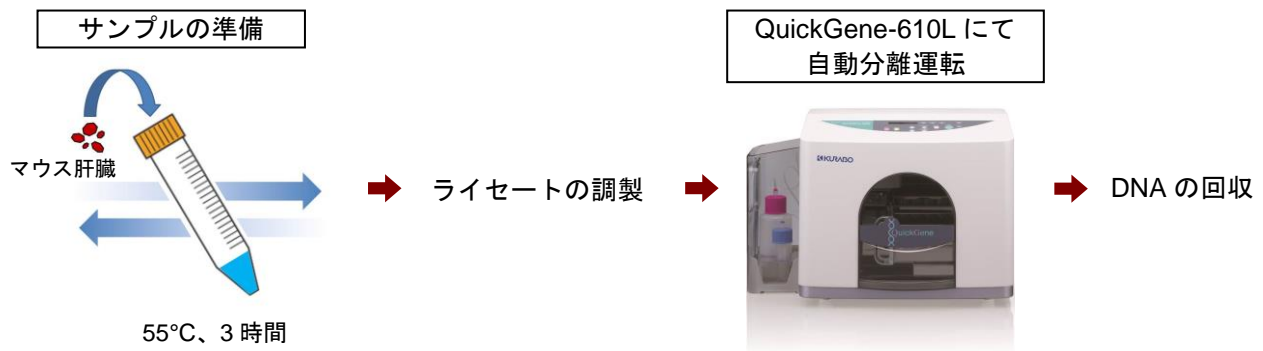


QuickGene DNA tissue kit L

**マウス肝臓からのゲノム DNA 分離精製
~ DNA extraction from mouse liver ~**

QuickGene-610L と DNA 組織キット L (DT-L)を用いて、マウス肝臓最大 100mg からゲノム DNA が分離精製できます。



実 験

サンプル	マウス肝臓 (BALB/C ♀、-80°C 凍結保存サンプル)
サンプル量	5~150mg / 1 サンプル
分離システム	核酸自動分離システム QuickGene-610L 「DNA TISSUE」モード
試薬キット と消耗品	DNA 組織キット L (QuickGene DNA tissue kit L) 1.5ml マイクロチューブ、15ml または 50ml 遠沈管
分離精製原理	多孔質メンブレンを用いたフィルター吸着方式
RNase	R4642 - Ribonuclease A from bovine pancreas (24mg/ml, Sigma-Aldrich)

サンプルの準備

- (1) 凍結保存したマウス肝臓を 5mm 角以下にハサミで細断する。
- (2) サンプルを秤量し、15ml 遠沈管に移す。
- (3) 試薬 (1 サンプルあたり MDT 1.8ml + EDT 0.2ml) を、サンプルの入った 15ml チューブに添加し、軽く転倒混和して、サンプルと試薬をなじませる。
- (4) 55°C で 3 時間*、シェーカーで水平攪拌しながら組織を溶解させる。
- (5) 組織溶解後、遠心分離 (3,500rpm、3 分間) し、上清を別のチューブに移して残渣分 (溶け残り、ゼラチン状のもの) を除去する。

*組織溶解のための加温時間は、組織の種類により異なります。

ライセートの調製と QuickGene-610L による自動分離運転

- (1) 組織溶解液 2ml を新しい 15ml 遠沈管に入れる。
- (2) (オプション) RNase 処理をしない場合は (3) へ進む。
RNase A を 0.1ml 添加し、ボルテックスを 5 秒間行う。室温にて 2 分間インキュベーションする。
- (3) 組織溶解液に LDT を 1.8ml 添加し、遠沈管をすぐに上下に 10 回激しく振とう混和する。
- (4) ボルテックス® 等の攪拌機で最大回転数にて 15 秒間攪拌する。
- (5) 70°C にて 10 分間インキュベーションする。
- (6) エタノール (99.5%以上) を 2.4ml 添加し、遠沈管をすぐに上下に 10 回激しく振とう混和する。
- (7) ボルテックス® 等の攪拌機で最大回転数にて 15 秒間攪拌する。ライセート完成。
- (8) ライセート全量を QuickGene-610L 上のカートリッジへ添加する。
- (9) 自動分離運転を開始する (「DNA TISSUE」モード)。
- (10) ゲノム DNA を回収する (500µl で溶出)。

分析方法

収量と純度： 微量分光光度計により各々の DNA 溶液の 260nm の吸光度を測定。

- ・ DNA 収量は「A260 x 50 x 希釈率 x 最終溶解量」にて算出。
- ・ DNA 純度は A260/280 及び A260/230 の値より確認。

