
1 : コムギ葉 (*gramineae*)  
2 : オオムギ葉 (*gramineae*)  
3 : *Chenopodium quinoa* 葉 (*Chenopodiaceae*)  
4 : *Nicotiana benthamiana* 葉 (*solanaceae*)

Total RNA の収量

コムギ葉	6.12 $\mu$ g
------	--------------

タンパク質の混入 : A260/280

コムギ葉	2.11
------	------

カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

その他

データなし

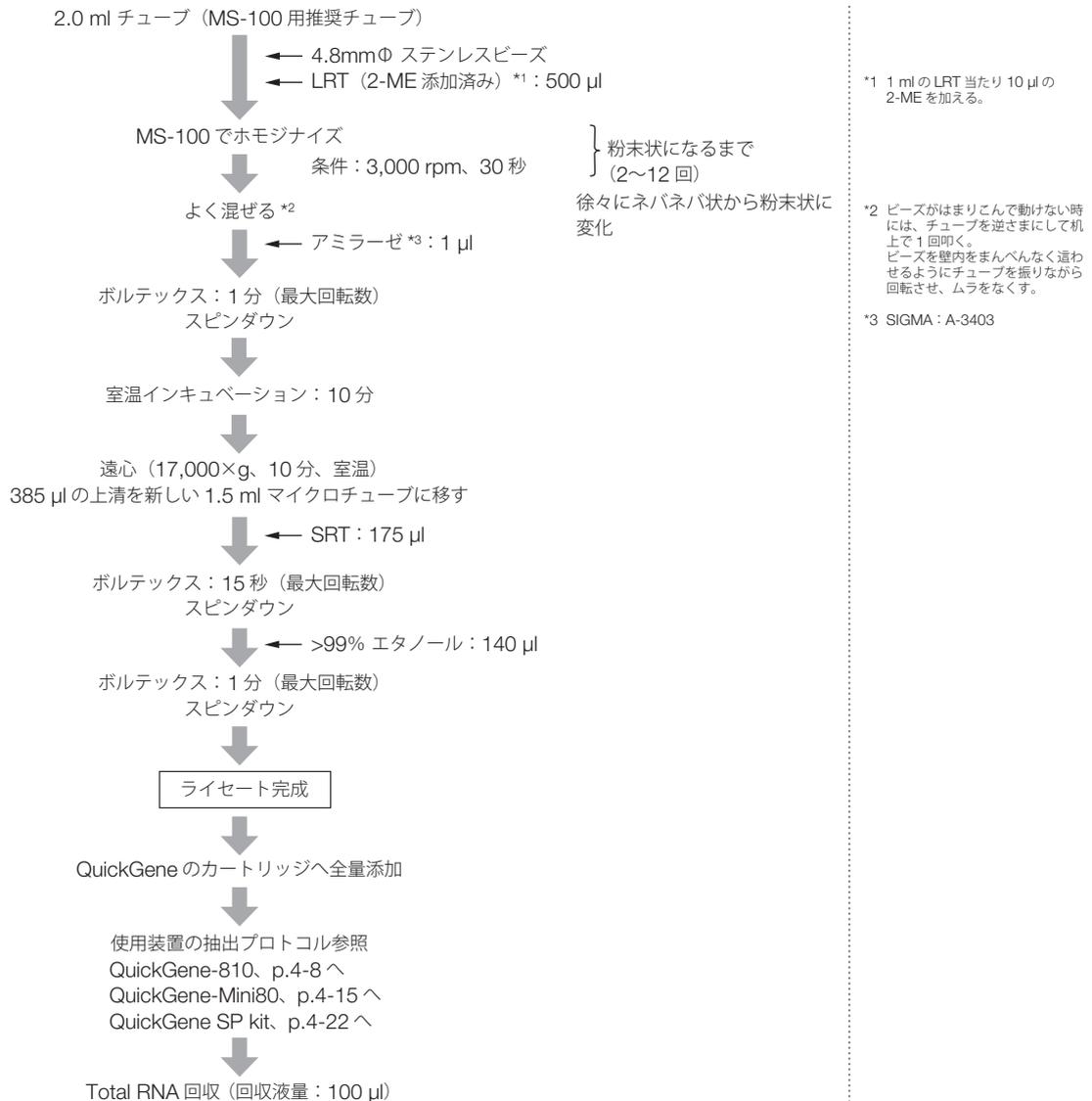
共通プロトコルサンプル

*N.benthamiana* 葉、オオムギ葉、*C. quinoa* 葉

RB-9

アマランサスの種からの total RNA 抽出

プロトコル



結果

- 電気泳動図  
データなし
- Total RNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし
- その他  
データなし

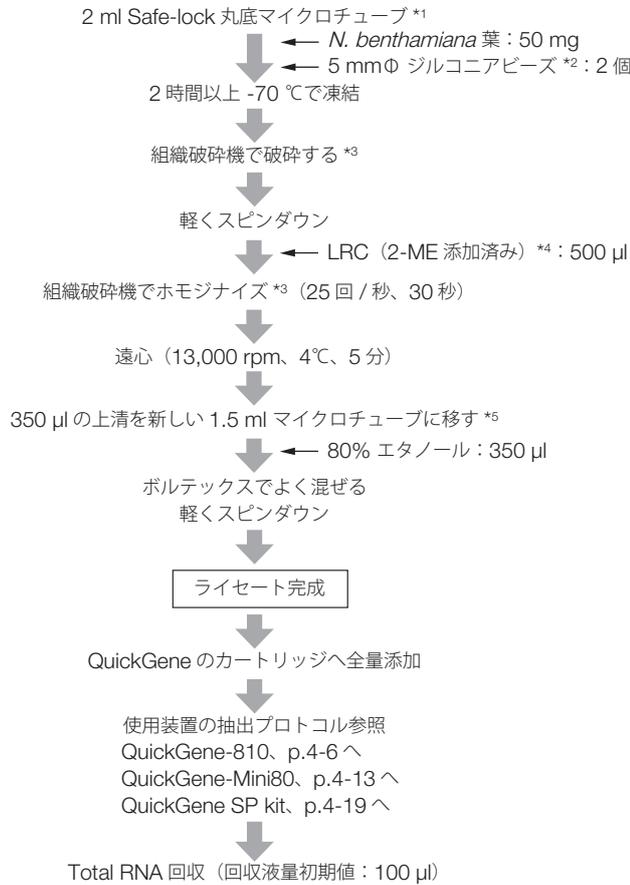
共通プロトコルサンプル

データなし

RB-10

タバコ (*N.benthamiana*) 葉からの total RNA 抽出

プロトコル



\*1 エッペンドルフ社 (Eppendorf Co.Ltd.)

\*2 ニッカー社 (NIKKATO Co.Ltd.)

\*3 ティッシュライザー (Tissue-Lyser) (Mixer MIH 3000 (QIAGEN Co.Ltd.)) 組織破砕機のホルダーを、前もって -20°C に冷却してください。破碎法については、組織破砕機のマニュアルに従ってください。

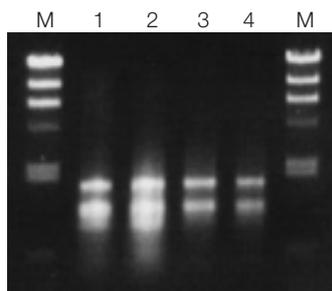
\*4 1 ml の LRC 当たり 10 μl の 2-ME を加えてください。

\*5 繊維がいくら混じっていても結果に影響はありません。

RB-10

結果

電気泳動図



電気泳動条件  
0.8% アガロースゲル  
TAE 緩衝液  
2 μl のサンプル / ウエル

M: λ-Hind III (100 ng)  
1: コムギ葉 (*gramineae*)  
2: オオムギ葉 (*gramineae*)  
3: *Chenopodium quinoa* 葉 (*Chenopodiaceae*)  
4: *Nicotiana benthamiana* 葉 (*solanaceae*)

Total RNA の収量

<i>N. benthamiana</i> 葉	2.64 μg
-------------------------	---------

タンパク質の混入: A260/280

<i>N. benthamiana</i> 葉	1.95
-------------------------	------

カオトロピック塩の混入: A260/230

データなし

その他

データなし

共通プロトコルサンプル

オオムギ葉、*C. quinoa* 葉、コムギ葉



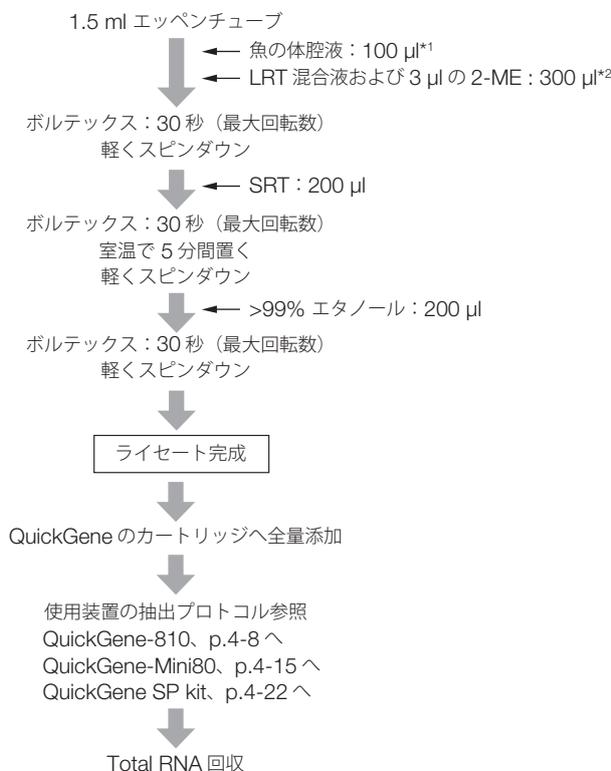
## 3-XIV 章

### 魚および貝からの total RNA抽出

---

## 魚の体腔液からの total RNA 抽出

### プロトコル



\*1 凍結と融解が繰り返された場合、6,800×g で 3 分間遠心して上清を採取する。

\*2 LRT 混合液：キャリアー RNA 310 mg を 11.6 ml の LRT に溶解してください。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### Total RNA の収量

データなし

#### タンパク質の混入：A260/280

体腔液の量	A260/280
100 µl	1.6

#### カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

#### その他

データなし

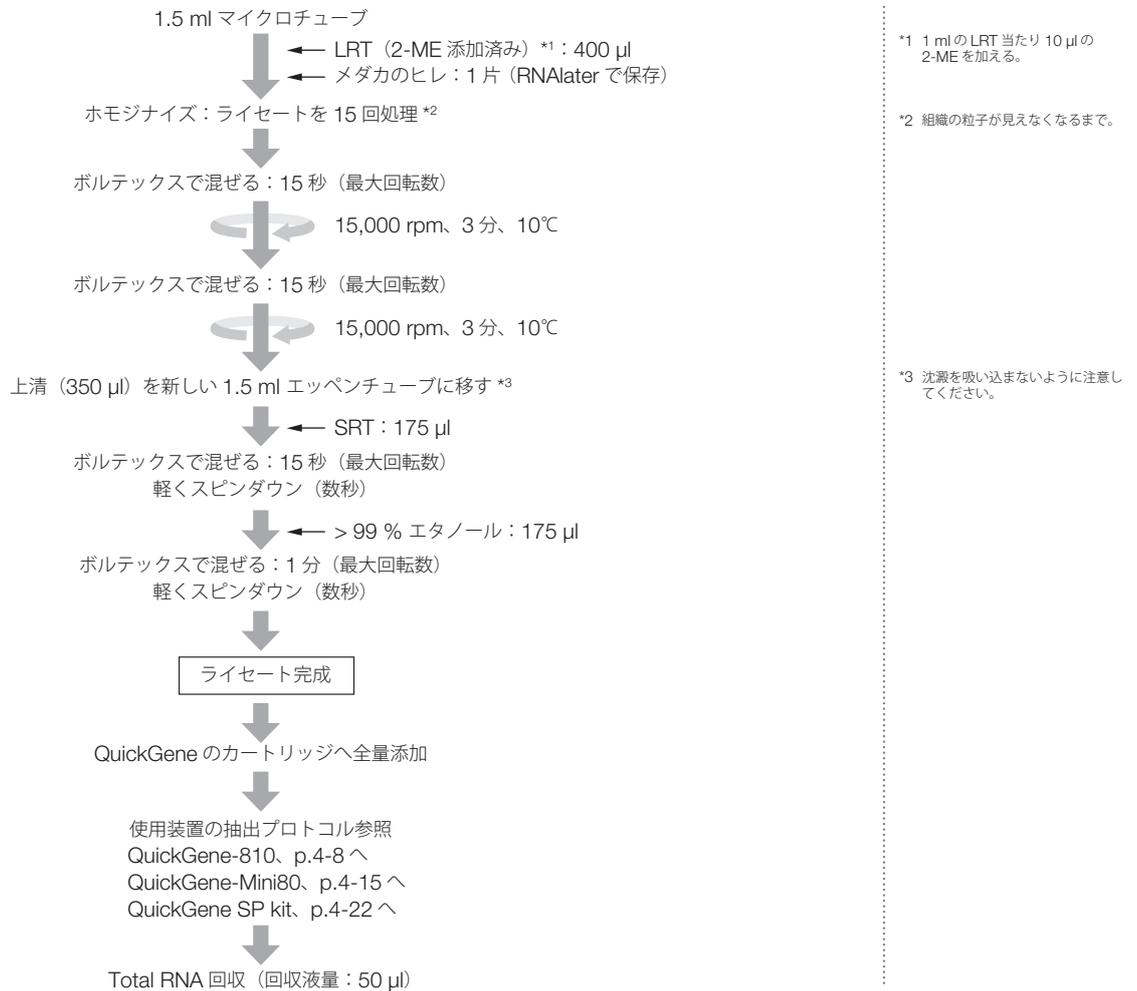
### 共通プロトコルサンプル

データなし

RD-2

メダカのヒレ（鰭）からの total RNA 抽出

プロトコル



RD-2

結果

電気泳動図

データなし

Total RNA の収量

ヒレの量	収量 (µg)
1 片	2.0

タンパク質の混入 : A260/280

データなし

カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

その他

データなし

共通プロトコルサンプル

メダカ肝臓

## メダカの肝臓からの total RNA 抽出

### プロトコル



### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### Total RNA の収量

肝臓の量	収量 (µg)
1 片	約 20.0

#### タンパク質の混入 : A260/280

肝臓の量	A260/280
1 片	2.1

#### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

#### その他

データなし

### 共通プロトコルサンプル

メダカヒレ

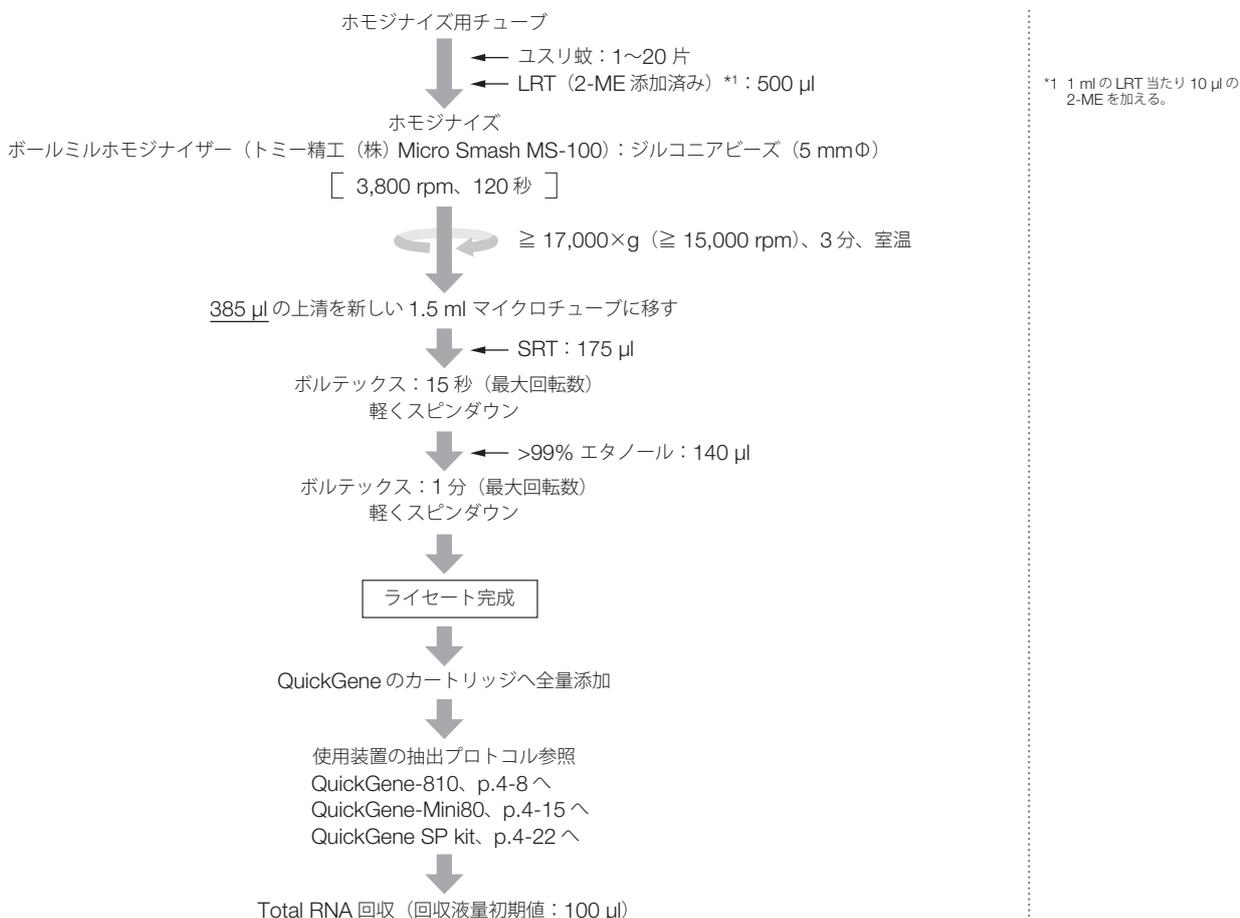
## 3-XV 章

### 昆虫からの total RNA抽出

---

## ユスリ蚊からの total RNA 抽出

### プロトコル



### 結果

■ 電気泳動図  
データなし

#### Total RNA の収量

ユスリカの数	収量 (µg)
1 片	0.20
20 片	2.05

#### タンパク質の混入：A260/280

ユスリカの数	A260/A280
1 片	2.65
20 片	2.22

■ カオトロピック塩の混入：A260/230  
データなし

■ その他  
データなし

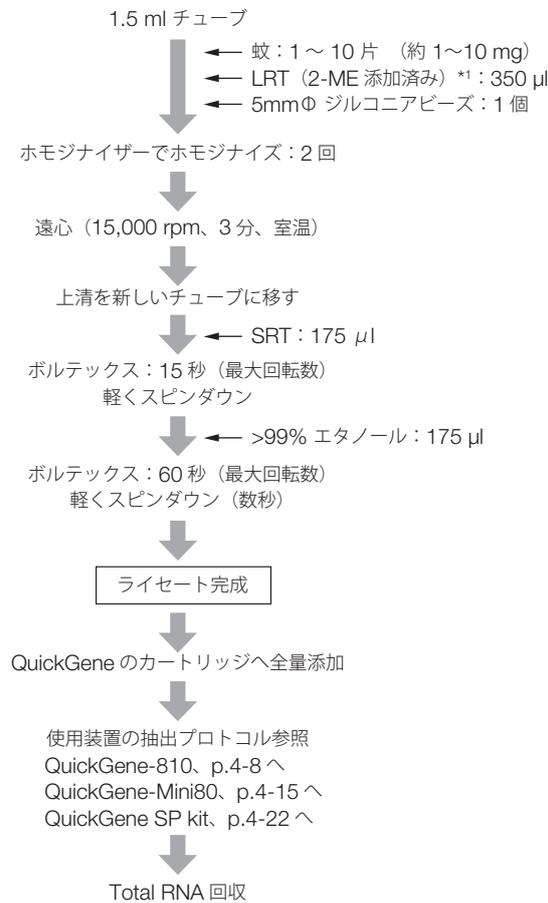
### 共通プロトコルサンプル

データなし

RE-2

蚊からの total RNA 抽出

プロトコル



\*1 1 ml の LRT 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

結果

■ 電気泳動図

データなし

■ Total RNA の収量

サンプル	No.1	No.5	No.10
収量	1.5 µg	16.2 µg	24.0 µg

■ タンパク質の混入：A260/280

サンプル	No.1	No.5	No.10
A260/280	1.95	2.16	2.17

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

サンプル	No.1	No.5	No.10
A260/230	0.66	1.96	2.07

■ その他

データなし

共通プロトコルサンプル

データなし



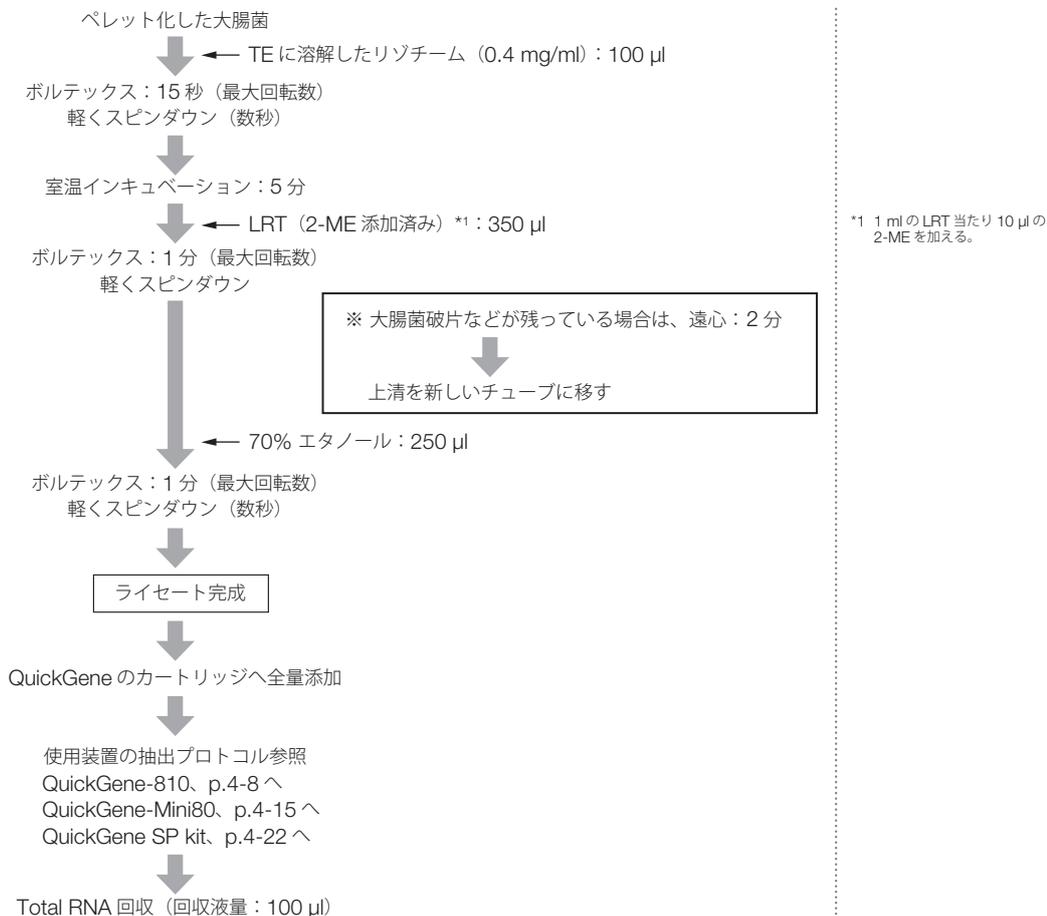
## 3-XVI 章

### 細菌からの total RNA抽出

---

## 大腸菌からの total RNA 抽出

### プロトコル



### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ Total RNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入: A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入: A260/230

