

DNA組織キット L編

QuickGene DNA tissue kit L (DT-L)



このシートは、全血からゲノムDNAを分離する手順を、キットハンドブック・取扱説明書からダイジェストしたものです。ご使用前には、キットハンドブック・取扱説明書をよく読み、正しくご使用ください。



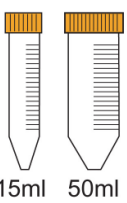




適切な保護手袋、および保護めがねを着用して作業を行ってください。

step1 準備

目的のゲノムDNA分離を行うために、下記のものをご準備ください。

1 準備

QuickGene-610L	マイクロピペット	遠沈管
DNA組織キット L 		 15ml 50ml
特級エタノール (>99%)	マイクロチューブ (コレクションチューブ) 	チューブミキサー 
手袋		
70°Cのウォーターバス		
55°Cのシェーカー (ない場合は恒温槽で時々攪拌)		
遠心機 (2,500×g (3,500rpm) 程度の遠心が可能なもの)		RNase (step1-2参照) *オプション

2 試薬の準備

◆ 前処理酵素 (EDT)

2~8°Cの冷蔵で保存してください。

◆ 組織溶解液 (MDT)

使用前に十分に混和してください。析出物が生じた場合は、55°Cで溶解してください。

◆ 溶解液 (LDT)

使用前に十分に混和してください。析出物が生じた場合は、37°Cで溶解してください。

◆ 洗浄液 (WDT)

未開封のWDTボトルに特級エタノール (>99%) を160ml添加・混合してください。
エタノール添加後は、フタをきちんと閉めて室温で保存してください。

◆ 回収液 (CDT)

核酸溶出時には、必ずCDTを使用してください。

◆ RNase処理を行う場合の推奨品 (オプション)

- Ribonuclease A

Sigma-Aldrich Cat. No. R5125	*1, *2
R5500	*1, *2
R6513	*1
R4642	
- Ribonuclease A (MP Biomedicals Cat. No. 101076) *1, *2
- RNase A (AMRESCO Cat. No. 0675) *1, *2
- RNase A (QIAGEN Cat. No. 19101)
- RNase A (Life Technologies Cat. No. 12091)

*1: 10mM Tris HCl pH7.5、15mM NaClを用いて100mg/ml溶液を調製してください。
*2: R5125、R5500、101076、0675は100°C 15分処理をしてDNase活性を失活してから使用してください。

続いてstep2プロトコルを行います。

step2 プロトコール

目的の収量を得るため、必ず下記の手順で作業を行ってください。

本キットは、1処理あたりマウス肝臓組織5~100mgに対応しています。

Balb/cマウス (メス、7週齢) 肝臓組織100mgから、ゲノムDNAが80 μ g (収量例) 回収されます。

回収液量初期値は、500 μ lです。

※ 動物から切り取った組織は、所定量を直ちに組織溶解液 (MDT) へ浸してください。
すぐに使用しない場合は、液体窒素で素早く凍結し、冷凍保存 (-20 $^{\circ}$ Cまたは-80 $^{\circ}$ C) してください。
室温で放置したり、凍結、融解を繰り返すと、DNAが分解したり、収量が減少することがあります。

1 組織溶解

- 1) シェーカーを55 $^{\circ}$ Cに設定します。
- 2) 組織をハサミ、ハンマーなどで5mm角以下の小ブロックにし、動物組織重量を測定し、15ml (または50ml) 遠沈管に入れてください。
- 3) 直ちに組織溶解液 (MDT) 1.8ml、前処理酵素 (EDT) 200 μ lを添加します。
- 4) 55 $^{\circ}$ Cで数時間から一晩、シェーカーなどを使用し、攪拌しながら組織を完全に溶解します。
- 5) 溶解残渣分 (溶け残り、ゼラチン状) を分離除去するために、遠心します (目安: 2,500 \times g (3,500rpm)、3分、室温)。
- 6) 溶解液を15ml (または50ml) 遠沈管へ移します。