蛍光光度計によりサンプル中の dsDNA を定量。

電気泳動： 分離 DNA 溶液 5µl を 1% agarose gel にて電気泳動。

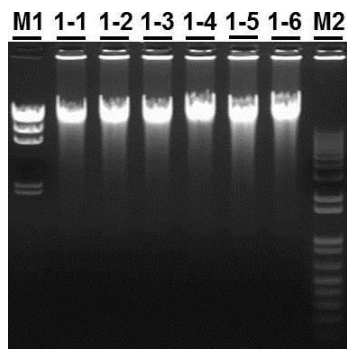
実験 1. 分離 DNA の均一性確認

同一バッチ内での分離 DNA の収量及び純度について、均一性を確認するため、マウス肝臓 100mg x6 サンプルを標準プロトコールで分離した。

収量と純度

サンプル		分光光度測定				蛍光光度測定	
No.	組織量 (mg)	カオトロピック 塩の混入 (A260/230)	タンパク質 の混入 (A260/280)	濃度 (ng/µl)	収量 (µg)	濃度 (ng/µl)	収量 (µg)
1-1	100	2.207	1.874	167.5	83.7	184.3	92.1
1-2		2.189	1.857	198.1	99.0	197.1	98.6
1-3		2.221	1.854	209.3	104.6	194.4	97.2
1-4		2.233	1.880	204.3	102.2	208.5	104.3
1-5		2.234	1.886	237.6	118.8	212.0	106.0
1-6		2.236	1.863	242.6	121.3	198.3	99.1
CV値		0.8%	0.7%	13.2%		5.0%	

電気泳動



M1: TrackIt™ λ DNA/*Hind* III Fragments (Life Technologies)

1-1: 組織量 100mg

1-2: 組織量 100mg

1-3: 組織量 100mg

1-4: 組織量 100mg

1-5: 組織量 100mg

1-6: 組織量 100mg

M2: TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies)

収量、純度とも均一な DNA を分離できました。

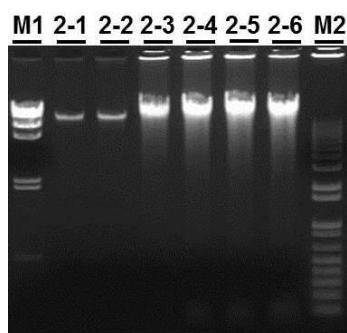
実験 2. 対応組織量の検討

本キットを用いて処理可能な最小・最大組織量を検討するため、マウス肝臓 5mg、10mg、50mg、100mg、125mg、150mg から分離をおこなった。

収量と純度

サンプル		分光光度測定				蛍光光度測定	
No.	組織量 (mg)	カオトロピック塩の混入 (A260/230)	タンパク質の混入 (A260/280)	濃度 (ng/μl)	収量 (μg)	濃度 (ng/μl)	収量 (μg)
2-1	5	2.190	1.725	11.2	5.6	17.1	8.5
2-2	10	2.067	1.809	22.9	11.5	26.6	13.3
2-3	50	2.181	1.862	104.9	52.5	108.8	54.4
2-4	100	2.164	1.900	175.9	88.0	156.9	78.4
2-5	125	2.193	1.918	189.3	94.7	189.2	94.6
2-6	150	2.158	1.939	182.7	91.4	175.0	87.5

電気泳動



M1: TrackIt™ λ DNA/*Hind* III Fragments (Life Technologies)

2-1: 組織量 5mg

2-2: 組織量 10mg

2-3: 組織量 50mg

2-4: 組織量 100mg

2-5: 組織量 125mg

2-6: 組織量 150mg

M2: TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies)

マウス肝臓 5~125mg で、組織量に応じた DNA 収量が得られました。

実験 1、2 とも、分光光度計と蛍光光度計による測定値の差がほとんど無いことから、RNA の混入率も少ないと考えられます。

※組織量 5～150mg からゲノム DNA を分離しましたが、125mg、150mg では収率低下や目詰まりの危険性が見られたため、マウス肝臓では組織量 5～100mg の範囲でご使用いただきますようお願い致します。

※お客様がお使いになるサンプルによっては、収率低下や目詰まりを引き起こす可能性がございます。本データを参考に、組織量、組織溶解加温時間等をご検討下さい。

製品情報

DNA 分離システム： 核酸自動分離システム QuickGene-610L

「DNA TISSUE」モード

分離キット： DNA 組織キット L (QuickGene DNA tissue kit L)

本資料に記載されている商品名は、各社の商標または登録商標です。

倉敷紡績株式会社

バイオメディカル部

〒572-0823

大阪府寝屋川市下木田町 14-5

電話: 072-820-3079

Fax: 072-820-3095

URL; <http://www.kurabo.co.jp>