データなし

■ その他

データなし

### 共通プロトコルサンプル

データなし

## 3-XVII 章

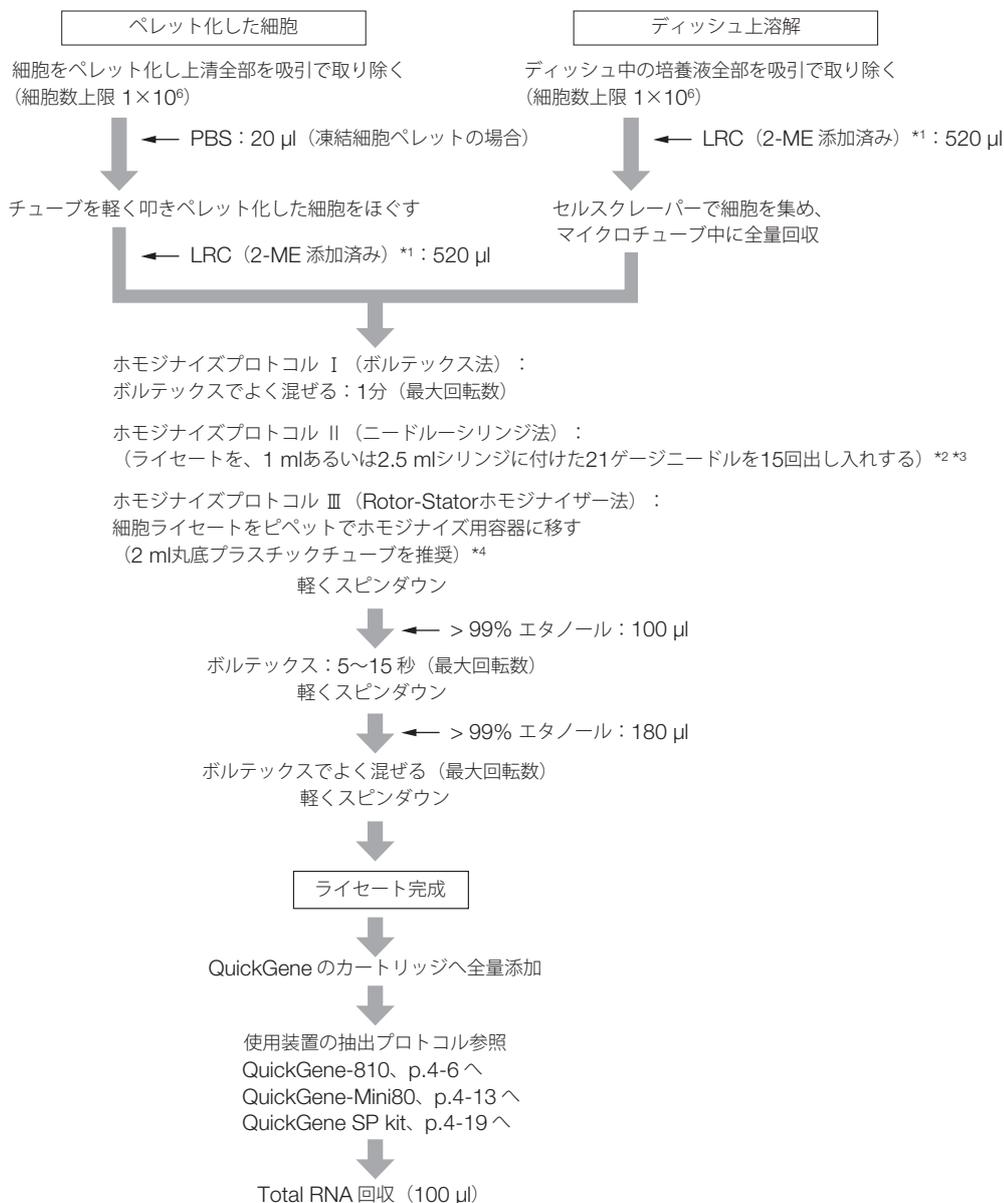
### 培養細胞からの total RNA抽出

---

**RG-1**

**COS-7 培養細胞からの total RNA 抽出 (～1 × 10<sup>6</sup> 個)**

**プロトコル**



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を、使用前毎に必ず LRC に加えてください。  
1ml の LRC 当たり 10 µl の 2-ME を加えます。

\*2 サンプルの泡立ちを防ぐために空気の混入を避けてください。

\*3 感染性のサンプルを御使用の際は、ニードルの扱いには十分注意してください。

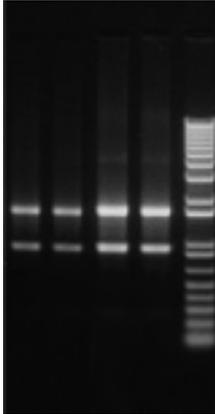
\*4 ホモジナイズ  
条件例: 20,000 rpm、30 秒、2 回。  
5 mmφ あるいは 7 mmφ プロブ使用。

## 結果

### 電気泳動図

COS-7 (1 ウエル / 6- ウエル プレート (3.5 cm ディッシュプレート)、6 cm ディッシュ)

1 2 3 4 M



1,2 : 1 ウエル / 6- ウエル プレート (3.5 cm ディッシュ プレート)、  
ホモジナイズプロトコル II  
3,4 : 6 cm ディッシュ、ホモジナイズプロトコル III  
M : Ready Load 1kb Plus DNA Ladder : Invitrogen

### Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	収量 (μg)
COS-7	$0.3 \times 10^6$	II	13.6
	$0.8 \times 10^6$	III	34.4

### タンパク質の混入 : A260/280

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	純度
			タンパク質の混入 A260/280
COS-7	$0.3 \times 10^6$	II	2.19
	$0.8 \times 10^6$	III	1.96

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	純度
			カオトロピック塩の混入 A260/230
COS-7	$0.3 \times 10^6$	II	2.19
	$0.8 \times 10^6$	III	2.17

### その他

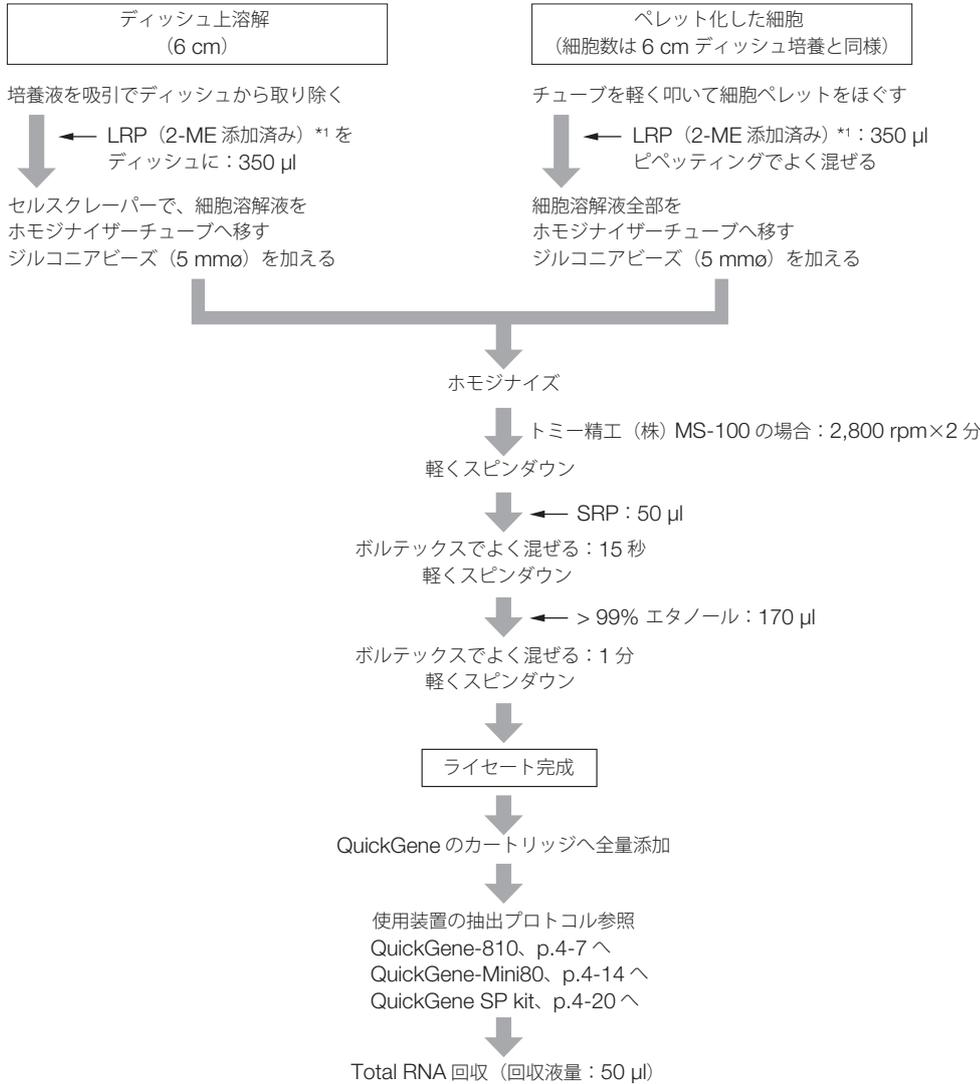
データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 HeLa 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)、培養 HEK293 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)、培養 NIH/3T3 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)

# COS-7 培養細胞からの total RNA 抽出 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

## プロトコル A



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRP に加えてください。  
1 ml の LRP 当たり 10 µl の 2-ME を加えます。

## 結果

接着細胞を直接 6 cm ディッシュで溶解するか、あるいは 6 cm ディッシュ上のペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を抽出した。

### ■ 電気泳動図

データなし

### ■ Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	収量 ( $\mu\text{g}$ )	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
COS-7	1.0	42.3	51.4

### ■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

### ■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

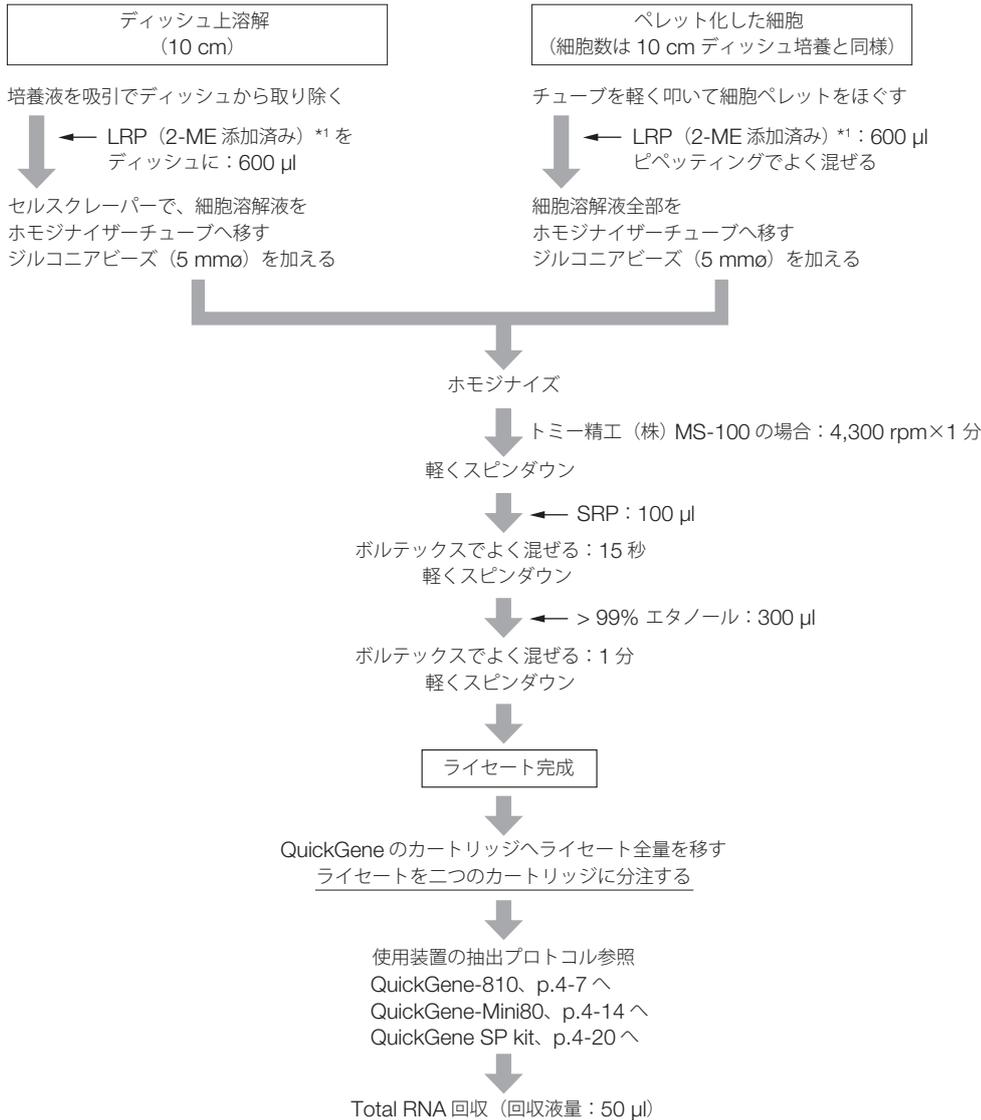
### ■ その他

データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10cm ディッシュ)、培養 HEK293 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

## プロトコル B



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRP に加えてください。  
1 ml の LRP 当たり 10 μl の 2-ME を加える。

## 結果

接着細胞を 10 cm ディッシュで直接溶解するか、あるいは 10 cm ディッシュ上のペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を抽出した。

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	収量 ( $\mu\text{g}$ )			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
COS-7	2.5	104.2	98.2	90.0	79.0

QuickGene システムを用いて、マイクロアレイ、ノーザンプロットングなどに必要な量の total RNA が得られた。

### タンパク質の混入：A260/280

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/280			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
COS-7	2.5	2.12	1.97	2.12	2.05

QuickGene システムを用いて、タンパク質の混入の少ない高純度 total RNA の抽出ができた。

### カオトロピック塩の混入：A260/230

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/230			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
COS-7	2.5	2.11	2.03	1.94	2.19

QuickGene システムを用いて、カオトロピック塩の混入の少ない高純度 total RNA の抽出ができた。

### その他

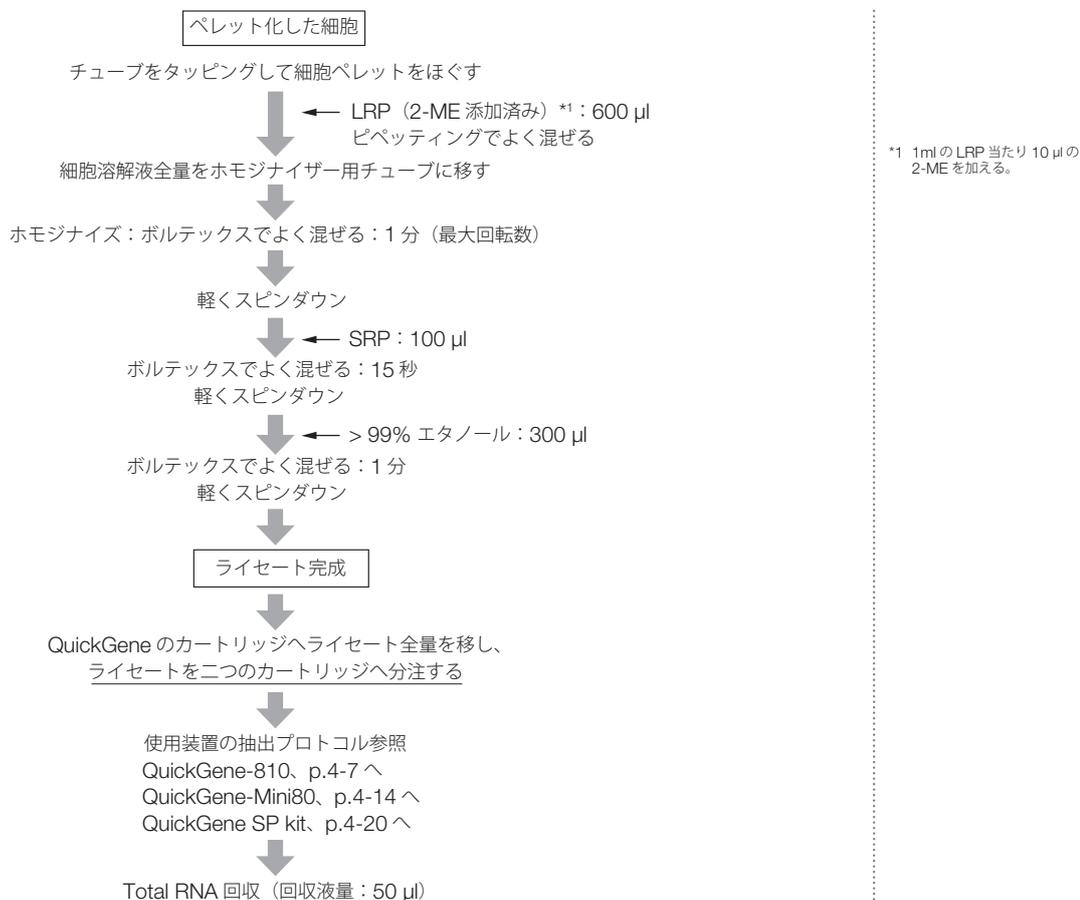
データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 HEK293 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

# ES 培養細胞からの total RNA 抽出

## プロトコル



## 結果

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

ES 細胞数	収量 (µg)
$2 \times 10^6$	41.4 (カートリッジ 2 本分)

### タンパク質の混入: A260/280

ES 細胞数	A260/280
$2 \times 10^6$	2.1

### カオトロピック塩の混入: A260/230

データなし

### その他

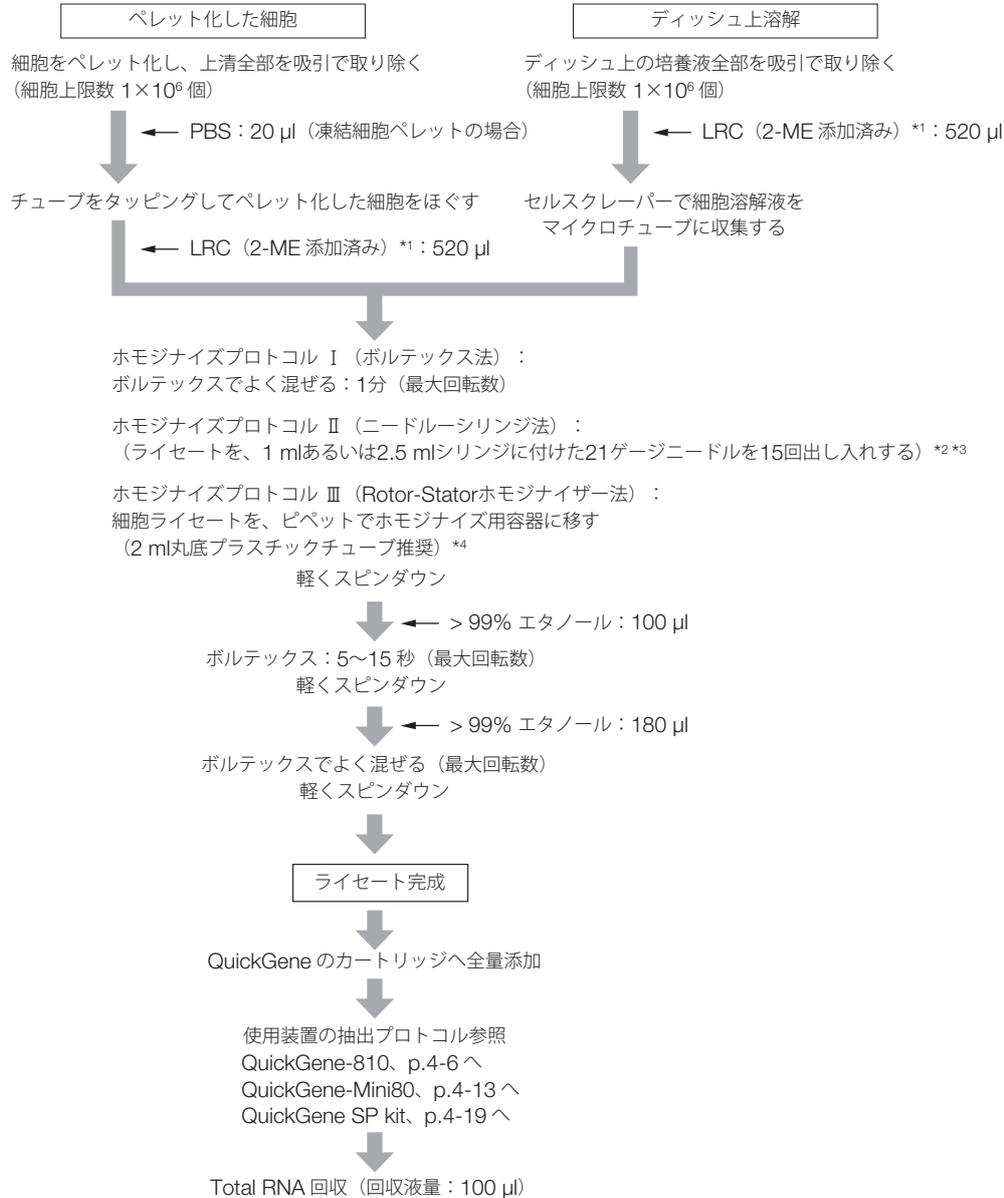
データなし

## 共通プロトコルサンプル

データなし

# HEK293 培養細胞からの total RNA 抽出 ( ~ 1 × 10<sup>6</sup> 個 )

## プロトコル



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRC に加えてください。  
1ml の LRC あたり 10 μl の 2-ME を加える。

