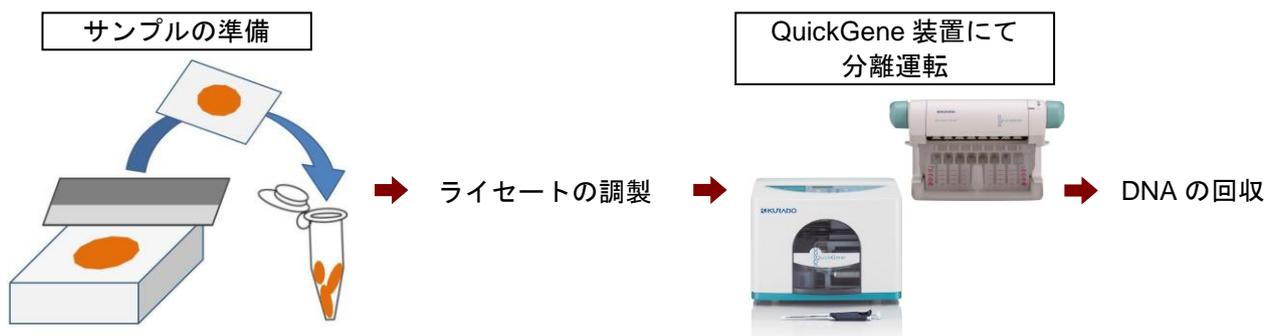


QuickGene DNA tissue kit S

**ホルマリン固定パラフィン包埋組織からのゲノム DNA 分離精製
~ DNA extraction from FFPE tissue ~**

DNA 組織キット S (DT-S)を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織から DNA を分離することができます。



実験

サンプル	FFPE 組織薄切片 (ヒト乳腺癌細胞由来担癌マウス癌組織*)
サンプル量	5µm 薄切片 4 枚 / 1 サンプル
分離システム	核酸自動分離システム QuickGene-810 「DNA TISSUE」 モード 核酸分離システム QuickGene-Mini80
試薬キット と消耗品	DNA 組織キット S (QuickGene DNA tissue kit S) 1.5ml マイクロチューブ
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

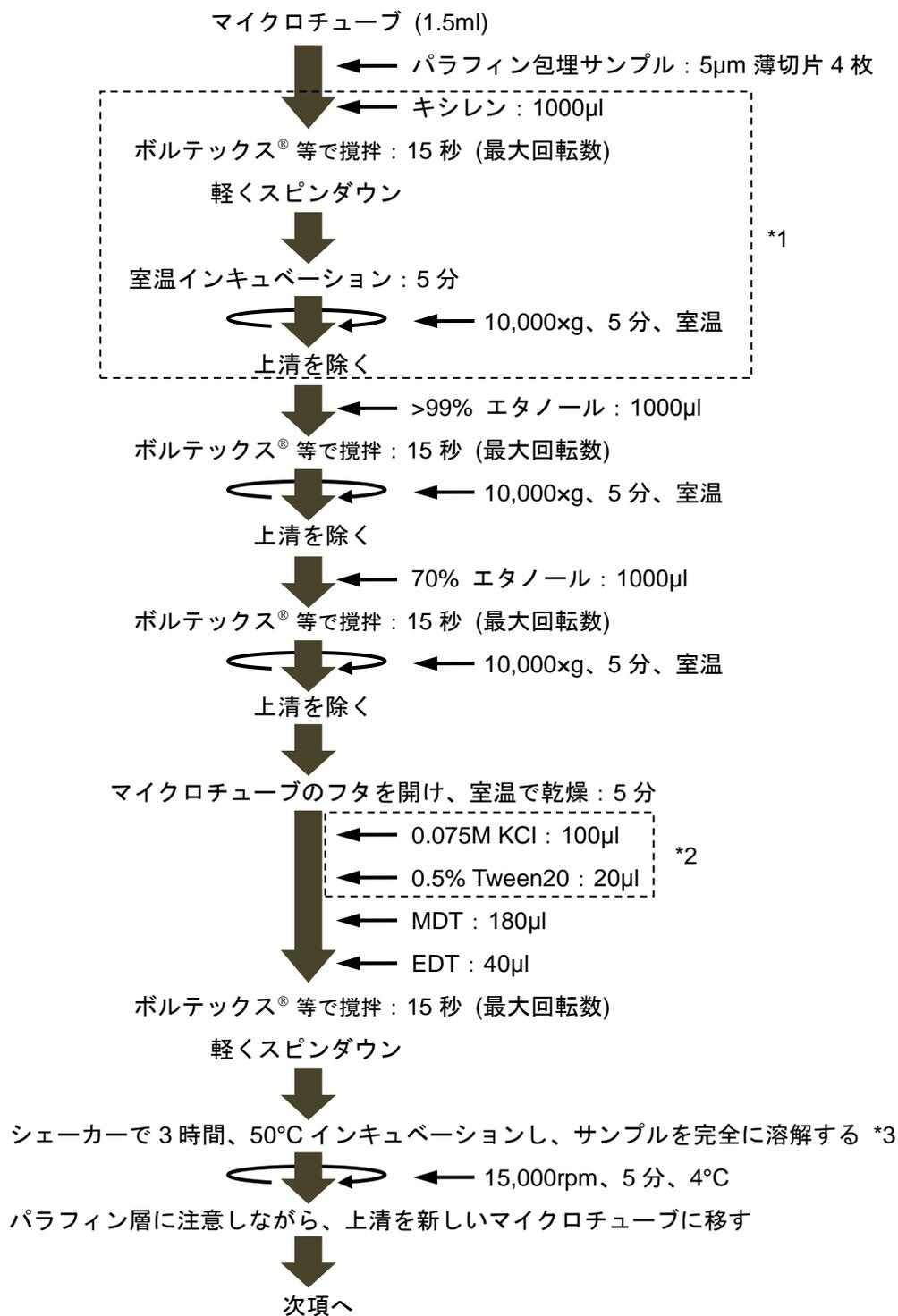
*ヒト乳腺癌由来培養細胞 (MCF-7)をマウスに移植し、作製した担癌マウスより癌組織を摘出