2 ウォーターバスを70 $^{\circ}$ Cに設定。

3 別紙1: 洗浄液、回収液の必要量

別紙1を参照し、必要な洗浄液、および回収液を装置にセットします。

4 RNase処理 (オプション)

※ step1 試薬の準備を参照

ゲノムDNAと共にRNAが精製されます。RNAの混入が好ましくない場合は、RNase処理を行ってください。
RNase処理をしない場合は、次へ進んでください。

- 1) RNase Aを100 μ l添加してください。
- 2) ボルテックスを5秒程度行い、RNase Aをサンプル液とよく混ぜてください。
- 3) 室温にて2分間インキュベーションします。

※組織の種類によりRNAの含有量が違います。

含有量が低い組織の場合、使用するRNase A量を減量することができます。
使用するRNaseの種類によっては、添加量を変更する必要があります。

5 溶解液 (LDT) の添加

- 1) LDT 1.8mlを添加する。
- 2) 直ちにボルテックスを15秒間最大回転数で行い、LDTをサンプル液とよく混ぜる。

※LDT液添加時に混合液が白くなったり沈殿物が生じることがありますが、70℃に加温すると溶解します。

6 70℃インキュベーション

70℃ ウォーターバスにて10分間加温する。

7 特級エタノール (>99%) の添加

- 1) 特級エタノール (>99%) を2.4ml添加する。
- 2) 直ちにボルテックスを15秒間最大回転数で行い、十分に混和する。

※室温が低い場合、エタノール添加後に白い沈殿ができることがまれにあります。

55℃に加温して沈殿を溶解後、室温に戻してから使用してください。

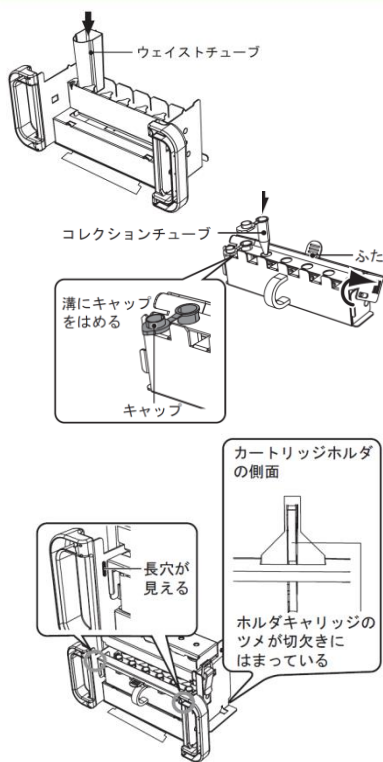
8 ライセート完成

※ライセート完成後は、速やかにQuickGene-610LIにて分離操作を行ってください。

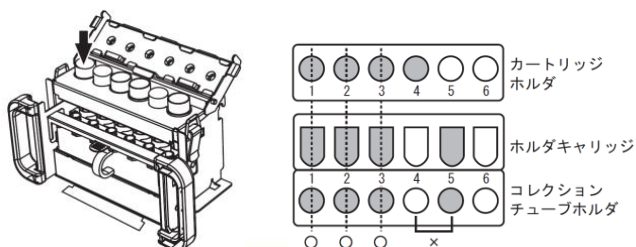
9 step3 分離 ~ step5 後処理

step3 分離

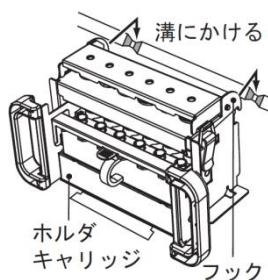
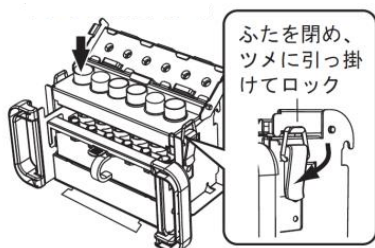
1 消耗品のセット