\*2 サンプルの泡立ちを防ぐために空気の混入を避けてください。

\*3 感染性のサンプルを御使用の際は、ニードルの取扱いには十分注意してください。

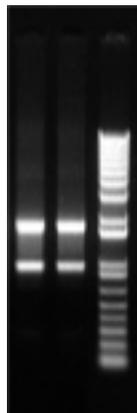
\*4 ホモジナイズ条件例: 20,000 rpm、30 秒、2回 5 mm あるいは 7 mm プローブ使用。

## 結果

### 電気泳動図

HEK293 (1 ウエル / 6- ウエル プレート (3.5 cm ディッシュ プレート))

1 2 M



1,2 : ホモジナイズ プロトコル II

M : Ready-Load 1kb Plus DNA Ladder : Invitrogen

### Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	収量 (μg)
HEK293	$2.1 \times 10^6$	II	30.4

### タンパク質の混入 : A260/280

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	純度
			タンパク質の混入 A260/280
HEK293	$2.1 \times 10^6$	II	2.27

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	純度
			カオトロピック塩の混入 A260/230
HEK293	$2.1 \times 10^6$	II	2.14

### その他

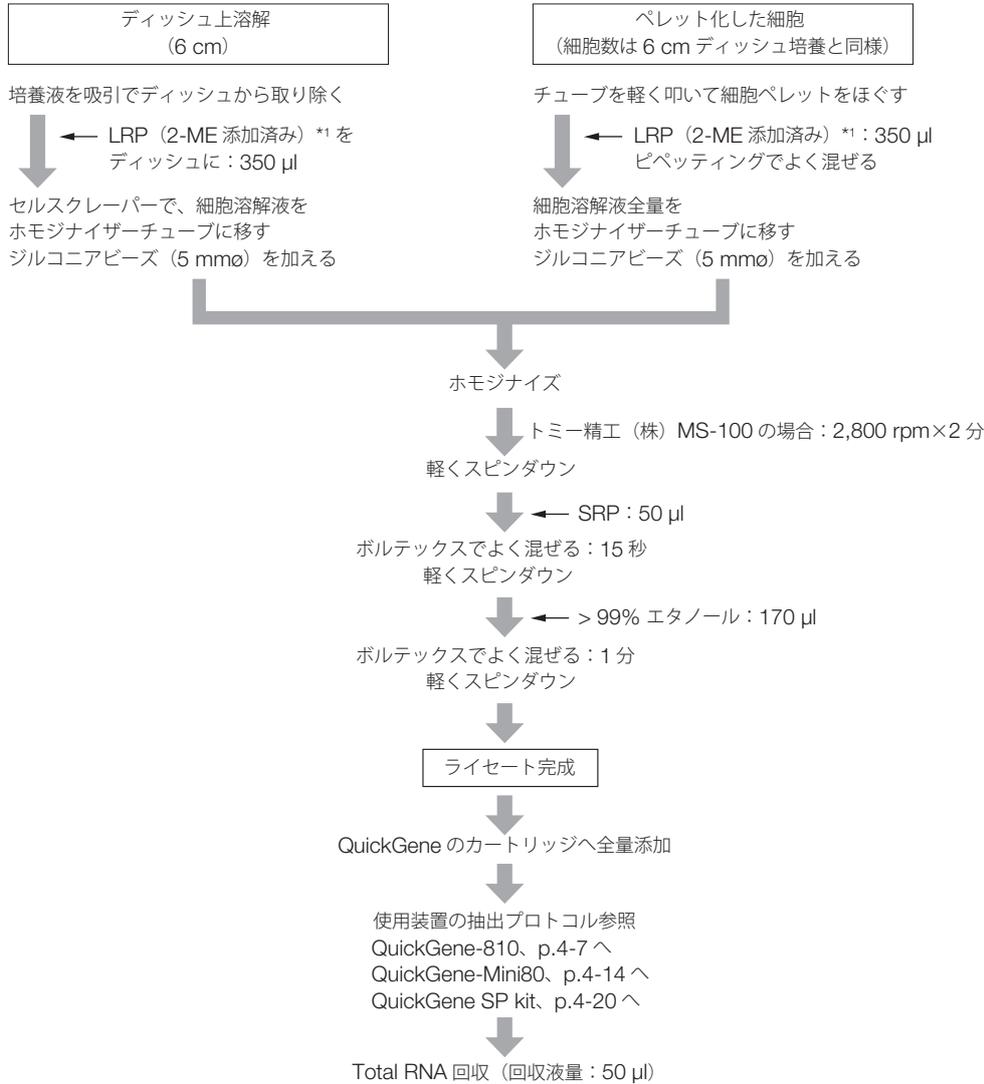
データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 COS-7 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)、培養 HeLa 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)、培養 NIH/3T3 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)

# HEK293培養細胞からのtotal RNA抽出(6 cm あるいは10 cm ディッシュ)

## プロトコル A



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ずLRPに加えてください。  
1mlのLRP当たり10μlの2-MEを加える。

## 結果

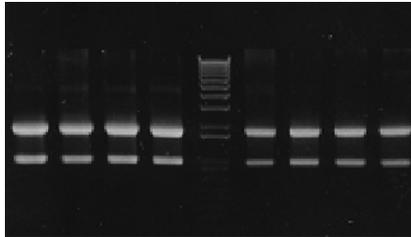
接着細胞を直接 6 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して、total RNA を抽出した。

### 電気泳動図

非変性ゲル電気泳動 (1% アガロース / 1 × TAE 緩衝液)

HEK293 (5 × 10<sup>6</sup> 個)

QuickGene                      スピнкаラム法 (A 社)  
DNase (+) DNase (-)    M    DNase (+) DNase (-)



M: マーカー (1Kb Plus DNA Ladder : Invitrogen)

### Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

細胞株	細胞数 (× 10 <sup>6</sup> )	収量 (μg)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
HEK293	5.0	79.1	57.5

### タンパク質の混入: A260/280

データなし

### カオトロピック塩の混入: A260/230

データなし

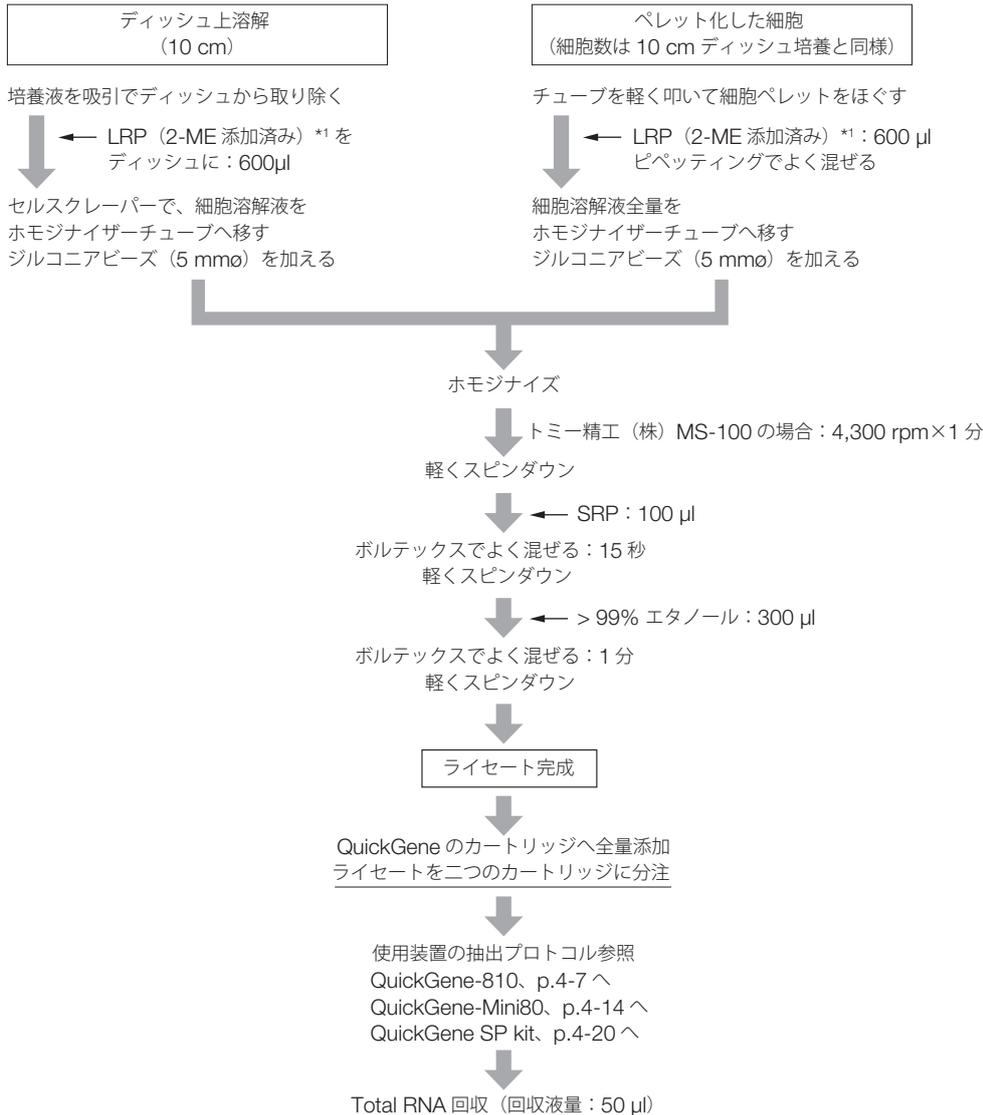
### その他

データなし

## 共通プロトコルサンプル

細胞 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

プロトコル B



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRP に加えてください。  
1 ml の LRP 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

## 結果

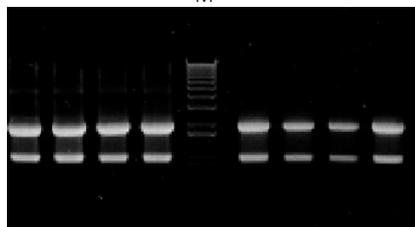
接着細胞を直接 10 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を抽出した。

### 電気泳動図

非変性ゲル電気泳動 (1% アガロース / 1 × TAE 緩衝液)

HEK293 (10 cm ディッシュ)

QuickGene                      スピнкаラム法 (A社)  
DNase (+) DNase (-) M    DNase (+) DNase (-)



M: マーカー (1Kb Plus DNA Ladder: Invitrogen)

### Total RNA の収量

細胞株	細胞数 (× 10 <sup>6</sup> )	収量 (μg)			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A社)
HEK293	5.0-8.0	175.3	92.2	160.3	101.0

QuickGene システムを用いて、マイクロアレイ、ノーザンブロットングなどに必要な量の total RNA が得られた。

### タンパク質の混入: A260/280

細胞株	細胞数 (× 10 <sup>6</sup> )	A260/280			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A社)
HEK293	5.0-8.0	2.29	2.11	2.27	2.11

QuickGene システムを用いることで、タンパク質の混入の少ない高純度の total RNA 抽出ができた。

### カオトロピック塩の混入: A260/230

細胞株	細胞数 (× 10 <sup>6</sup> )	A260/230			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A社)
HEK293	5.0-8.0	2.12	2.16	2.11	2.18

QuickGene システムを用いることで、カオトロピック塩の混入の少ない高純度の total RNA 抽出ができた。

### その他

データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

## プロトコル B'

ディッシュ上で溶解 (8×10<sup>6</sup> 個以上の細胞がある 10 cm ディッシュ)

培養液を吸引でディッシュから取り除く



← LRP (2-ME 添加済み) \*1 をディッシュに : 800 μl

セルスクレーパーで、細胞溶解液をホモジナイズ用チューブに移す  
ジルコニアビーズ (5 mmφ) を加える



ホモジナイズ



トミー精工 (株) MS-100 の場合 : 4,300 rpm×1 分

軽くスピンドウン



← SRP : 100 μl

ボルテックスでよく混ぜる : 15 秒  
軽くスピンドウン



← > 99% エタノール : 300 μl

ボルテックスでよく混ぜる : 1 分  
軽くスピンドウン



ライセート完成



QuickGene のカートリッジへライセート全量を移す  
ライセートを二つのカートリッジに分注



使用装置の抽出プロトコル参照  
QuickGene-810、p.4-7 へ  
QuickGene-Mini80、p.4-14 へ  
QuickGene SP kit、p.4-20 へ



Total RNA 回収 (回収液量 : 50 μl)

\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRP に加えてください。  
1ml の LRP 当たり 10 μl の 2-ME を加える。

## 結果

QuickGene システム (QuickGene および QuickGene RNA cultured cell HC kit S) およびスピнкаラム法 (A 社) を用いて、培養細胞 HEK293 から total RNA を抽出した。

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	収量 ( $\mu\text{g}$ )			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A company)
HEK293	12.0	149.5	133.1	94.9	102.3

QuickGene システムを用いて、マイクロアレイ、ノーザンブロットングなどに必要な量の total RNA が得られた。

### タンパク質の混入：A260/280

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/280			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
HEK293	12.0	1.95	2.04	1.98	2.02

QuickGene システムを用いることで、タンパク質の混入の少ない高純度の total RNA 抽出ができた。

### カオトロピック塩の混入：A260/230

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/230			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
HEK293	12.0	2.14	2.14	1.88	2.17

QuickGene システムを用いることで、カオトロピック塩の混入の少ない高純度の total RNA 抽出ができた。

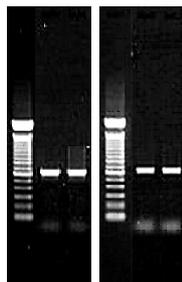
### その他

#### • RT-PCR (DNase 処理あり)

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて抽出した total RNA (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  あるいは 1  $\text{pg}/\mu\text{l}$ ) 中の  $\beta$ -actin mRNA をテンプレートとして RT-PCR を行った。

HEK293 (12  $\times 10^6$  個の細胞)

$\frac{10\text{pg}/\mu\text{l}}{\text{M} \quad 1 \quad 2} \quad \frac{1\text{pg}/\mu\text{l}}{\text{M} \quad 1 \quad 2}$



M: マーカー (100bp DNA Ladder: Invitrogen)

1: QuickGene

2: スピнкаラム法 (A 社)

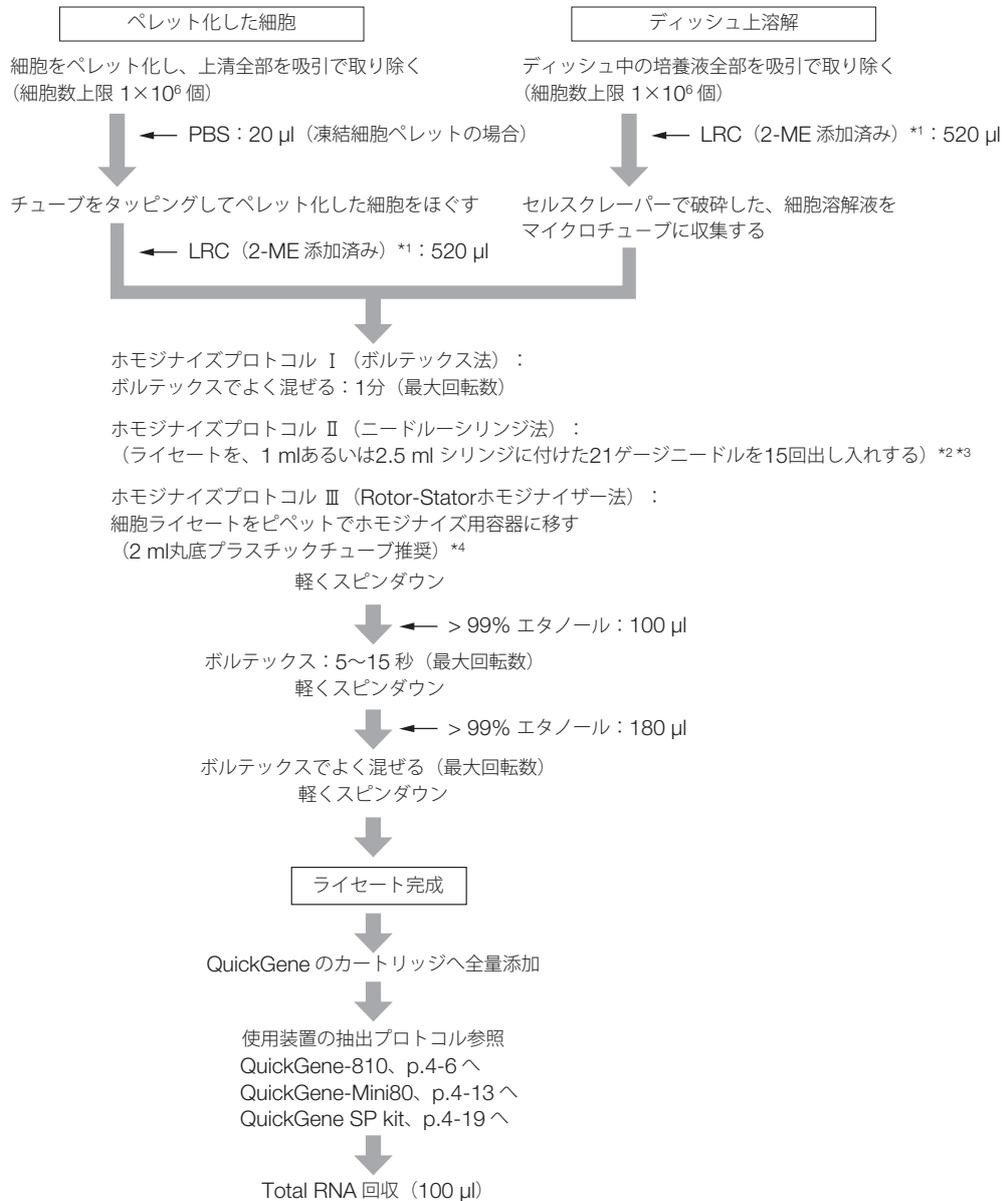
Total RNA (1  $\text{pg}/\mu\text{l}$ ) で行った RT-PCR に対して、増幅産物に似た電気泳動バンドが両方のキットで検出された。

## 共通プロトコルサンプル

培養 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

# HeLa 培養細胞からの total RNA 抽出 (～1 × 10<sup>6</sup> 個)

## プロトコル



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRC に加えてください。  
1 ml の LRC 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

\*2 サンプルの泡立ちを防ぐために空気の混入を避けてください。

\*3 感染性のサンプルを御使用の際は、ニードルの取扱いには十分注意してください。

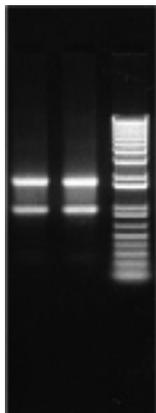
\*4 ホモジナイズ条件例: 20,000 rpm、30 秒、2回 5 mm あるいは 7 mm プローブを使用。

## 結果

### 電気泳動図

HeLa (1 ウェル / 6- ウェル プレート (3.5 cm ディッシュ プレート))

1 2 M



1,2 : ホモジナイズ プロトコル II

M : Ready Load 1kb Plus DNA Ladder : Invitrogen

### Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	収量 (μg)
HeLa	$1.2 \times 10^6$	II	28.1

### タンパク質の混入 : A260/280

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	純度
			タンパク質の混入 A260/280
HeLa	$1.2 \times 10^6$	II	2.28

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	純度
			カオトロピック塩の混入 A260/230
HeLa	$1.2 \times 10^6$	II	2.21

### その他

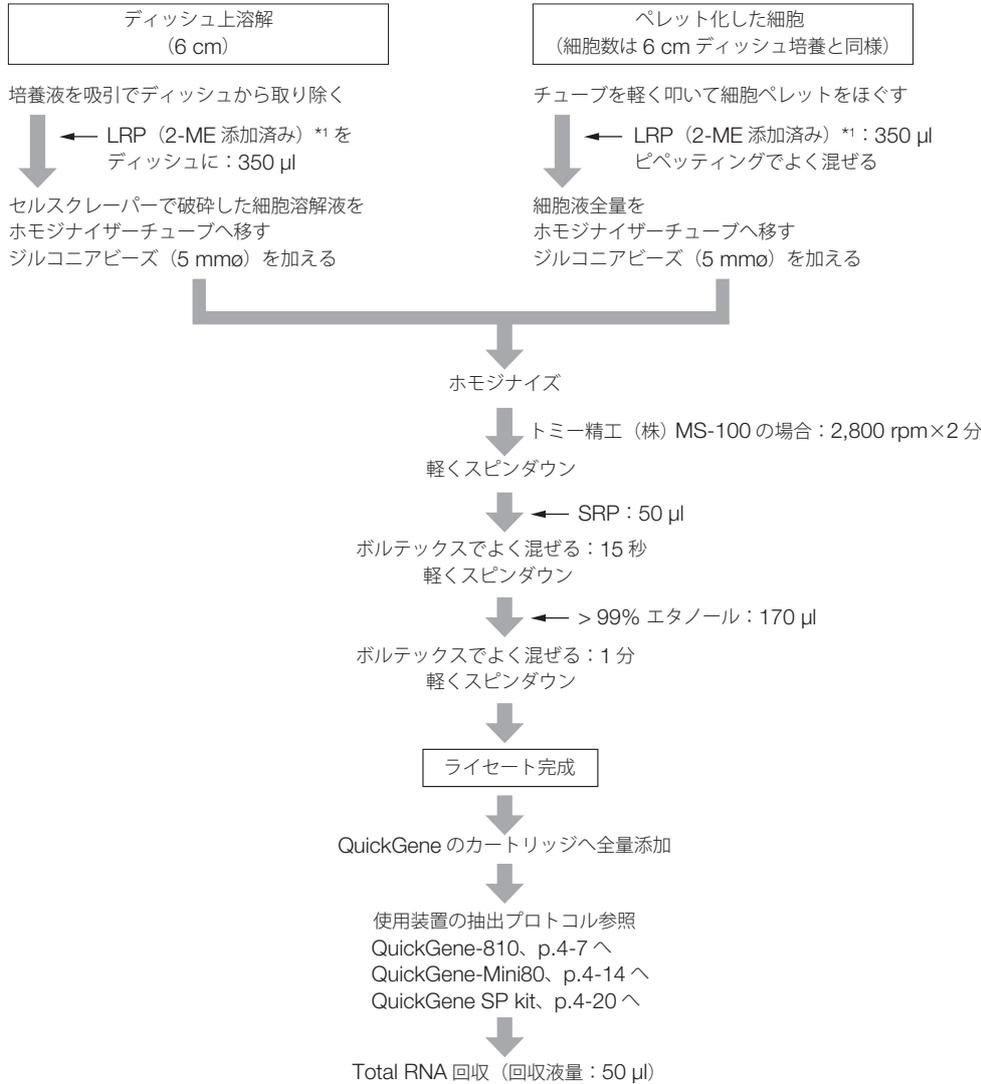
データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 COS-7 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)、培養 HEK293 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)、培養 NIH/3T3 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)