サンプルの準備

- (1) ホルマリン固定した組織をパラフィン包埋し、5µm の厚さで薄切する。
- (2) 薄切片 4 枚分を 1.5ml マイクロチューブに入れる。

※パラフィン部分は可能な限り除去する。

Protocol 1 (キシレン使用)



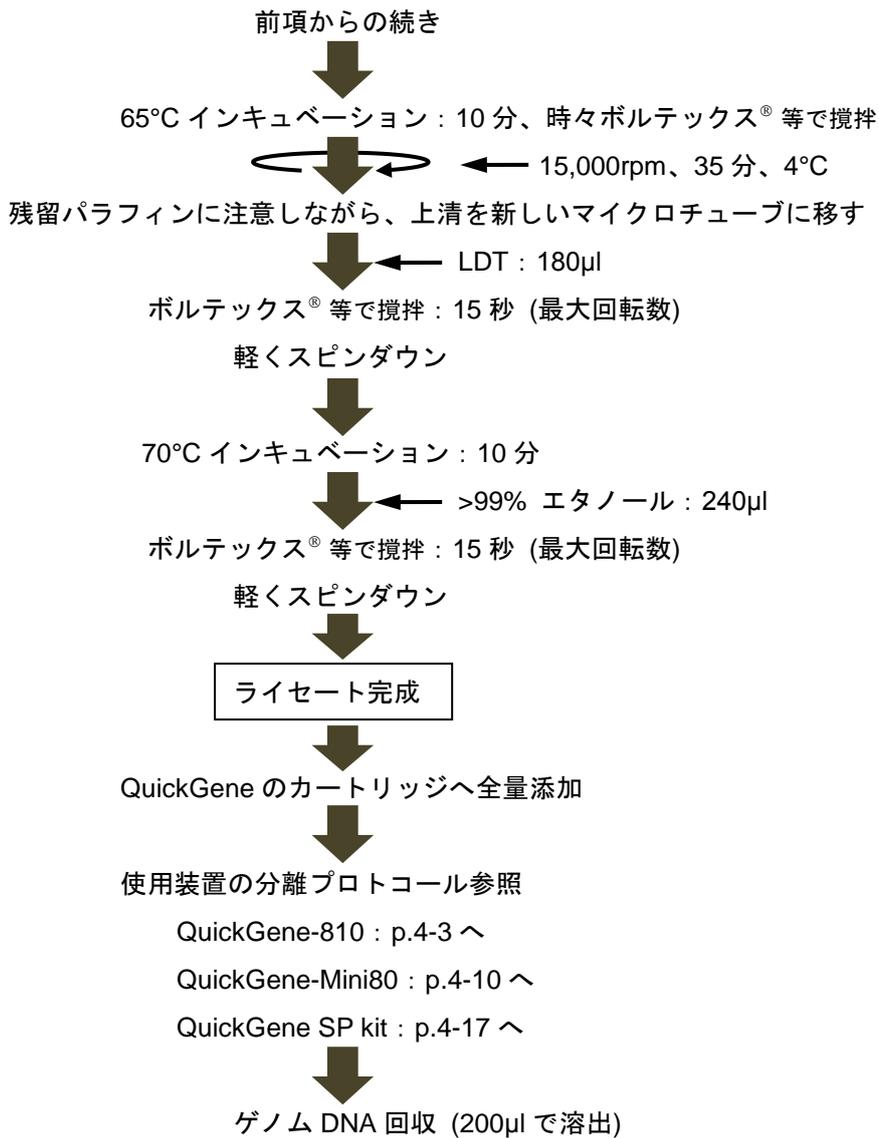
*1