- 1 ホルダキャリアッジからコレクションチューブホルダとカートリッジホルダを取り外します。
ホルダキャリアッジにウェイストチューブをセットします。
- 2 コレクションチューブホルダのフタを開けて、コレクションチューブをセットします。
- 3 コレクションチューブホルダとカートリッジホルダをホルダキャリアッジにセットします。正しくセットされているか図のように確認します。
- 4 カートリッジホルダに専用カートリッジをセットします。
カートリッジ、ウェイストチューブ、コレクションチューブ3つ全てが同じ番号位置にセットされているか確認します。



2 サンプル分離



- 1 カートリッジにライセートを注入します。
カートリッジホルダのフタを閉めてロックします。
- 2 ホルダキャリアッジを装置にセットします。
フロントカバーを閉じます。
- 3 オペレーションパネルに目的の分離モードが表示されるまで [MODE] ボタンを数回押します。

DNA組織キット L (DT-L)	DNA TISSUE
-------------------	------------

- 4 [START] ボタンを押します。
分離処理中にフロントカバーを開いた場合、装置が一旦停止状態となりますが、分離処理を再開することができます。詳細は、取扱説明書をご参照ください。

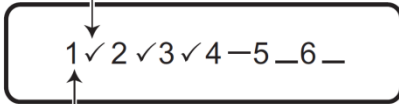
続いてstep4 回収と後処理を行います。

step4 回収と後処理

3 分離結果確認

分離結果の表示例

✓ — _ は、分離結果



数字は、カートリッジの列番号
 ・1～3列目は、正常に分離されました。
 ・4列目は、分離不良でした。
 ・5～6列目は、カートリッジがセットされていませんでした。

- 1 ピピーッと音が鳴れば分離終了です。オペレーションパネルに分離結果が表示されます。

表示	意味
✓ (チェック)	正常終了
— (ハイフン)	分離不良 (カートリッジのつまり)
— (アンダーバー)	カートリッジがセットされていない、または分離前にエラーが発生

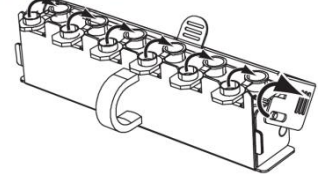
4 サンプル回収

- 1 装置が完全に停止していることを確認した後、フロントカバーを開け、コレクションチューブホルダを取り外します。
- 2 コレクションチューブのキャップを閉めて、取り出します。

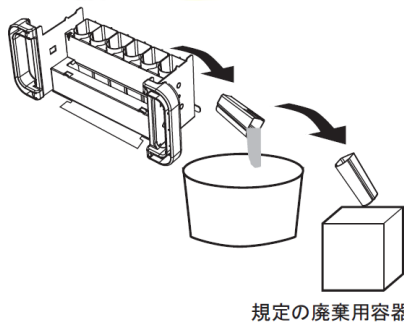
すぐにDNAを使用しない場合は、-20℃で保存します。

回収液量の初期値は、500μlです。

キャップを閉める



5 廃棄・消耗品の処分



規定の廃棄用容器

- 1 ホルダキャリアッジを取り外します。
- 2 カートリッジホルダを取り外し、カートリッジを処分します。
- 3 ウェイストチューブを取り出し、廃液は規定に従って廃棄し、ウェイストチューブも廃棄してください。



バイオハザード

感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用后廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので、関連する法に従い、焼却、熔融、滅菌、消毒などの処理をしてください。また、委託して行う場合は、特別管理産業廃棄物処分業の免許を持った業者に、特別管理産業廃棄物管理表 (マニフェスト) を添えて処理依頼をしてください。

6 後処理

- 1 ディスチャージトレイを確認します。廃液が溜まっていれば、廃棄します。
 - ・キットを変える場合 ⇒ 別紙2 (キット変更時のディスチャージ)
 - ・終了して1週間以上、装置を使用しない場合 ⇒ 別紙2 (1週間以上使わない場合のディスチャージ)
 - ・続けて作業する場合 ⇒ 下記2以降
- 2 ホルダキャリアッジにカートリッジホルダ、コレクションチューブホルダをセットし、装置に戻します。
- 3 フロントカバーを閉じ、step2からの作業を行います。

7 作業終了