# HeLa 培養細胞からの total RNA 抽出 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

## プロトコル A



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRP に加えてください。  
1 ml の LRP 当たり 10 μl の 2-ME を加える。

## 結果

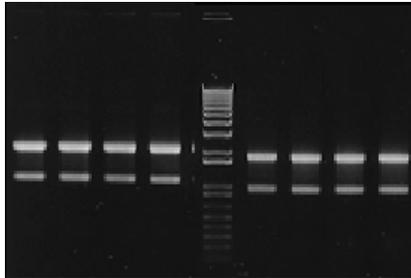
接着細胞を直接 6 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を抽出した。

### 電気泳動図

非変性ゲル電気泳動 (1% アガロース / 1 × TAE 緩衝液)

HeLa (2 × 10<sup>6</sup> 個の細胞)

QuickGene                      スピнкаラム法 (A 社)  
DNase (+) DNase (-)    M    DNase (+) DNase (-)



M : マーカー (1Kb Plus DNA Ladder : Invitrogen)

### Total RNA の収量

細胞株	細胞数 (× 10 <sup>6</sup> )	収量 (μg)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
HeLa	2.0	47.2	46.1

### タンパク質の混入 : A260/280

データなし

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

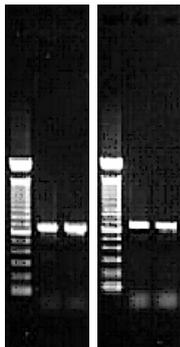
### その他

#### • RT-PCR (DNase 処理あり)

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて抽出した total RNA (10pg/μl あるいは 1pg/μl) 中の β -actin mRNA をテンプレートとして RT-PCR を行った。

HeLa (6 cm ディッシュ)

10pg/μl    1pg/μl  
M 1 2    M 1 2



M : マーカー (100bp DNA Ladder : Invitrogen)

1 : QuickGene

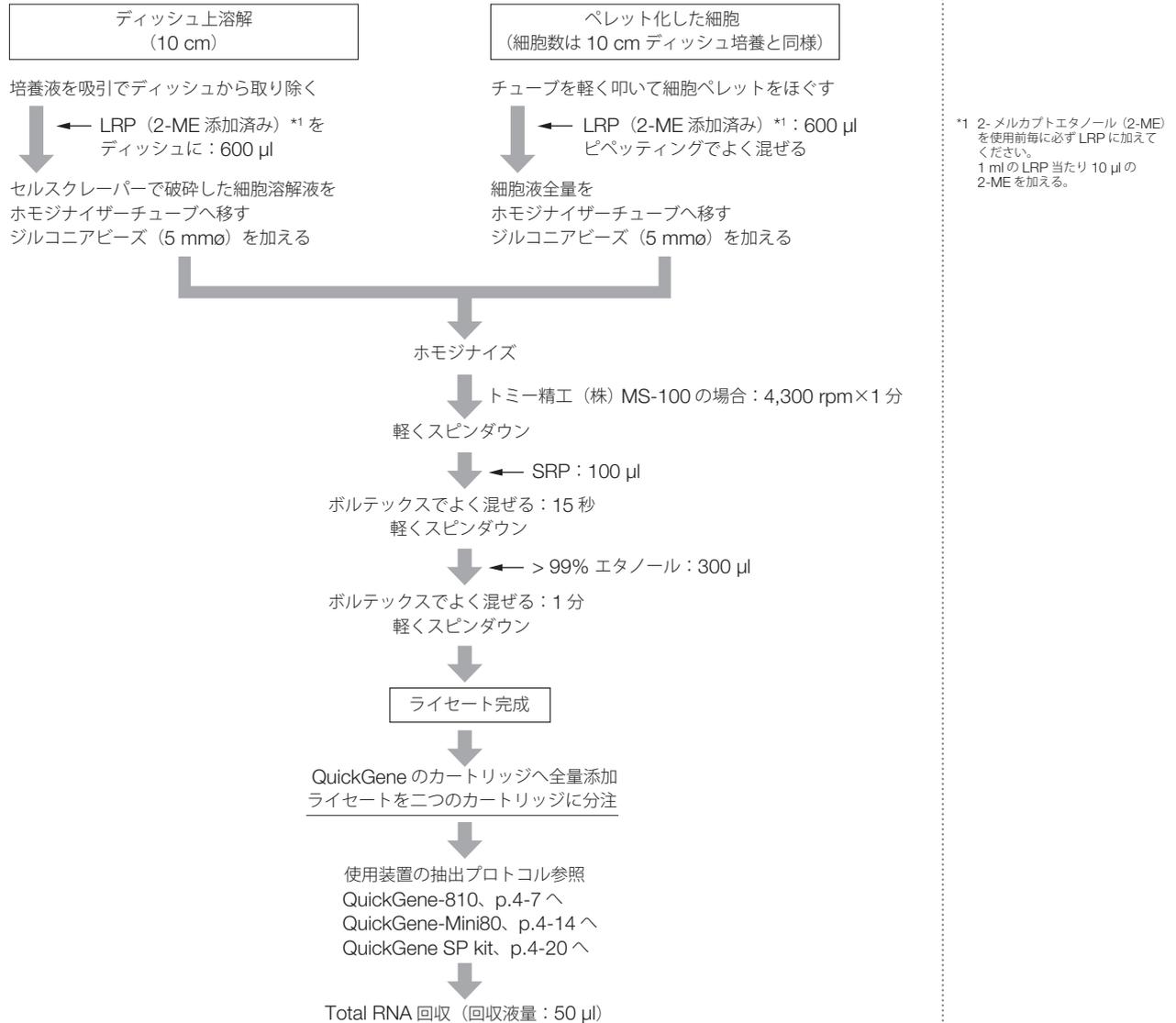
2 : スピнкаラム法 (A 社)

N : ネガティブコントロール

## 共通プロトコルサンプル

培養 HEK293 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

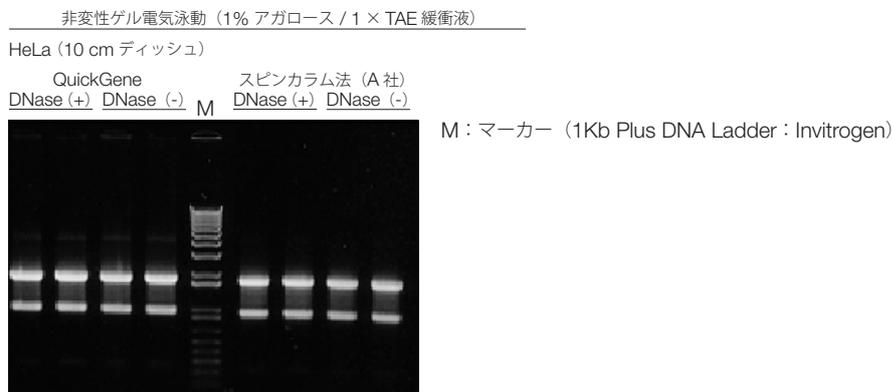
## プロトコル B



## 結果

接着細胞を直接 10 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を抽出した。

### 電気泳動図



### Total RNA の収量

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	収量 ( $\mu\text{g}$ )			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
HeLa	5.0	129.0	115.7	122.0	104.0

### タンパク質の混入：A260/280

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/280			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
HeLa	5.0	2.20	1.99	2.20	2.02

QuickGene システムを用いることで、タンパク質の混入の少ない高純度の total RNA 抽出ができた。

### カオトロピック塩の混入：A260/230

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/230			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
HeLa	5.0	2.18	2.10	2.05	2.12

QuickGene システムを用いることで、カオトロピック塩の混入の少ない高純度の total RNA 抽出ができた。

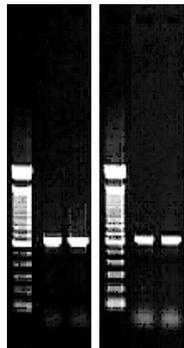
### その他

#### ● RT-PCR

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて抽出した total RNA (10pg/ $\mu\text{l}$  or 1pg/ $\mu\text{l}$ ) 中の  $\beta$ -actin mRNA をテンプレートにして RT-PCR を行った。

HeLa (10 cm ディッシュ)

10pg/ $\mu\text{l}$     1pg/ $\mu\text{l}$   
M 1 2    M 1 2



M：マーカー (100bp DNA Ladder : Invitrogen)

1：QuickGene

2：スピнкаラム法 (A 社)

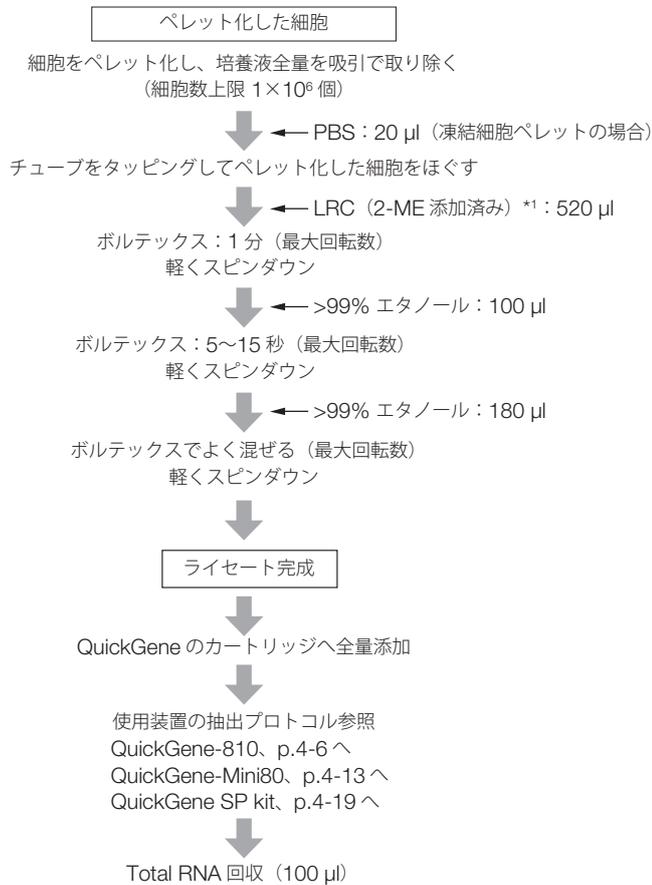
N：ネガティブコントロール

### 共通プロトコルサンプル

培養 HEK293 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

# HL60 培養細胞からの total RNA 抽出 (～1 × 10<sup>6</sup> 個)

## プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10 μl の 2-ME を加える。

## 結果

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

	細胞数	収量 (μg)
HL60	1.0 × 10 <sup>6</sup>	9.7

### タンパク質の混入：A260/280

	細胞数	A260/280
HL60	1.0 × 10 <sup>6</sup>	1.88

### カオトロピック塩の混入：A260/230

	細胞数	A260/230
HL60	1.0 × 10 <sup>6</sup>	2.08

### その他

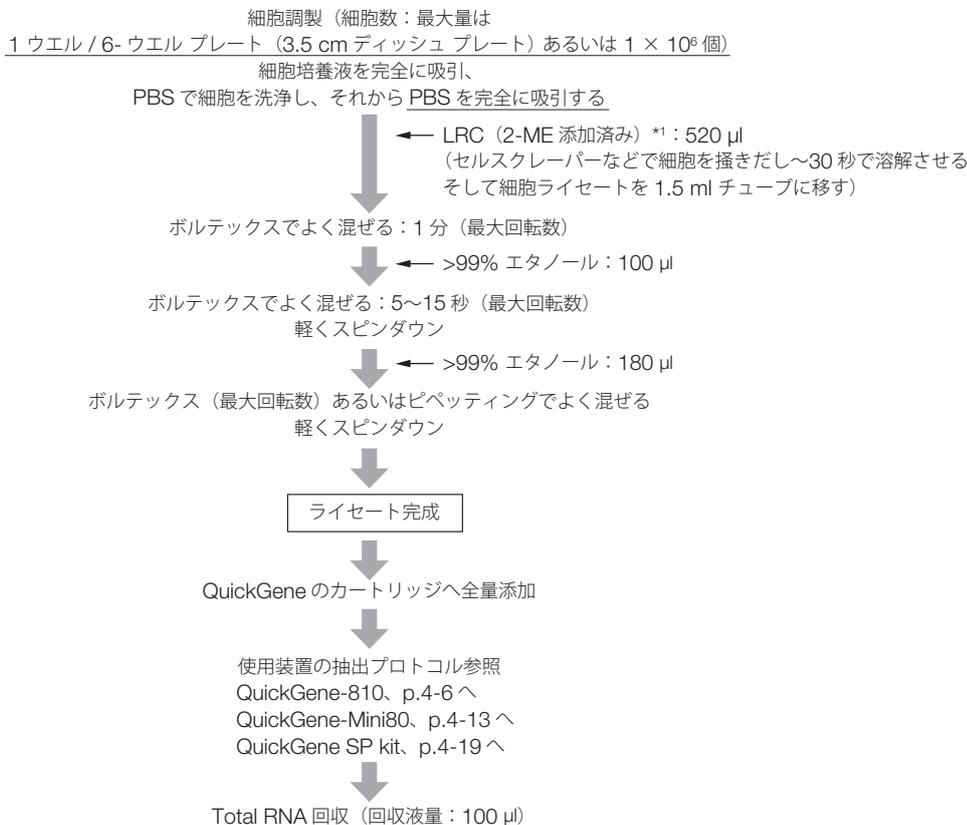
データなし

## 共通プロトコルサンプル

データなし

## 水晶体上皮培養細胞からの total RNA 抽出 (培養ディッシュでの直接溶解の場合)

### プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### Total RNA の収量

データなし

#### タンパク質の混入 : A260/280

水晶体上皮細胞数	A260/280
$1 \times 10^6$	1.77

#### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

#### その他

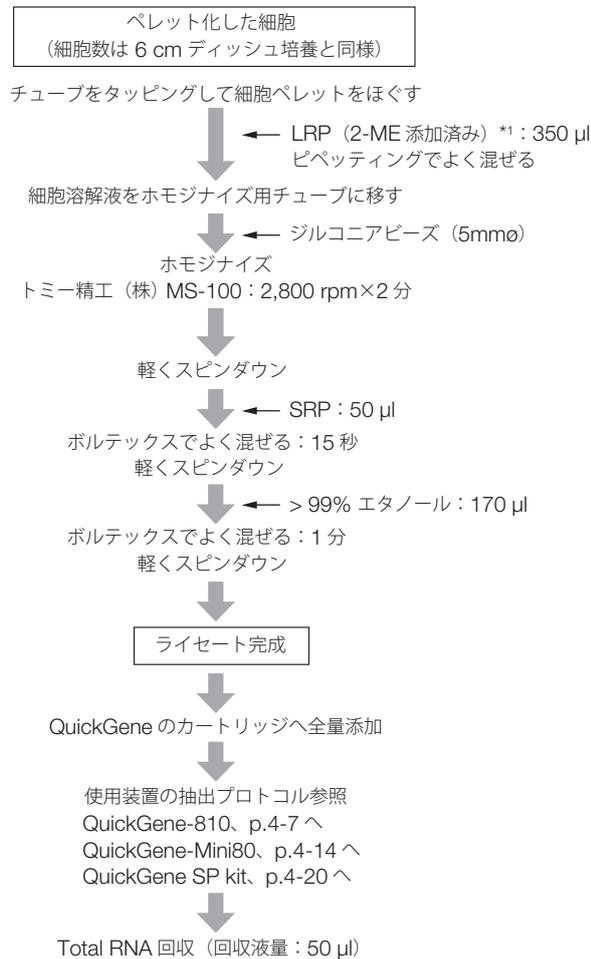
データなし

### 共通プロトコルサンプル

培養 MCF-7 細胞 (培養ディッシュで直接溶解)、培養 HuH-7 細胞 (培養ディッシュで直接溶解)、培養平滑筋細胞 (培養ディッシュで直接溶解)、培養 PC12 細胞 (培養ディッシュで直接溶解)、培養ブタ脂肪細胞 (培養ディッシュで直接溶解)、培養歯根膜細胞 (培養ディッシュで直接溶解)

## リンパ球培養細胞からの total RNA 抽出

### プロトコル



\*1 1 ml の LRP 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ Total RNA の収量

リンパ球細胞数	収量 (µg)
$1 \times 10^6$	13.4

■ タンパク質の混入 : A260/280

リンパ球細胞数	A260/280
$1 \times 10^6$	1.67

■ カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

■ その他

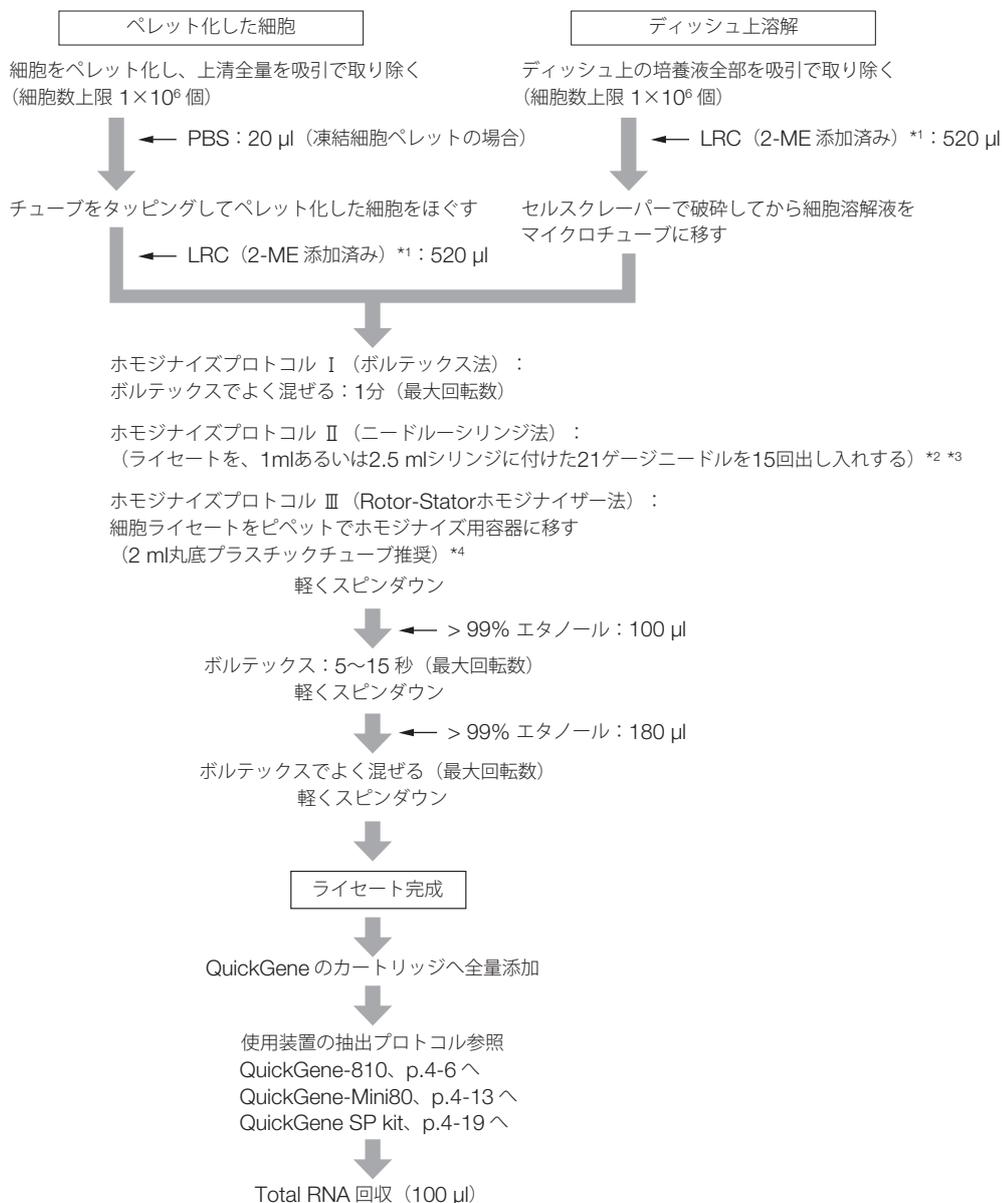
データなし

### 共通プロトコルサンプル

データなし

## NIH/3T3 培養細胞からの total RNA 抽出 (～1 × 10<sup>6</sup> 個)

### プロトコル



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRC に加えてください。  
1 ml の LRC 当たり 10 μl の 2-ME を加える。

\*2 サンプルの泡立ちを防ぐために空気の混入を避けてください。

\*3 感染性のサンプルを御使用の際は、ニードルの取扱いには十分注意してください。

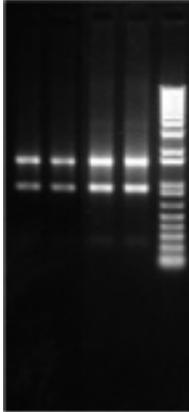
\*4 ホモジナイズ  
条件例: 20,000 rpm、30 秒、2 回  
5 mmφ あるいは 7 mmφ プロブ使用。

## 結果

### 電気泳動図

NIH/3T3 (1 ウェル / 6- ウェル プレート (3.5 cm ディッシュ プレート)、6 cm ディッシュ)