*1 パラフィンの残存状況により、この工程を 2~4 回繰り返してください

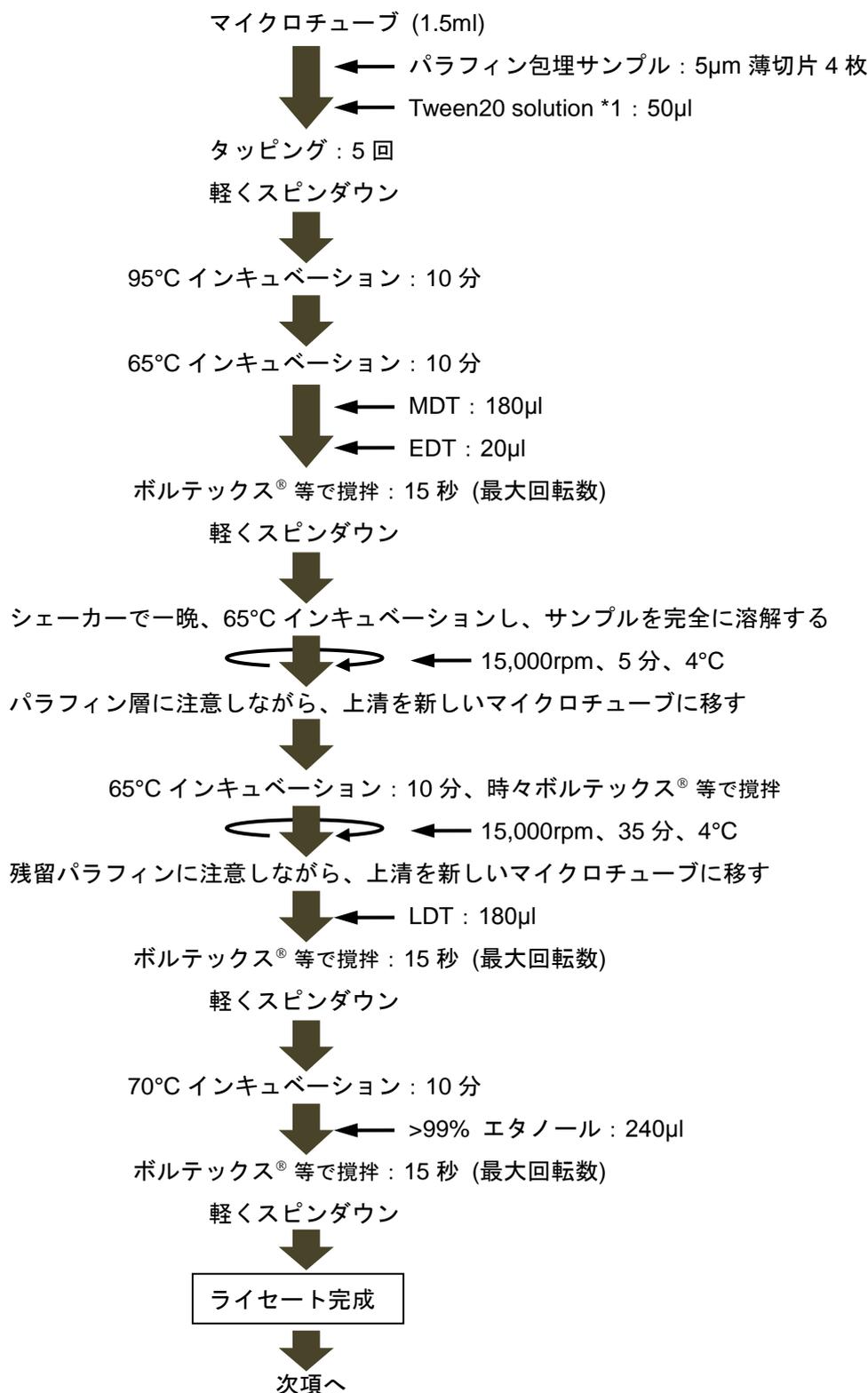
*2

*2 組織によっては、これらの試薬の添加で収量が増します。

*3 硬組織の場合には、EDT の増加により収量が増します。一晚溶解操作をすると収量が減ります。



Protocol 2 (キシレン不使用)