1 2 3 4 M



1,2 : 1 ウェル / 6- ウェル プレート (3.5 cm ディッシュ プレート)、  
ホモジナイズプロトコル I  
3,4 : 6 cm ディッシュ、ホモジナイズ プロトコル II  
M : Ready-Load 1kb Plus DNA Ladder : Invitrogen

### Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	Yield (μg)
NIH/3T3	$0.3 \times 10^6$	I	15.6
	$1.2 \times 10^6$	II	22.6

### タンパク質の混入 : A260/280

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	純度
			タンパク質の混入 A260/280
NIH/3T3	$0.3 \times 10^6$	I	2.17
	$1.2 \times 10^6$	II	2.26

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	純度
			カオトロピック塩の混入 A260/230
NIH/3T3	$0.3 \times 10^6$	I	2.18
	$1.2 \times 10^6$	II	2.22

### その他

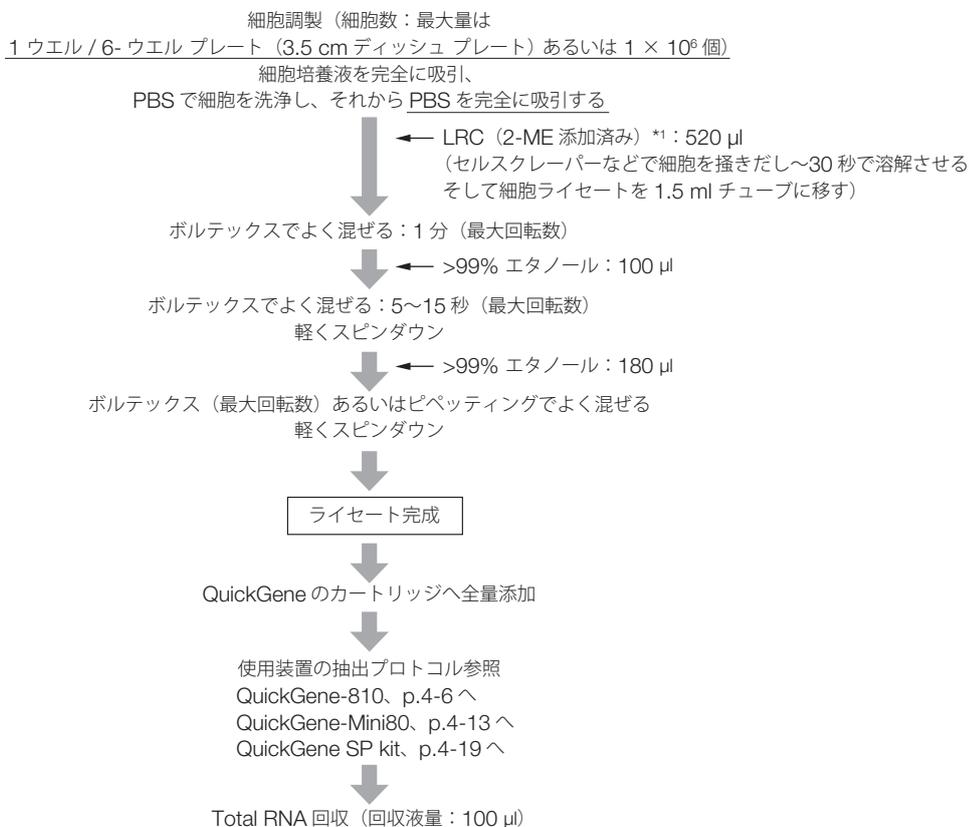
データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 COS-7 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)、培養 HeLa 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)、培養 HEK293 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)

## 歯根膜培養細胞からの total RNA 抽出（培養ディッシュでの直接溶解）

### プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### Total RNA の収量

歯根膜細胞数	収量 ( $\mu$ g)
約 $1 \times 10^5$	1.2

#### タンパク質の混入：A260/280

歯根膜細胞数	A260/280
約 $1 \times 10^5$	1.9

#### カオトロピック塩の混入：A260/230

歯根膜細胞数	A260/230
約 $1 \times 10^5$	1.2

#### その他

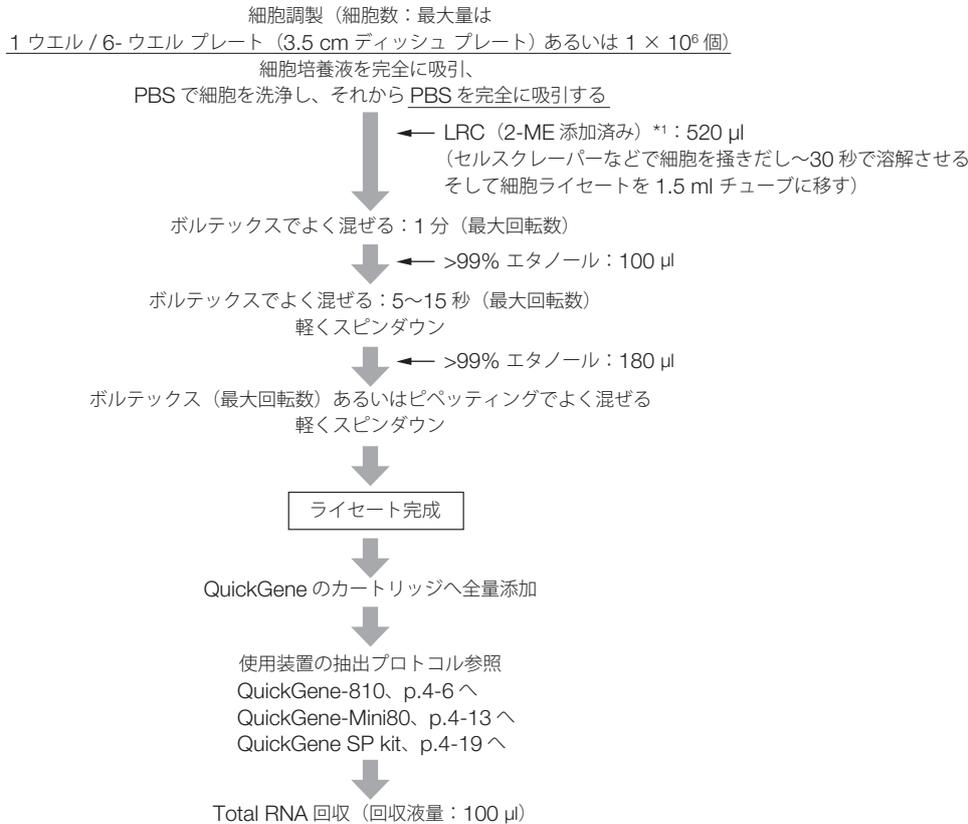
データなし

### 共通プロトコルサンプル

培養 MCF-7 細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養 HuH-7 細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養平滑筋細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養 PC12 細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養ブタ脂肪細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養水晶体上皮膜細胞（培養ディッシュでの直接溶解）

## ブタ脂肪培養細胞からの total RNA 抽出（培養ディッシュでの直接溶解）

### プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### Total RNA の収量

細胞種	収量 ( $\mu$ g)
分化細胞	0.6
未分化細胞	1.2

#### タンパク質の混入 : A260/280

Kind of cells	A260/280
分化細胞	2.09
未分化細胞	2.07

#### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

#### その他

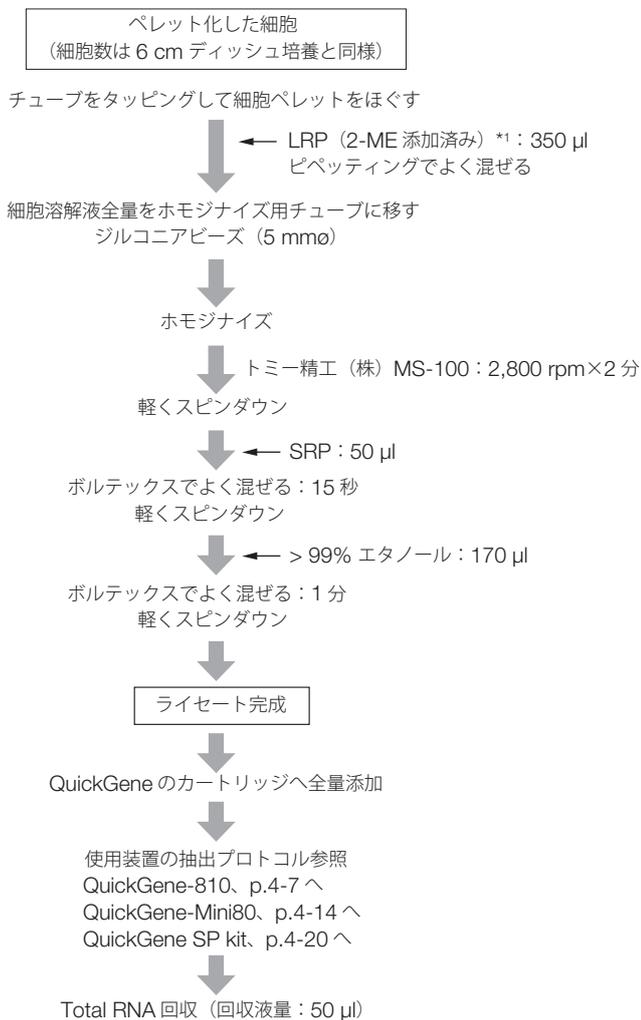
データなし

### 共通プロトコルサンプル

培養 MCF-7 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養 HuH-7 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養平滑筋細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養 PC12 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養ブタ脂肪細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養水晶体上皮細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養歯根膜細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)

# HL60 細胞からの total RNA 抽出 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

## プロトコル A



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRP に加えてください。  
1 ml の LRP 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

## 結果

接着細胞を 6 cm ディッシュで直接溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解させて total RNA を抽出した。

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	収量 ( $\mu\text{g}$ )	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
HL60	5.0	33.1	46.2

### タンパク質の混入 : A260/280

データなし

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

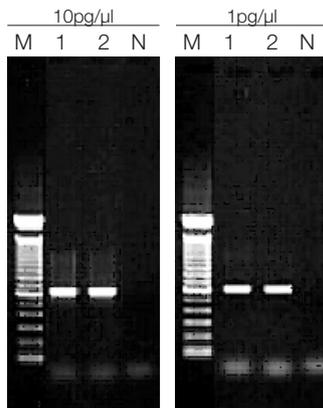
データなし

### その他

#### • RT-PCR (DNase 処理あり)

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて抽出した total RNA ( $10\text{pg}/\mu\text{l}$  or  $1\text{pg}/\mu\text{l}$ ) 中の  $\beta$ -actin mRNA をテンプレートにして RT-PCR を行った。

HL60 ( $5 \times 10^6$  個の細胞)



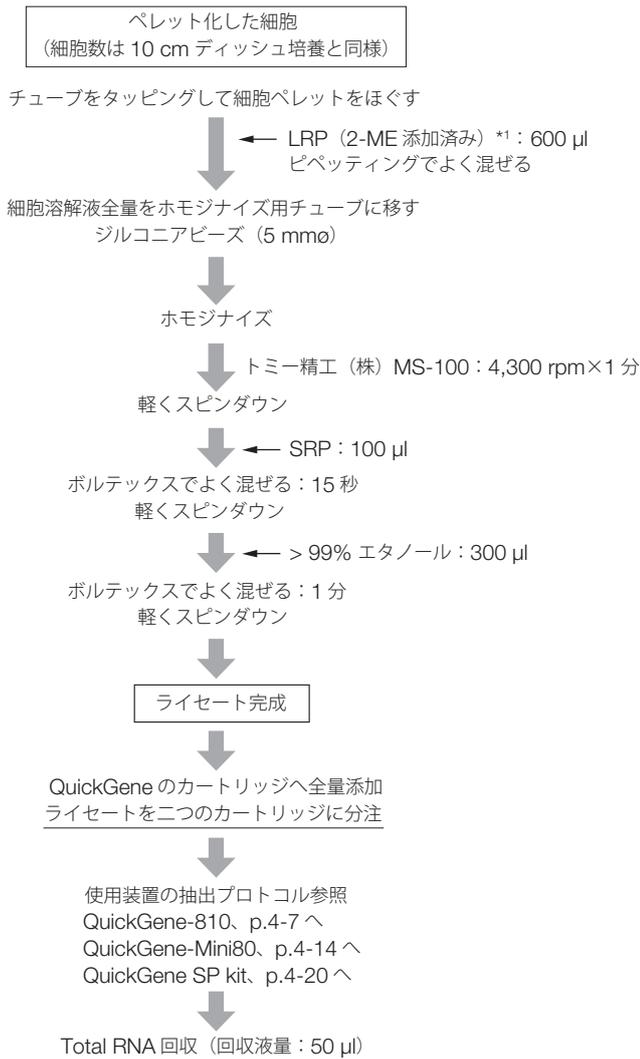
M : マーカー (100bp DNA Ladder : Invitrogen)  
 1 : QuickGene  
 2 : スピнкаラム法 (A 社)  
 N : ネガティブコントロール

Total RNA ( $1\text{pg}/\mu\text{l}$ ) で行った RT-PCR に対して、増幅産物のバンドに似たバンドが両方のキットで検出された。

## 共通プロトコルサンプル

データなし

■ プロトコル B



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRP に加えてください。  
1 ml の LRP 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

## 結果

接着細胞を 10 cm ディッシュで直接溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を抽出した。

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	収量 ( $\mu\text{g}$ )			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
HL60	15.0	167.3	154.4	144.4	140.5

QuickGene システムを用いて、マイクロアレイ、ノーザンプロットングなどに必要な量の total RNA が得られた。

### タンパク質の混入：A260/280

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/280			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
HL60	15.0	1.92	1.85	2.18	2.09

QuickGene システムを用いることで、タンパク質の混入の少ない高純度の total RNA 抽出ができた。

### カオトロピック塩の混入：A260/230

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/230			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
HL60	15.0	2.17	2.15	2.18	2.12

QuickGene システムを用いることで、カオトロピック塩の混入の少ない高純度の total RNA 抽出ができた。

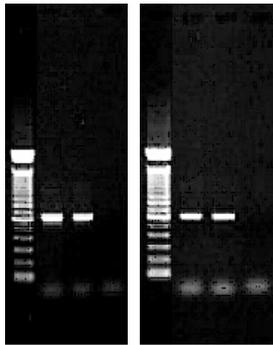
### その他

#### • RT-PCR

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて抽出した total RNA ( $10\text{pg}/\mu\text{l}$  あるいは  $1\text{pg}/\mu\text{l}$ ) 中の  $\beta$ -actin mRNA をテンプレートとして RT-PCR を行った。

HL60 ( $15 \times 10^6$  個の細胞)

10pg/ $\mu\text{l}$				1pg/ $\mu\text{l}$			
M	1	2	N	M	1	2	N



M：マーカー (100bp DNA Ladder : Invitrogen)

1：QuickGene

2：スピнкаラム法 (A 社)

N：ネガティブコントロール

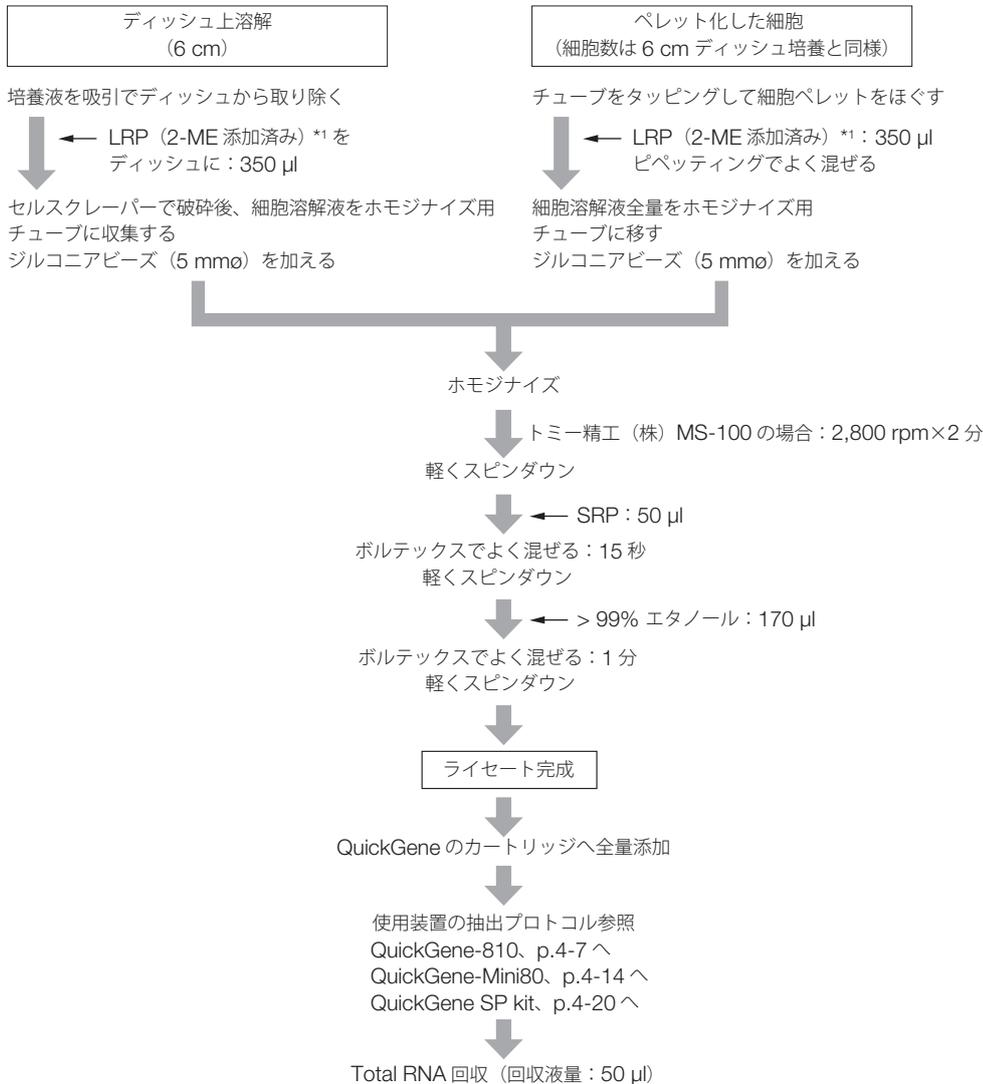
Total RNA ( $1\text{pg}/\mu\text{l}$ ) で行った RT-PCR に対して、増幅産物のバンドに似たバンドが両方のキットで検出された。

## 共通プロトコルサンプル

データなし

# NIH/3T3細胞からの total RNA 抽出 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

## プロトコル A



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRP に加えてください。  
1 ml の LRP 当たり 10 μl の 2-ME を加える。

## 結果

接着細胞を直接 6 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を抽出した。

### ■ 電気泳動図

データなし

### ■ Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	収量 ( $\mu\text{g}$ )	
		QuickGene	スピニング法 (A社)
NIH / 3T3	1.5	27.9	35.7

### ■ タンパク質の混入 : A260/280

データなし

### ■ カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

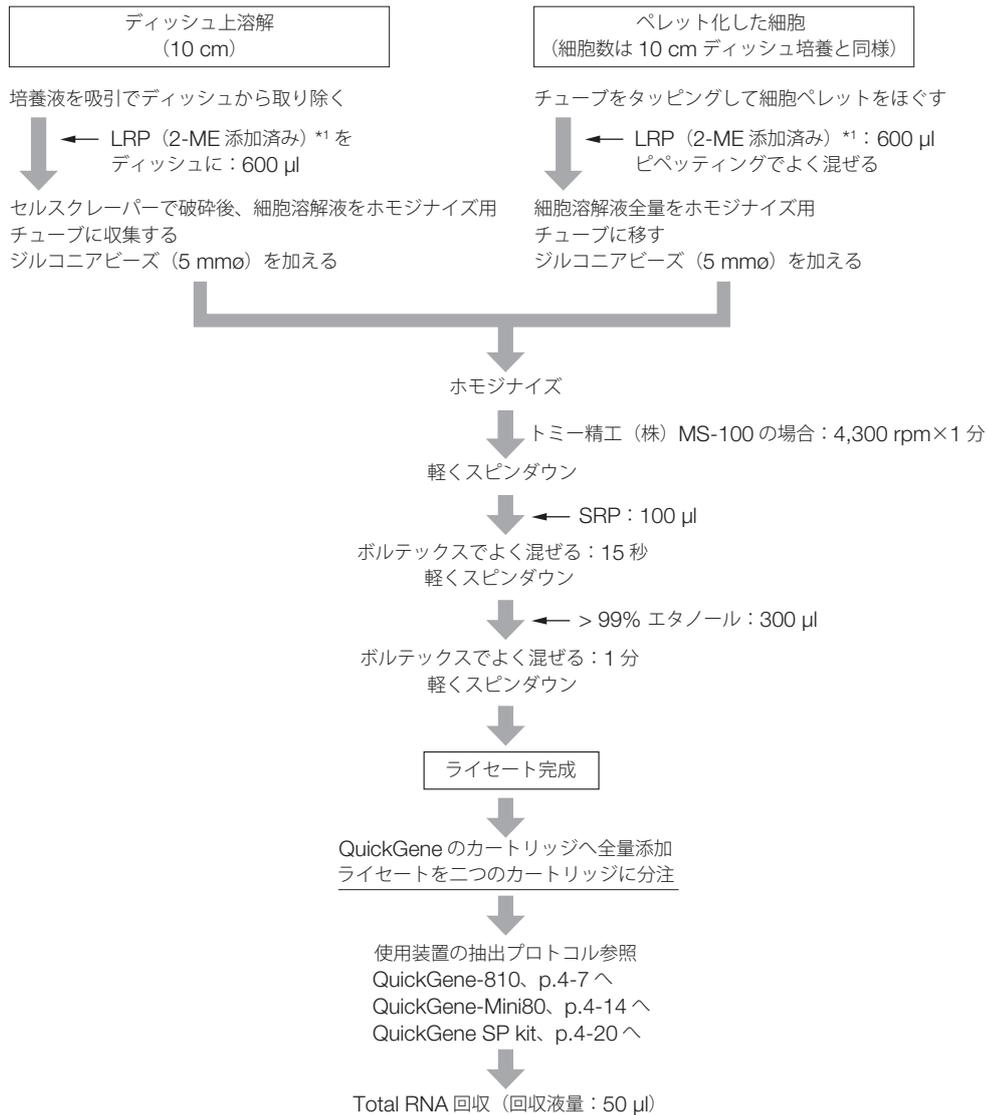
### ■ その他

データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 HEK293 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

## プロトコル B



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRP に加えてください。  
1 ml の LRP 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

## 結果

接着細胞を直接 10 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解し total RNA を抽出した。

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	収量 ( $\mu\text{g}$ )			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
NIH / 3T3	4.5	89.4	100.2	79.0	84.0

QuickGene システムを用いて、マイクロアレイ、ノーザンプロットングなどに必要な量の total RNA が得られた。

### タンパク質の混入：A260/280

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/280			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
NIH / 3T3	4.5	2.19	2.02	2.17	2.12

QuickGene システムを用いることで、タンパク質の混入の少ない高純度の total RNA 抽出ができた。

### カオトロピック塩の混入：A260/230

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/230			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
NIH / 3T3	4.5	2.02	2.26	1.94	1.75

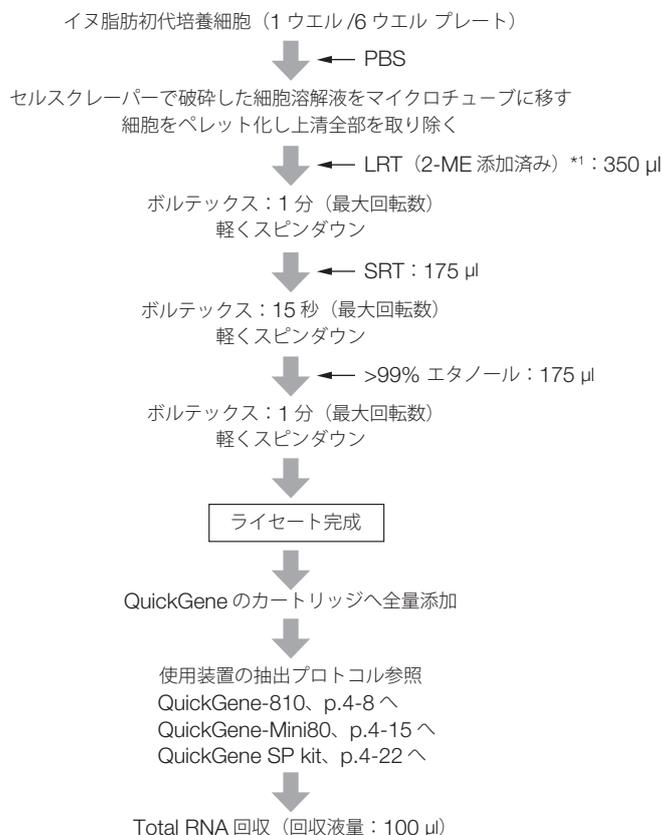
QuickGene システムを用いることで、カオトロピック塩の混入の少ない高純度の total RNA 抽出ができた。

### その他

データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 HEK293 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

**RG-16**
**イヌの脂肪初代培養細胞からの total RNA 抽出**
**プロトコル**


\*1 1 ml の LRT 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

**結果**
**電気泳動図**

データなし

**Total RNA の収量**

細胞数	QuickGene	競合 A キット
1 ウェル / 6 ウェル プレート	7.9 µg	1.3 µg

**タンパク質の混入 : A260/280**

細胞数	QuickGene	競合 A キット
1 ウェル / 6 ウェル プレート	2.04	2.67

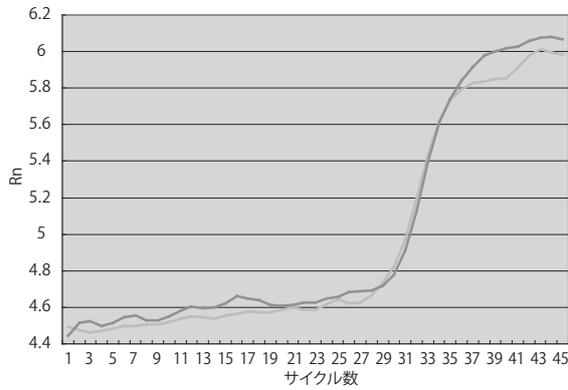
**カオトロピック塩の混入 : A260/230**

データなし

■ その他

● ワンステップ リアルタイム RT-PCR

QuickGene システムを用いてイヌの脂肪初代培養細胞から抽出した total RNA で、QuantiTect プローブ RT-PCR キット (QIAGEN) および ABI PRISM7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を使用してワンステップ リアルタイム RT-PCR を行い、GAPDH を増幅した。



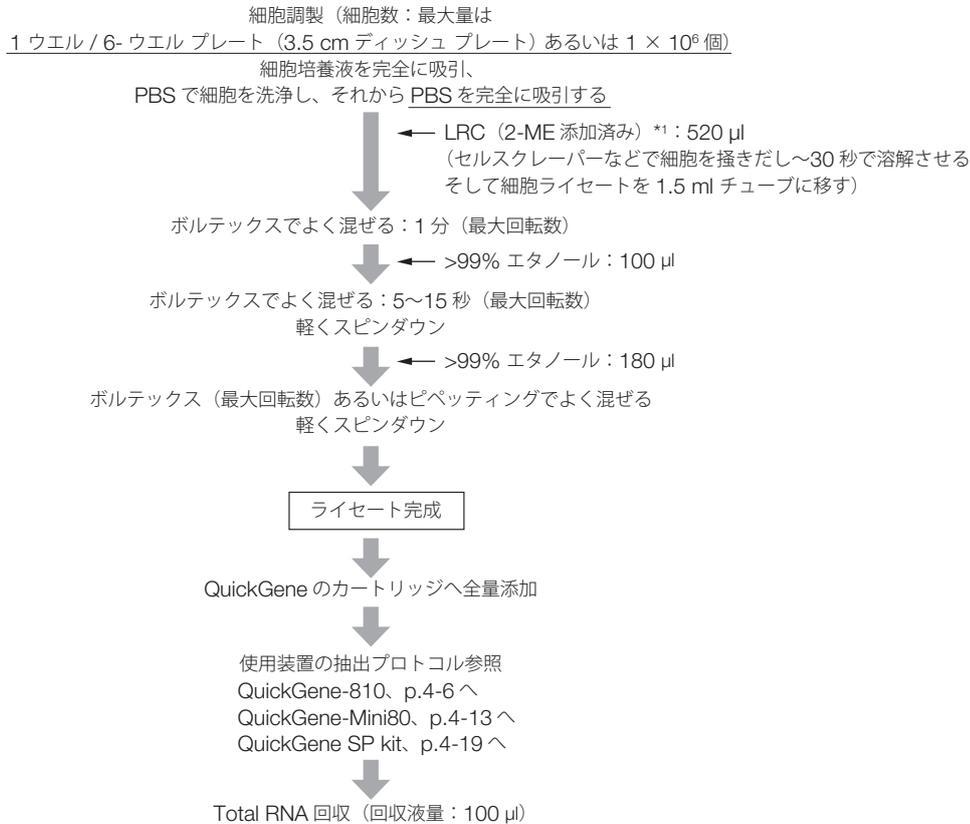
\* 両方とも、QuickGene システムで抽出した total RNA に対するデータである。

■ 共通プロトコルサンプル

データなし

## HuH-7 培養細胞からの total RNA 抽出（培養ディッシュでの直接溶解）

### プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

### 結果

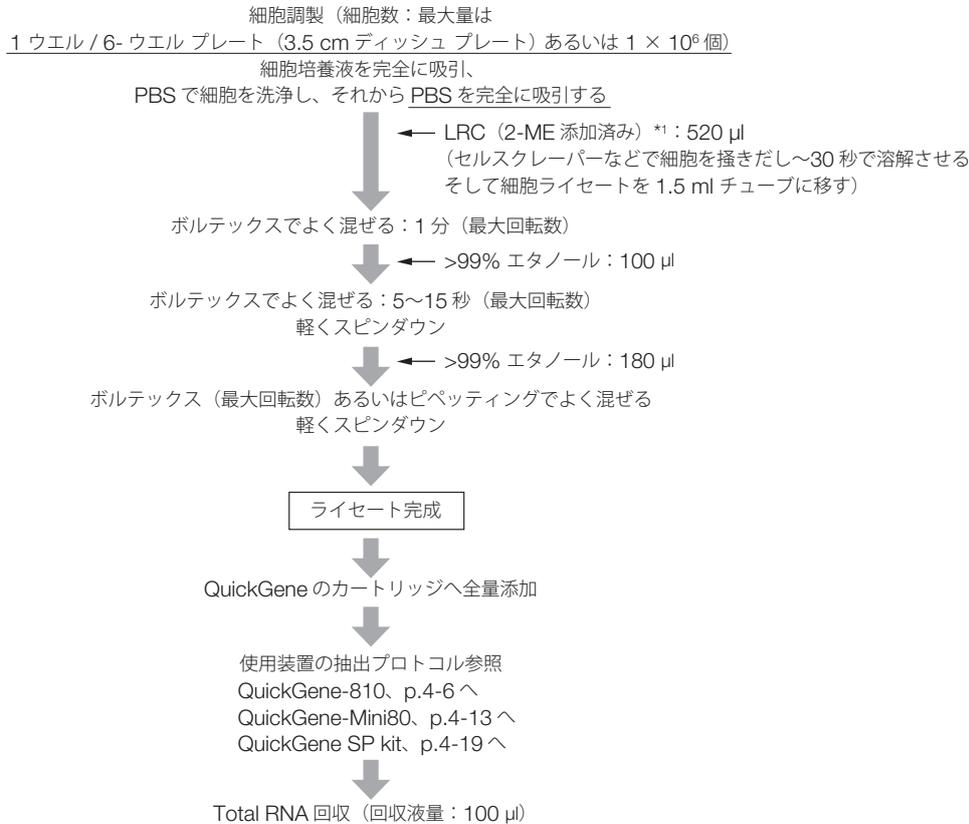
- 電気泳動図  
データなし
- Total RNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入：A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入：A260/230  
データなし
- その他
  - PCR  
PCR 成功

### 共通プロトコルサンプル

培養 MCF-7 細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養平滑筋細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養 PC12 細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養ブタ脂肪細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養水晶体上皮細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養歯根膜細胞（培養ディッシュでの直接溶解）

## MCF-7 培養細胞からの total RNA 抽出（培養ディッシュでの直接溶解）

### プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### Total RNA の収量

MCF-7 細胞数	収量 ( $\mu$ g)
$1 \times 10^6$	9.7

#### タンパク質の混入：A260/280

MCF-7 細胞数	A260/280
$1 \times 10^6$	2.06

#### カオトロピック塩の混入：A260/230

MCF-7 細胞数	A260/230
$1 \times 10^6$	2.10

#### その他

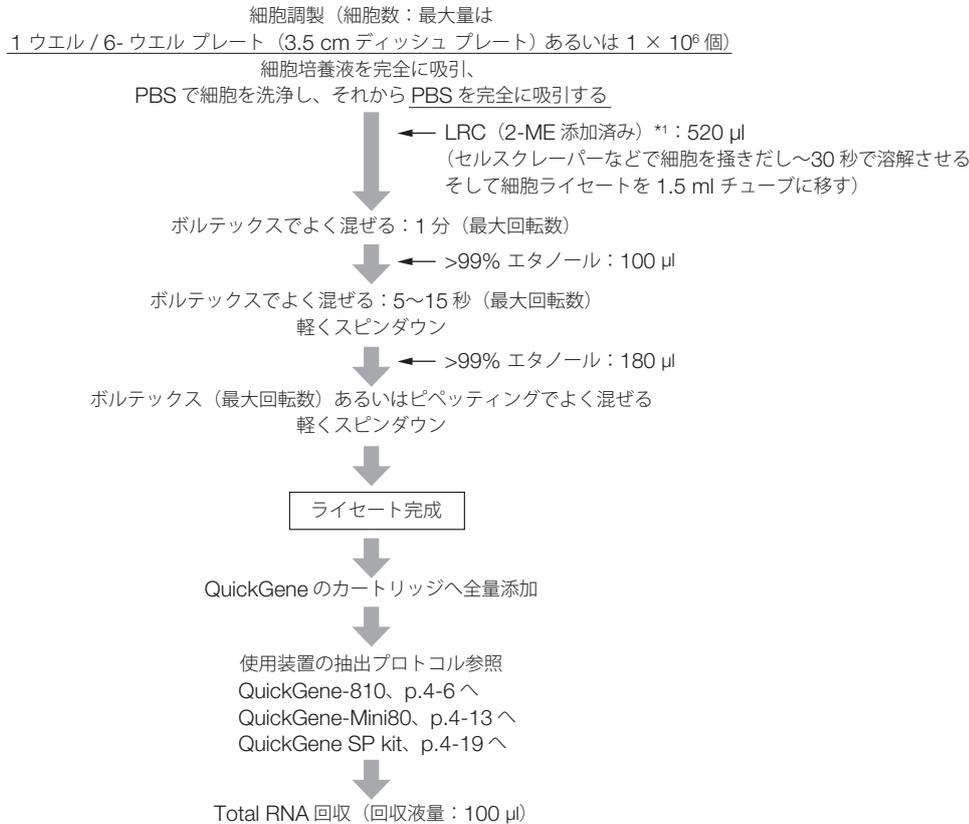
データなし

### 共通プロトコルサンプル

培養 HuH-7 細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養平滑筋細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養 PC12 細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養ブタ脂肪細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養水晶体上皮細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養歯根膜細胞（培養ディッシュでの直接溶解）

## PC12 培養細胞からの total RNA 抽出（培養ディッシュでの直接溶解）

### プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### Total RNA の収量

PC12 細胞数	収量 ( $\mu$ g)
$1 \times 10^6$	約 20.0

#### タンパク質の混入：A260/280

PC12 細胞数	A260/280
$1 \times 10^6$	1.75

#### カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

#### その他

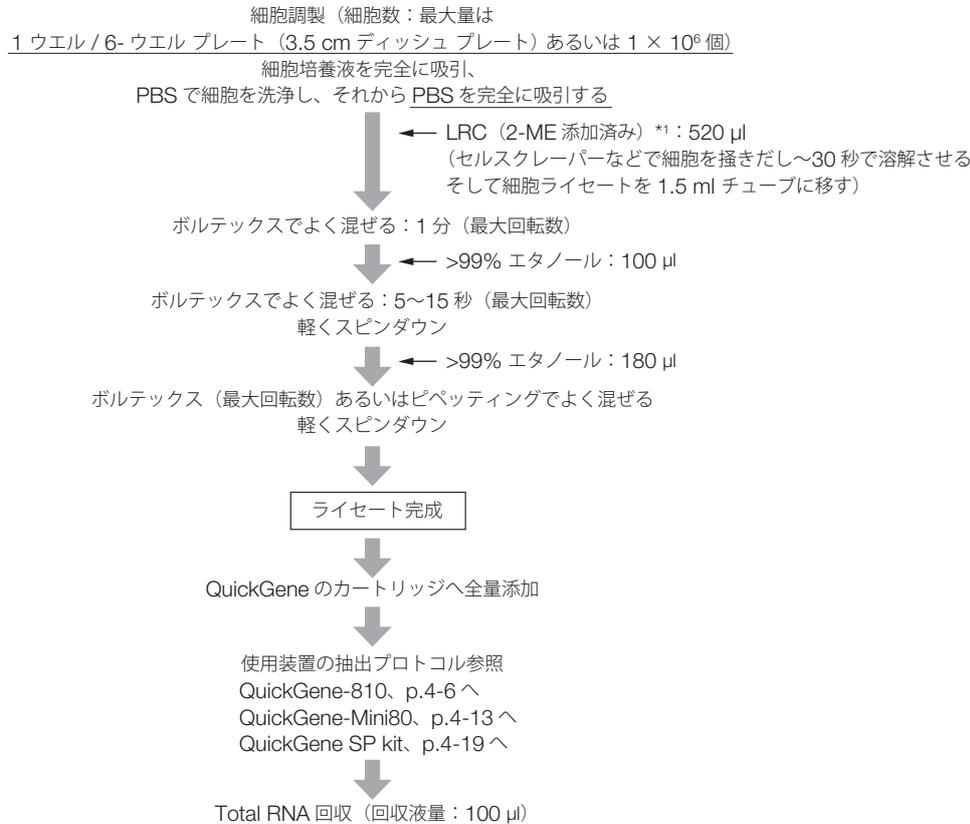
データなし

### 共通プロトコルサンプル

培養 MCF-7 細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養 HuH-7 細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養平滑筋細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養ブタ脂肪細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養水晶体上皮細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養歯根膜細胞（培養ディッシュでの直接溶解）

## 平滑筋培養細胞からの total RNA 抽出（培養ディッシュでの直接溶解）

### プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

### 結果

- 電気泳動図  
データなし
- Total RNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入：A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入：A260/230  
データなし
- その他  
データなし

### 共通プロトコルサンプル

培養 MCF-7 細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養 HuH-7 細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養 PC12 細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養ブタ脂肪細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養水晶体上皮細胞（培養ディッシュでの直接溶解）、培養歯根膜細胞（培養ディッシュでの直接溶解）

RG-21

DNA チップ“ジェノパール”<sup>®</sup>※のための培養細胞からの total RNA 抽出

プロトコル

アスピレーターを使用して、全ての培養上清を除去し、細胞をペレット化する  
( $1 \times 10^6$  個以上の細胞は使用しないでください)



← PBS : 20  $\mu$ l (凍結ペレットの場合に必要)

チューブを軽くタッピングし、ペレットを分散させる



← LRC (2-ME 添加済み) \*1 : 520  $\mu$ l

ホモジナイズ: ボルテックス  
ボルテックス (最大回転数) : 1分  
軽くスピンドウン (数秒)



← >99% エタノール : 100  $\mu$ l

ボルテックス (最大回転数) : 5 ~ 15 秒  
軽くスピンドウン (数秒)



← >99% エタノール : 180  $\mu$ l

ボルテックス (最大回転数)  
軽くスピンドウン (数秒)



ライセート完成



QuickGene のカートリッジにライセートの全量を添加



使用する機器によって、下記の抽出プロトコルを参照してください  
QuickGene-810 : p.4-8  
QuickGene-Mini80 : p.4-15



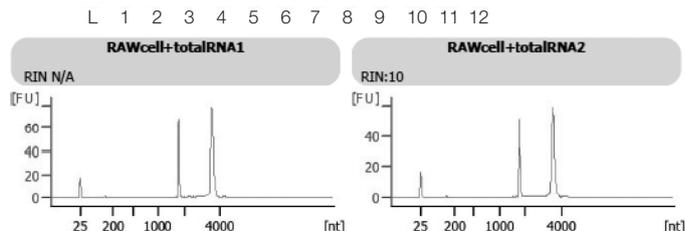
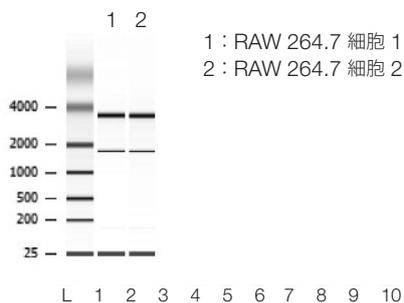
total RNA 回収 (溶出液量 : 50  $\mu$ l)

\*1 1 ml の LRT に対し、10  $\mu$ l の 2-ME を添加してください

結果

電気泳動図

QuickGene システムを用いて、RAW 264.7 細胞 (マウスマクロファージ細胞) から total RNA を抽出した。



2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.)