*1 試薬の組成

0.5% Tween20 1mM EDTA 50mM Tris-HCl pH8.5
--

前項からの続き



QuickGene のカートリッジへ全量添加



使用装置の分離プロトコール参照

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

P C R： 以下の条件で PCR を実施。

*PCR 増幅産物 451bp

・ 10x PCR Buffer (-Mg ²⁺)	2.5 µl	94°C	2 min.	x30
・ 2.5mM dNTPs	2.5 µl	↓	94°C 30 sec.	
・ 25mM MgCl ₂	1.5 µl	↓	59°C 1 min.	
・ primer mix (human GAPDH)	1 µl	↓	72°C 1 min.	
・ Template DNA	10 µl	↓	72°C 7 min.	
・ rTaq polymerase	0.2 µl	↓	4°C ∞	
・ H ₂ O	7.3 µl			
	25 µl			

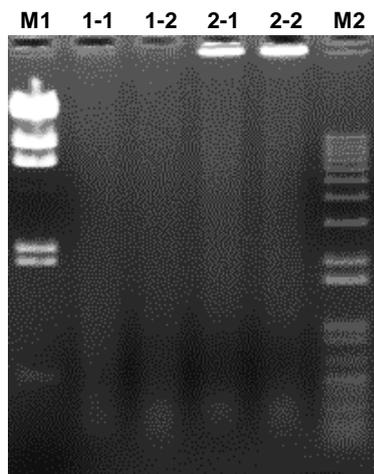
電気泳動 2： PCR 反応液 10µl を 1% agarose gel にて電気泳動。

結果

収量と純度

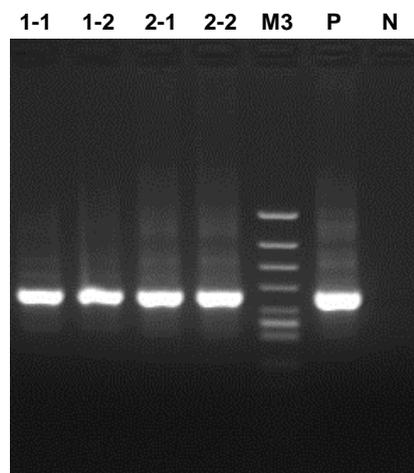
サンプル		分光光度測定				蛍光光度測定	
プロトコール	No.	カオトロピック塩の混入 (A260/230)	タンパク質の混入 (A260/280)	濃度	収量	濃度	収量
				(ng/µl)	(µg)	(ng/µl)	(µg)
1 (キシレン使用)	1-1	1.971	2.077	40.6	8.1	11.9	2.4
	1-2	1.965	2.032	44.7	8.9	12.3	2.5
2 (キシレン不使用)	2-1	2.115	2.027	48.7	9.7	17.3	3.5
	2-2	2.139	1.931	65.6	13.1	22.8	4.6

電気泳動 1



M1: TrackIt™ λ DNA/*Hind* III Fragments (Life Technologies)
 1-1: Protocol 1 (キシレン使用)
 1-2: Protocol 1 (キシレン使用)
 2-1: Protocol 2 (キシレン不使用)
 2-2: Protocol 2 (キシレン不使用)
 M2: TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies)

電気泳動 2



1-1: Protocol 1 (キシレン使用)
 1-2: Protocol 1 (キシレン使用)
 2-1: Protocol 2 (キシレン不使用)
 2-2: Protocol 2 (キシレン不使用)
 M3: ϕ X174/*Hinc* II digest
 P: Positive Control (ヒトの新鮮全血より分離した DNA)
 N: Negative Control

両プロトコールで FFPE サンプルから DNA を分離することができました。

電気泳動 1 では、スメアなバンドとなって確認されましたが、PCR 及び電気泳動 2 より、ゲノム DNA が分離精製されていること、**PCR に充分対応できる品質である**ことが示されました。

プロトコール 2 は有機溶剤の使用量を削減でき、労働環境改善と低コストの両面でおすすめできます。

本サンプルでは、プロトコール 1、及び 2 のどちらの場合でも高品質な DNA を分離できましたが、サンプルによって異なる可能性がございます。本資料を参考に、お客様のサンプルに適した方法をご検討ください。

※お客様がお使いになるサンプルによっては、収量の低下やカラムの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、検体量・溶出量等をご検討ください。

製品情報

DNA 分離システム: 核酸自動分離システム QuickGene-810 「DNA TISSUE」 モード

核酸分離システム QuickGene-Mini80

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

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>