※ “ジェノパール”<sup>®</sup> は、三菱レイヨン株式会社の登録商標です。

## ■ total RNA の収量

サンプル	収量 (μg)	
	1	2
RAW 264.7	38.0	30.0

## ■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

## ■ カオトロピック塩の混入：A260/280

データなし

## ■ その他

データなし

## ■ 共通プロトコルサンプル

データなし

※ "ジェノパール®" は、三菱レイヨン株式会社の登録商標です。



## 3-XVIII 章

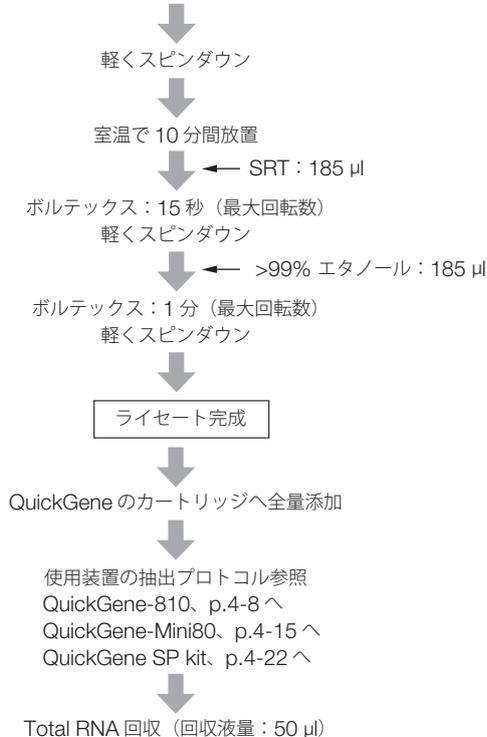
ウイルスからの total RNA抽出

---

## 血清からのC型肝炎ウイルス (Hepatitis C Virus (HCV)) RNA抽出

### プロトコル

200  $\mu$ l の LRT (2-ME 添加済み) \*2 に、10  $\mu$ l の 10 mg/ml キャリア RNA\*1 溶液と  
150  $\mu$ l の被験血清を添加してボルテックス：30 秒 (最大回転数)



\*1 キャリア RNA：血清中の RNase によるウイルス RNA 分解防止と微量 RNA の非特異的吸着防止のために入れる。PolyA RNA (Sigma-Aldrich 社) を用いた。会社：Sigma-Aldrich 名称：ポリアデニル酸カリウム塩 Catalog No. : P9403

\*2 1ml の LRT 当たり 10  $\mu$ l の 2-ME を加える。

### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ Total RNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入：A260/280

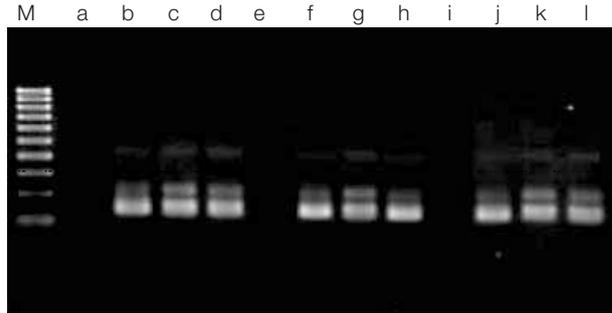
データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

● HCV ウイルス RNA の RT-PCR/nested PCR のよる検出

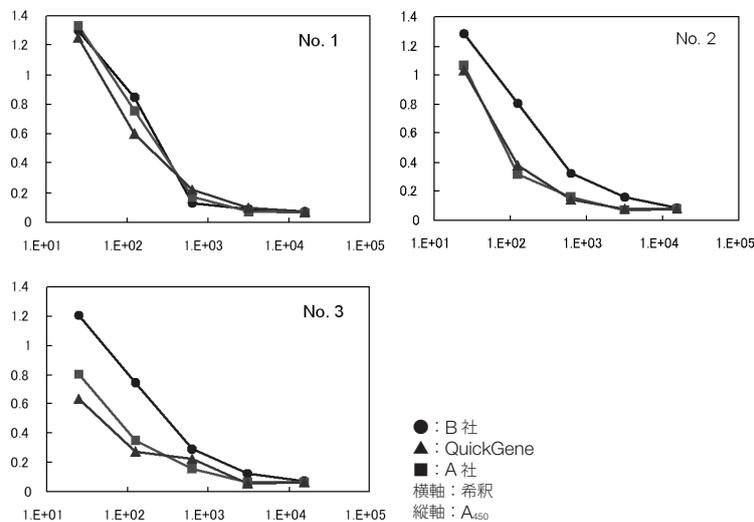


M : マーカー (100 bp ladder)  
 a, e, i : HCV 陰性健常人  
 b, f, j : HCV 陽性患者 No.1  
 c, g, k : HCV 陽性患者 No.2  
 d, h, l : HCV 陽性患者 No.3  
  
 a, d : QuickGene  
 e, h : A 社  
 i, l : B 社

QuickGene によって HCV 感染患者血清から調製した RNA を用いて、C 型肝炎 RNA を RT-PCR/nestedPCR 法によって検出することができた。

● HCV RNA の検出

QuickGene システム、A 社製品、B 社製品で得られた 3 種の RNA について AMPLICOR の検出システム (ハイブリダイゼーション法) を用いて HCV RNA の検出感度を検討した。



B 社との比較では、3 検体中 2 検体で最大で約 5 分の 1 の反応性の低さが認められた。一方、QuickGene と A 社製品で調製した RNA では、反応性には有意な差を認めなかった。この AMPLICOR との感度の乖離については、QuickGene および A 社では、分解した RNA の小断片は標品中に入っていないことが一因として考えられる。

QuickGene で調製した血清 RNA によって、通常の患者血清中の HCV RNA を十分な感度で検出できることが示された。

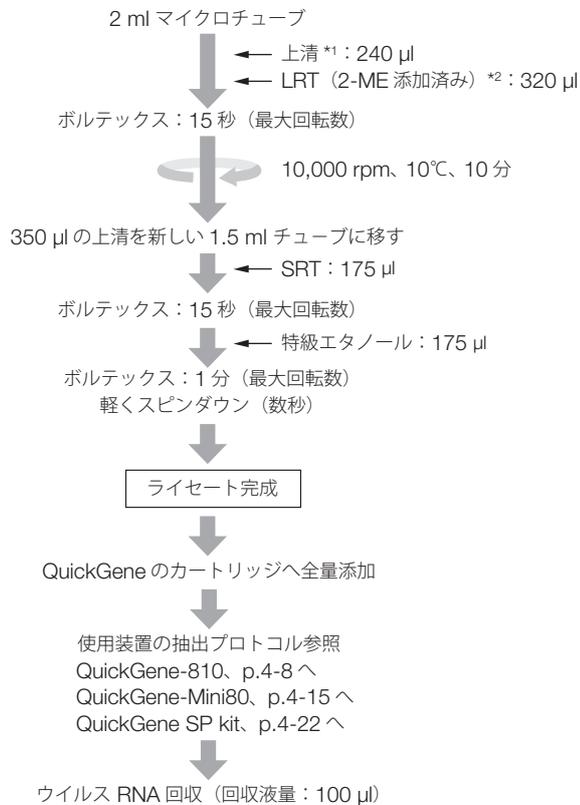
QuickGene では、AMPLICOR の RNA 調製プロトコルに含まれているイソプロパノール沈澱と遠心による回収などの煩雑な操作が不要であり、RNA 調製が容易となる。

■ 共通プロトコルサンプル

HIV

## 糞便からのノロウイルス RNA 抽出

### プロトコル A (PCR 法)



\*1 10% 乳剤 (糞便を PBS に添加) を遠心。

\*2 1 ml の LRT 当たり 10  $\mu$ l の 2-ME を加える。

### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ ウイルス RNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入: A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入: A260/230

データなし

■ その他

● 検査

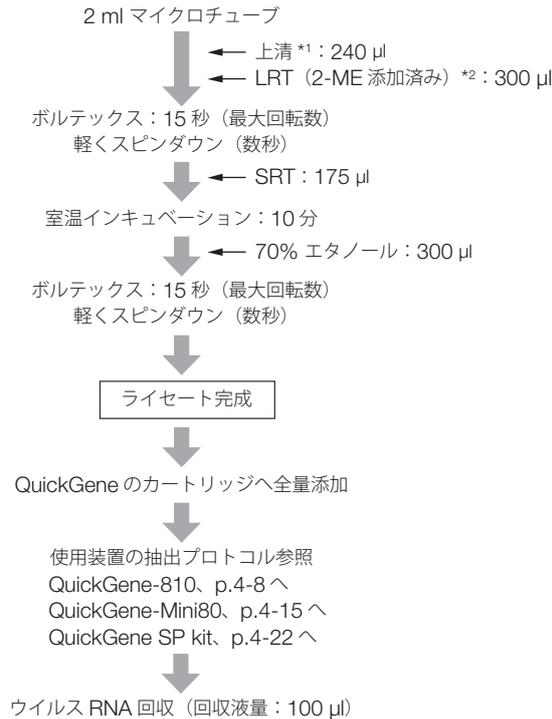
PCR 法 (厚生労働省認可 / 製薬・医療発明 2007 Nov. 5)

<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html>

### 共通プロトコルサンプル

データなし

## プロトコル B (TRC 法)



\*1 10% 乳剤 (糞便を PBS に添加) を選心。

\*2 1 ml の LRT 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

## 結果

### ■ 電気泳動図

データなし

### ■ ウイルス RNA の収量

データなし

### ■ タンパク質の混入 : A260/280

データなし

### ■ カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

### ■ その他

#### ● 検査

ノロウイルス検査 : トーソー コーポレーション TRCRapid-160 システム

<http://www.tosoh.co.jp/science/trc/real.html>

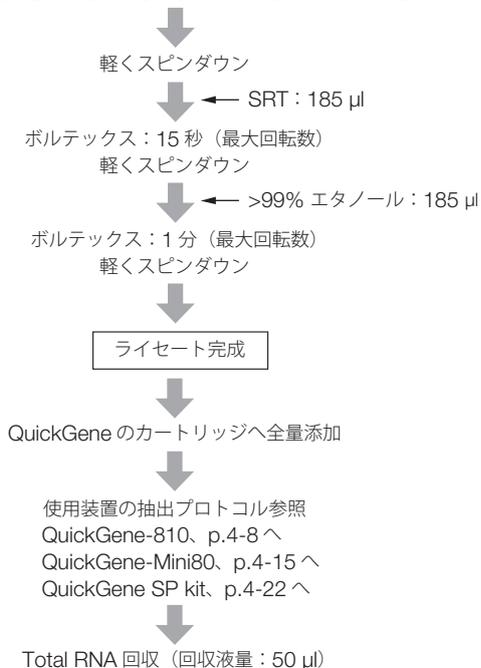
## 共通プロトコルサンプル

データなし

## HIV 患者血清および、HIV のウイルス粒子をスパイクしたヒト血清からの RNA 抽出と HIV RNA の検出限界

### プロトコル

200  $\mu$ l の LRT (2-ME 添加済み) \*2 に 10  $\mu$ l の 10 mg/ml キャリア RNA \*1 溶液と 150  $\mu$ l の血清を添加して、ボルテックス：30 秒（最大回転数）



\*1 キャリア RNA：精製された微量 RNA の非特異的吸着防止と血清中の RNase によるウイルス RNA 分解防止のために入れる。PolyA RNA (Sigma-Aldrich 社) を用いた。  
会社：Sigma-Aldrich  
名称：ポリアデニル酸カリウム塩  
Catalog No.：P9403

\*2 1 ml の LRT 当たり 10  $\mu$ l の 2-ME を加える。

### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ Total RNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

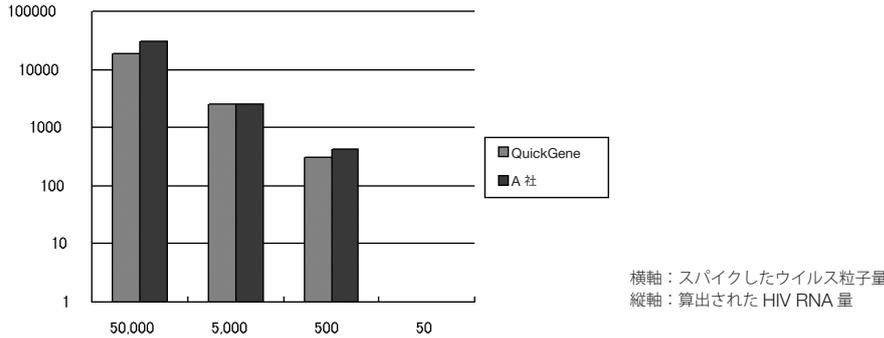
データなし

■ その他

● HIV のウイルス粒子をスパイクしたヒト血清からの HIV RNA の精製と検出限界

HIV のウイルス液をプールした健常ヒト血清に下表の濃度になるように添加した。上記プロトコルに従って QuickGene を用いて調製した RNA と A 社の標準プロトコルで抽出した RNA について、AMPLICOR の検出システム (PCR- ハイブリダイゼーション) を用いて HIV RNA を定量的に検出した。

スパイクしたウイルス量 (ウイルス粒子数 /ml)	算出値 (コピー /ml)	
	QuickGene	A 社
50,000	18623.6	30827
5,000	2467	2471.2
500	304.9	435.4
50	-6.6	-2.6

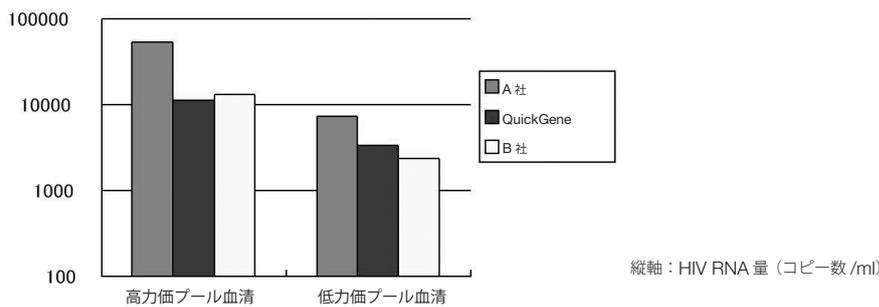


以上の結果から、QuickGene で抽出した RNA を用いて、A 社と同等の検出感度で HIV RNA を検出することができた。その感度は数百ウイルス粒子 /ml 程度であった。

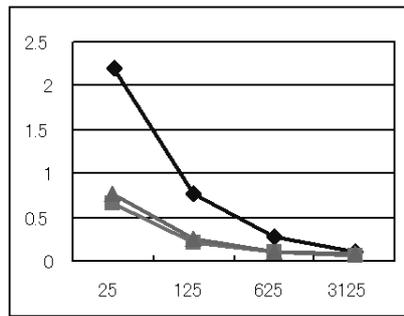
● HIV 患者血清からの HIV RNA の精製と検出

HIV 患者のプール血清 (高力価と低力価の 2 検体) から QuickGene、B 社の製品を用いて RNA を調製、AMPLICOR の検出システム (PCR- ハイブリダイゼーション) で HIV RNA を定量的に検出した。

	高力価プール血清	低力価プール血清
A 社	53908.8	7391.2
QuickGene	11178.6	3349.9
B 社	13157.2	2425.7

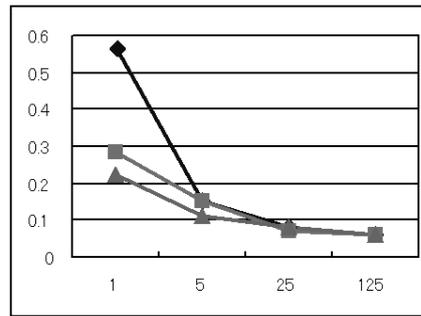


高力価プール血清



◆ : A社    ■ : QuickGene    ▲ : B社

低力価プール血清



横軸：PCR産物の希釈度  
縦軸：450 nmの吸光度

以上の結果から、患者血清での HIV RNA 検出に関しては、A社製品で最も強いレスポンスが得られた。QuickGeneとB社製品では同等のレスポンスが得られたが、A社製品の1/2から1/5程度であった。本検出法は、RNAコピー数のオーダーの算出が目的であり、1/2から1/5の乖離は実験間の誤差の範囲とみなしてよい。三者の値は同じオーダーの範囲に入っており、検出感度の点からは同等であると考えてよい。従って、QuickGeneを用いた本プロトコルでHIV患者血清からHIV RNAを定量的かつ高感度に検出できることが示された。

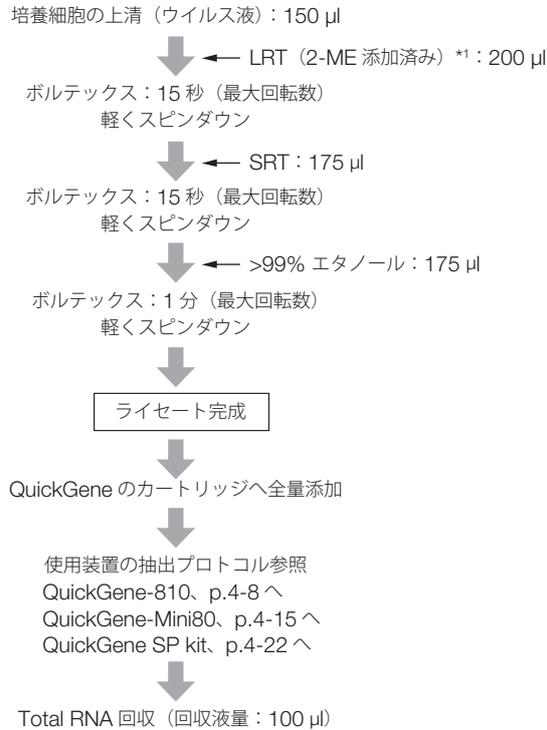
## 共通プロトコルサンプル

HCV

RH-4

# インフルエンザウイルス液からの total RNA 抽出

## プロトコル



\*1 1mlのLRT当たり10µlの2-MEを加える。

RH-4

## 結果

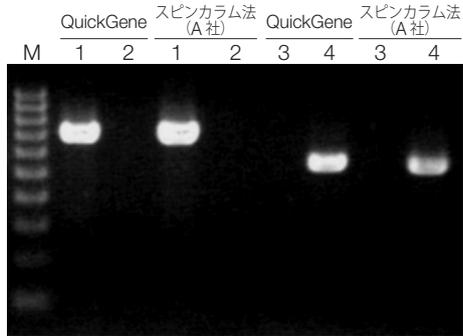
- 電気泳動図  
データなし
- Total RNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし

■ その他

● RT-PCR

QuickGene システムおよびスピナラム法 (A 社) を用いてインフルエンザウイルス液から抽出した total RNA で AH3 型インフルエンザ特異的プライマーと B 型インフルエンザ特異的プライマーを使用した RT-PCR を行った。

ウイルス型選択性の確認



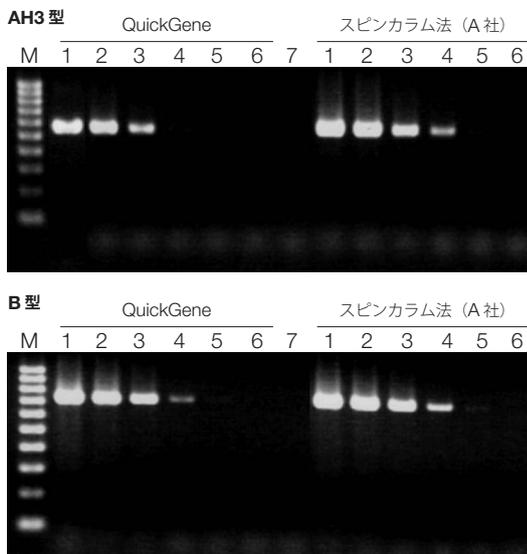
電気泳動条件：2.0% アガロース /1 × TAE

M：100 bp DNA Ladder  
 1：AH3 型インフルエンザウイルス RNA  
 2：B 型インフルエンザウイルス RNA  
 3：AH3 型インフルエンザウイルス RNA  
 4：B 型インフルエンザウイルス RNA

プライマー：1,2 AH3 型インフルエンザ特異的プライマー  
 3,4 B 型インフルエンザ特異的プライマー

各 total RNA は特異的プライマーでのみ RT-PCR 産物が検出された。

ウイルス RT-PCR の確認



電気泳動条件：2.0% アガロース /1 × TAE

M：100 bp DNA Ladder  
 1：インフルエンザウイルス、 $10^6$  pfu/ml  
 2：インフルエンザウイルス、 $10^5$  pfu/ml  
 3：インフルエンザウイルス、 $10^4$  pfu/ml  
 4：インフルエンザウイルス、 $10^3$  pfu/ml  
 5：インフルエンザウイルス、 $10^2$  pfu/ml  
 6：インフルエンザウイルス、10 pfu/ml  
 7：ネガティブコントロール

各 total RNA から AH3 型インフルエンザと B 型インフルエンザの RT-PCR 産物が検出された。

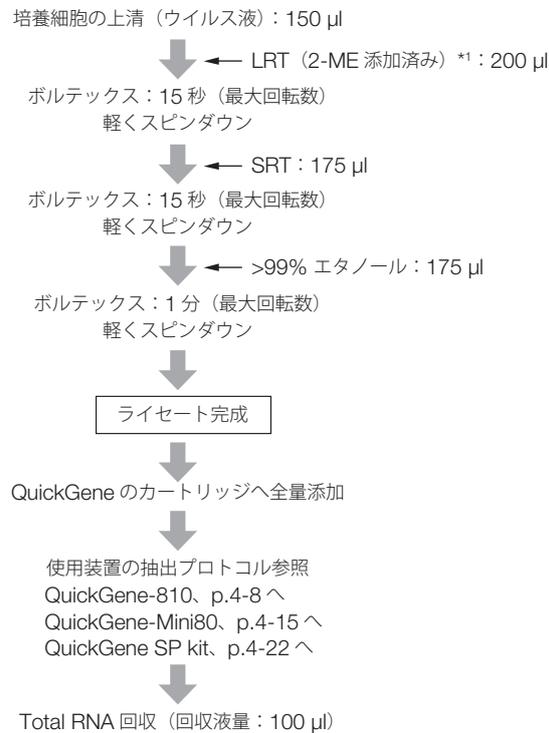
■ 共通プロトコルサンプル

麻疹ウイルス、RS ウイルス

RH-5

## 麻疹ウイルス液からの total RNA 抽出

### プロトコル



\*1 1 ml の LRT 当たり 10 μl の 2-ME を加える。

RH-5

### 結果

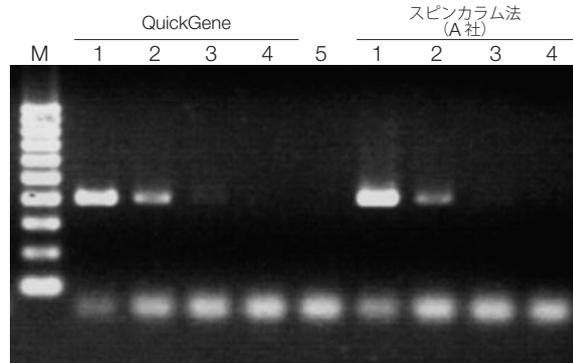
- 電気泳動図  
データなし
- Total RNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230  
データなし

■ その他

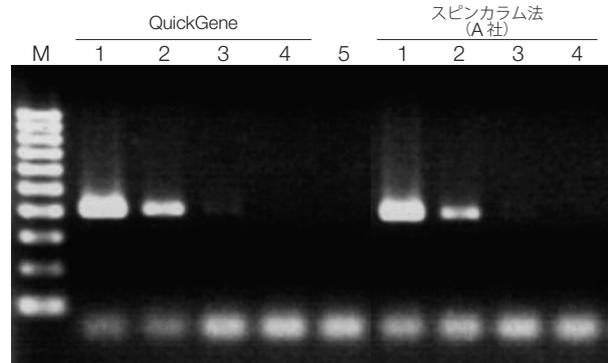
● RT-PCR

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A社) を用いて麻疹ウイルス液から抽出した total RNA でウイルスヘマグルニチン (HA) に特異的なプライマーを使用した RT-PCR を行った。

Edmonston 株 (実験室株)



AK-1 株 (野外株)



電気泳動条件：2.0% アガロース / 1 × TAE

M：100bp DNA Ladder

- 1：麻疹ウイルス、 $10^5$  pfu/ml
- 2：麻疹ウイルス、 $10^4$  pfu/ml
- 3：麻疹ウイルス、 $10^3$  pfu/ml
- 4：麻疹ウイルス、 $10^2$  pfu/ml
- 5：ネガティブコントロール

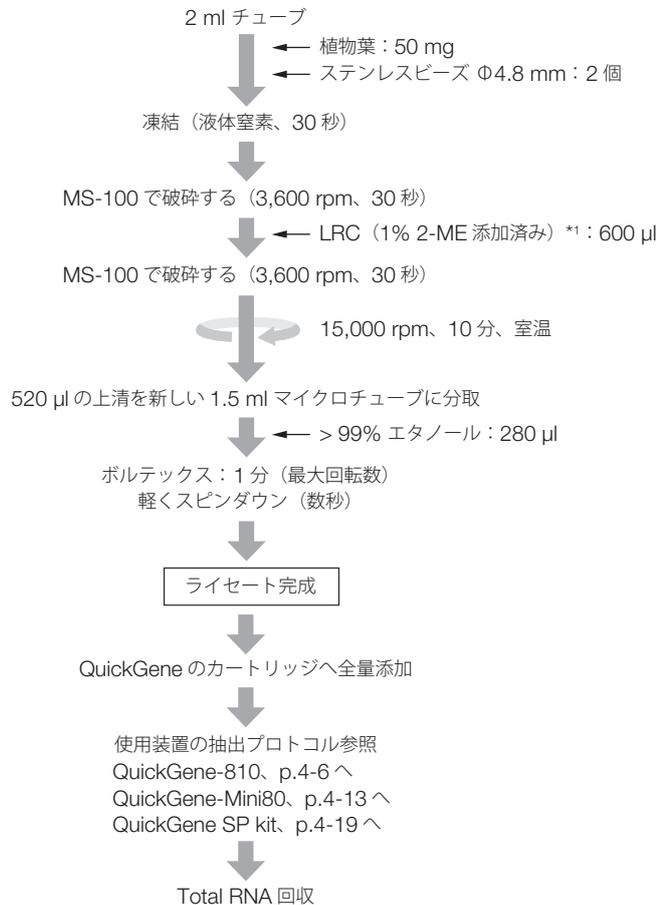
いずれの total RNA からでも HA の RT-PCR 産物を検出できた。

■ 共通プロトコルサンプル

インフルエンザウイルス、RS ウイルス

## 植物ウイルスからの total RNA 抽出

### プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10 μl の 2-ME を加える。

### 結果

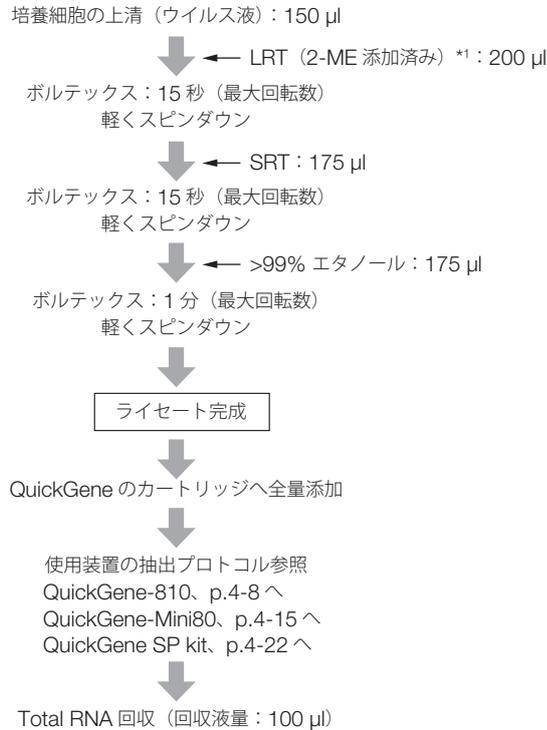
- 電気泳動図  
データなし
- Total RNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入：A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入：A260/230  
データなし
- その他  
データなし

### 共通プロトコルサンプル

データなし

## RS (*Respiratory Syncytial*) ウイルス液からの total RNA 抽出

### プロトコル



\*1 1 ml の LRT 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

### 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ Total RNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入 : A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入 : A260/230

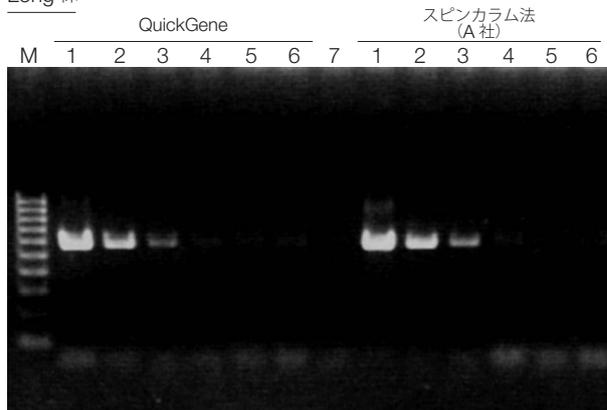
データなし

■ その他

● RT-PCR

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて RS ウイルス液から抽出した total RNA で、RS ウイルスの G タンパク質遺伝子に特異的なプライマーを使用した RT-PCR を行った。

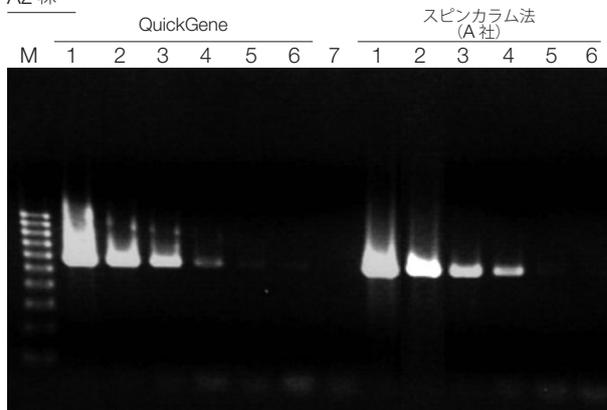
Long 株



電気泳動条件：2% アガロース / 1 × TAE

- M : 100 bp DNA Ladder
- 1 : RC ウイルス、 $10^5$  pfu/ml
- 2 : RC ウイルス、 $10^4$  pfu/ml
- 3 : RC ウイルス、 $10^3$  pfu/ml
- 4 : RC ウイルス、 $10^2$  pfu/ml
- 5 : RC ウイルス、10 pfu/ml
- 6 : RC ウイルス、1 pfu/ml
- 7 : ネガティブコントロール

A2 株



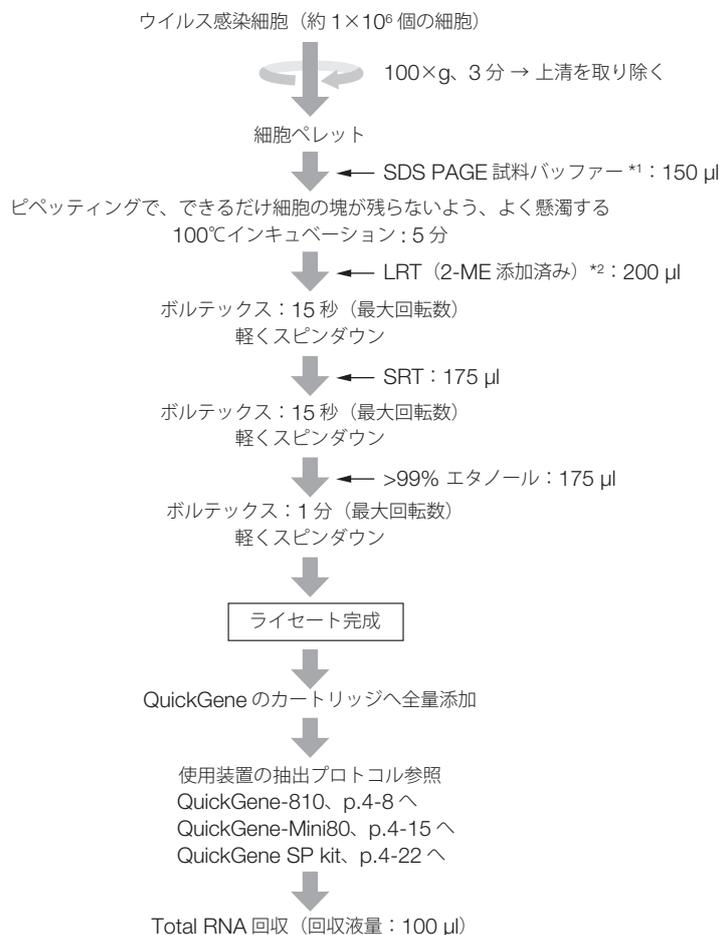
いずれの total RNA からでも RS ウイルスの G タンパク質遺伝子の RT-PCR 産物を検出できた。

共通プロトコルサンプル

麻疹ウイルス、インフルエンザウイルス

# SARS コロナウイルス (SARS-CoV) 感染細胞からの total RNA 抽出

## プロトコル



\*1 試料バッファーの組成:  
0.125 M トリス - 塩酸 (pH 6.8)、  
10% (v/v) 2-メルカプトエタノール、  
4% (w/v) SDS、10% (v/v) グリセロール、0.01% (w/v) プロモフェノールブルー

\*2 1 ml の LRT 当たり 10 μl の 2-ME を加える。

## 結果

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

サンプル	No.1	No.2
QuickGene	9.4 μg	7.1 μg
スピнкаラム法 (A 社)	7.6 μg	7.8 μg

### タンパク質の混入: A260/280

サンプル	No.1	No.2
QuickGene	1.93	1.90
スピнкаラム法 (A 社)	1.80	1.88

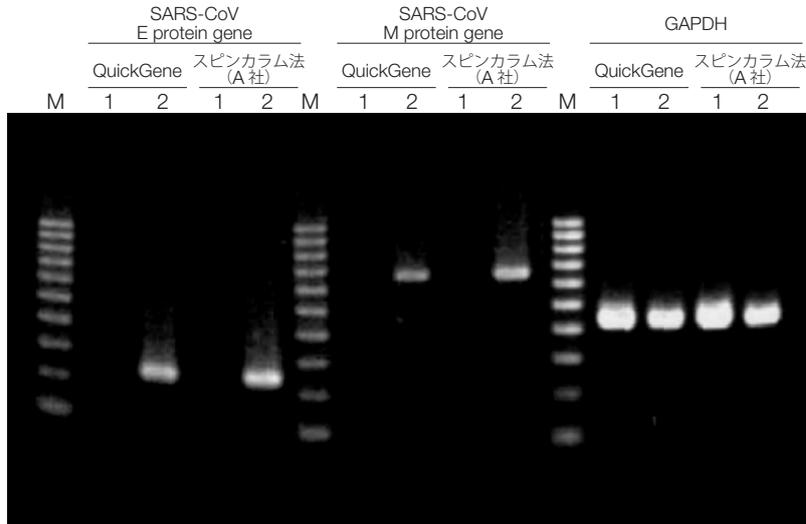
### カオトロピック塩の混入: A260/230

データなし

■ その他

● RT-PCR

QuickGene システムおよびスピンカラム法 (A 社) を用いて SARS-CoV 感染細胞から抽出した total RNA で、SARS-CoV の E タンパク質遺伝子と M タンパク質遺伝子、GAPDH 遺伝子に特異的なプライマーを使用した RT-PCR を行った。



電気泳動条件：  
2% アガロース / 1 × TAE

M : 100 bp DNA Ladder  
1 : No.1 非感染 Caco-2 細胞  
2 : No.2 SARS-CoV 感染 Caco-2 細胞

いずれの SARS-CoV 細胞 total RNA からも SARS-CoV の E タンパク質遺伝子と M タンパク質遺伝子の RT-PCR 産物を検出できた。

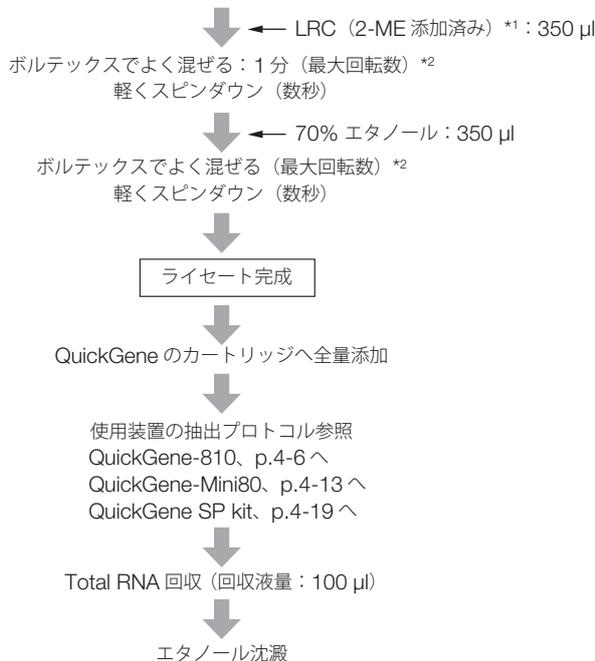
■ 共通プロトコルサンプル

データなし

# サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染細胞からのウイルス RNA 抽出

## プロトコル

細胞を 1.5 ml マイクロチューブに入れ、ペレット化する (1.5 ml チューブ中の $\sim 1 \times 10^6$  個の細胞)



\*1 1 ml の LRC 当たり 10 μl の 2-ME を加える。

\*2 最大回転数ボルテックスで完全に混合してください。ボルテックスで混合不十分ならば、タッピング、ピペティングあるいは転倒を使用してください。

## 結果

### 電気泳動図

データなし

### ウイルス RNA の収量 (μg)

ウイルス	実験 1			実験 2			
	mock	SIV clone 1	SIV clone 2	mock		SIV clone 2	
QuickGene-810	5.6	3.8	7.0	8.0	3.6	6.0	9.5
スピнкаラム	-	-	-	7.1	0.8	4.5	4.7

### タンパク質の混入 : A260/280

ウイルス	実験 1			実験 2			
	mock	SIV clone 1	SIV clone 2	mock		SIV clone 2	
QuickGene-810	1.86	1.82	1.84	1.90	1.86	1.77	1.91
スピнкаラム	-	-	-	1.92	1.66	1.82	1.88

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

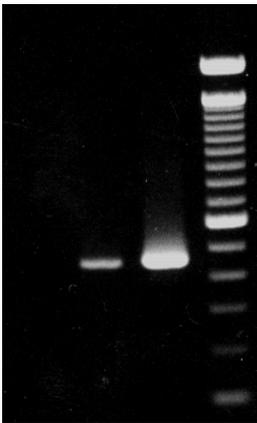
■ その他

● RT-PCR

SIV clone 1 あるいは SIV clone 2 感染細胞から抽出した SIV-RNA 使用の RT-PCR の AGE

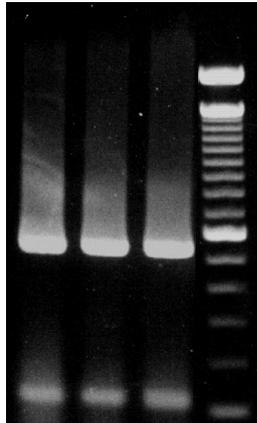
実験 1 : SIV clone 1 あるいは SIV clone 2 感染細胞からの SIV-RNA 検出

mock clone1 clone2



env  
458bp

mock clone1 clone2



GAPDH  
588bp

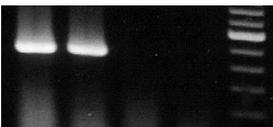
1 µg の抽出 total RNA を使用して RT-PCR を行った。

Total RNA を用いて RT-PCR 増幅に成功した。

SIV clone 2 には SIV clone 1 よりも高い伝染性があるので、より多量の SIV-RNA が SIV clone 2 感染細胞から抽出できる。

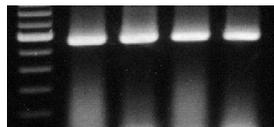
実験 2 : QuickGene-810 とスピнкаラムの比較

SIVclone2    mock  
F    A    F    A



env  
458bp

SIVclone2    mock  
F    A    F    A



GAPDH  
588bp

F : QuickGene-810

A : スピнкаラム

env および GAPDH 遺伝子増幅のための RT-PCR テンプレートに、抽出した S2V-RNA を用いた。

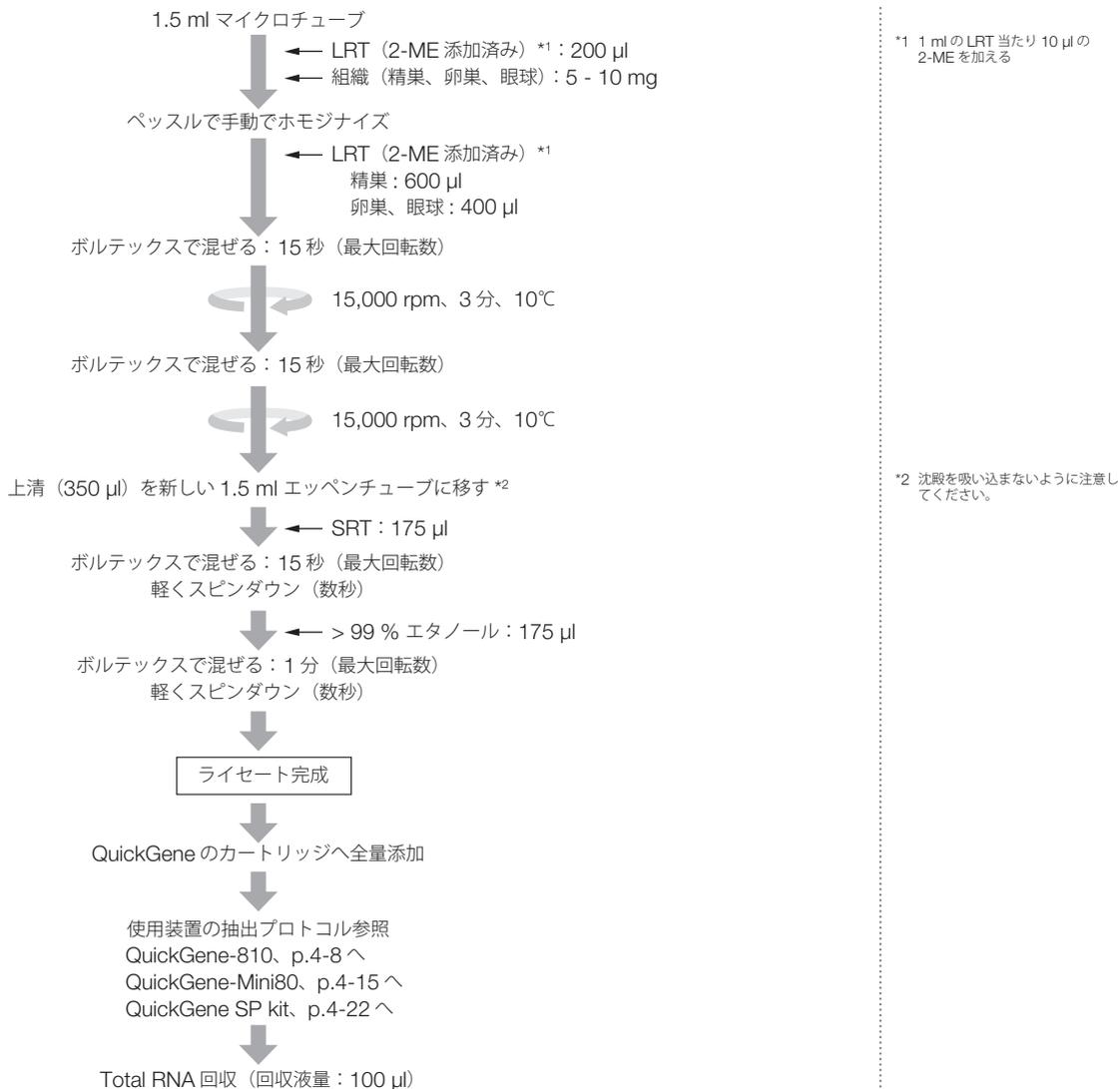
■ 共通プロトコルサンプル

データなし

**RH-10**

# アマダイからの VNN (ウイルス性神経壊死症 (Viral Nervous Necrosis)) RNA 抽出

## プロトコル



## 結果

■ 電気泳動図

データなし

■ Total RNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入 : A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

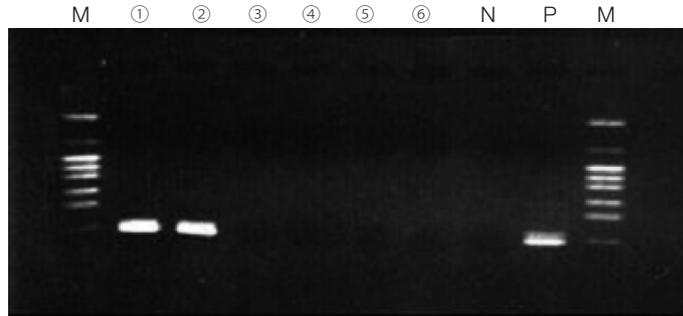
■ その他

● RT-PCR

RT-PCR：抽出した RNA で RGNNV 外皮タンパク遺伝子の T4 領域をターゲットにし、増幅を行った。

Nested PCR：4つのベータノダウイルスの遺伝子型のうち、RG型に特異的なプライマーを用いて増幅を行った。

サンプル：天然アマダイ ♀ 3尾、卵巣、眼球（各部位は同一個体から採取）

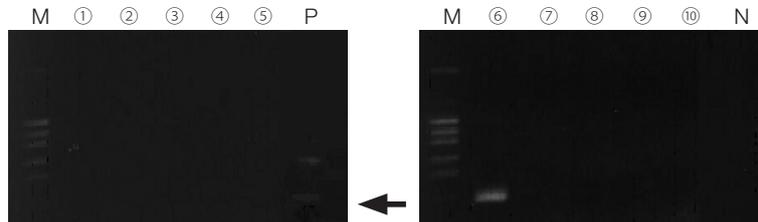


M：pHY マーカー（タカラバイオ社製）  
 ①：アマダイ No.1 卵巣  
 ②：アマダイ No.2 卵巣  
 ③：アマダイ No.3 卵巣  
 ④：アマダイ No.1 眼球  
 ⑤：アマダイ No.2 眼球  
 ⑥：アマダイ No.3 眼球  
 N：ネガティブコントロール  
 P：ポジティブコントロール

結果：No.1、2の卵巣でポジティブコントロールと同様の増幅産物が確認された。

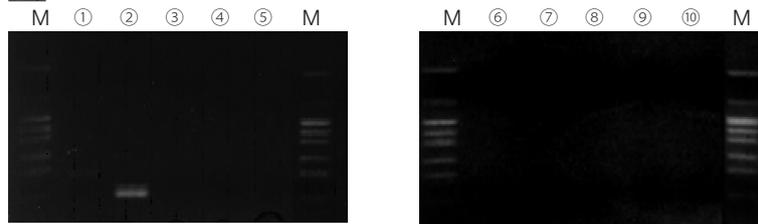
サンプル：天然アマダイ ♂ 10尾、精巣、眼球（各部位は同一個体から採取）

精巣



M：pHY マーカー（タカラバイオ社製）  
 ① - ⑩：アマダイ No.1 精巣～No.10 精巣  
 N：ネガティブコントロール  
 P：ポジティブコントロール

眼球



M：pHY マーカー（タカラバイオ社製）  
 ① - ⑩：アマダイ No.1 眼球～No.10 眼球

結果：No.6の精巣とNo.2の眼球から増幅産物が確認された。

■ 共通プロトコルサンプル

データなし

