

DNA組織キット編

QuickGene DNA tissue kit S (DT-S)



このシートは、動物組織からゲノムDNAを抽出する手順を、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抽出を行うために、下記のものをご準備ください。

1 準備

QuickGene-810 DNA組織キット 	マイクロピペット 	遠沈管 ~16サンプルの場合 15ml 50ml ~72サンプルの場合 50ml 175ml
特級エタノール (>99%) マイクロ遠心機 手袋 ヒートブロック (マウステール以外の組織で使用) 55°Cのシェーカー (ない場合は、恒温槽等。ときどき攪拌する)	マイクロチューブ 	チューブミキサー または
		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 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 (Invitrogen Cat. No. 12091)

*1: 10mM Tris HCl pH7.5、15mM NaClを用いて100mg/ml溶液を調製する。
*2: R5125、R5500、101076、0675は100°C15分処理をしてDNase活性を失活してから使用する。

続いてstep2 プロトコールを行います。

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処理あたり動物組織5mgに対応しています。

Balb/cマウス6週齢♀の肝臓、腎臓、肺組織5mgから、ゲノムDNAが1.5μg以上回収されます。

回収液量初期値は、200μlです。回収液量は50μlまで下げられますが、その場合、溶出効率が低下する可能性があります。

- ※ 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℃または-80℃）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 2mlマイクロチューブを使用し、組織溶解を行います。

- 1) シェーカーを55℃に設定します。
- 2) 溶解しやすくするために、組織5mgを小さくカットします。
(マウスの尻尾5mgは約5mmですが、種類、週齢などで異なります。)
- 3) 直ちに組織溶解液（MDT）180μl、前処理酵素（EDT）20μlを添加します。
- 4) 55℃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。

溶解後に残渣分（溶け残り、ゼラチン状）ができた場合、遠心分離で取り除くか、本キットのハンドブックトラブルシューティングを参考に工程条件を変更してください。

- 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：8,000×g（およそ10,000rpm）、3分、室温程度)
- 6) 溶解液を1.5mlマイクロチューブへ移します。

2 ヒートブロックを70℃に設定します。（マウステール以外の組織の場合）

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、および回収液を遠沈管に注入し、セットします。

4 RNase処理 ★オプション

(step1 試薬の準備を参照)

- 1) 濃度100mg/mlのRNaseを20μl添加します。（Cat. No. 12091は60μl使用します。）

DNaseフリーでないRNaseを使用する場合は、DNase不活化処理をしてください。

組織の種類によりRNAの含有量が異なります。含有量が低い場合、使用RNase量を減量することができます。

- ・ 100mg/mlに調製したRNaseを20μl使用することで、マウス5mgの肝臓に混入するRNAを分解できます。
- ・ 100mg/mlに調製したRNase Cat. No. R5125を20μl使用することで、7週齢のBalb/cマウス5mgの尾に混入するRNAを分解できます。

- 2) タッピングまたはピペッティング5回を行い、RNaseをサンプル液とよく混ぜます。
- 3) 数秒スピンドウンして、チューブのキャップや壁についた液を収集します。
- 4) 室温で2分間、インキュベーションします。

組織ゲノムDNA抽出の場合

5 LDTを添加後、ボルテックス：15秒
(最大回転数で充分混合)

- 1) 溶解液 (LDT) 180 μ lを添加し、サンプル液と混合します。
ボルテックスを15秒間最大回転数で行います。
- 2) 混和が不十分なときは、タッピング、ピペッティングあるいは転倒混和などでよく混ぜます。
- 3) その後、数秒間スピンドウンしてチューブのキャップや壁に付着した溶液を収集します。
LDT液添加時に混合液が白くなることがありますが、70 $^{\circ}$ Cに加熱すると溶解します。
- 4) 70 $^{\circ}$ Cにて10分間インキュベーションします。
- 5) 軽くスピンドウンします。

6 特級エタノール (>99%) を添加後、
ボルテックス：15秒 (最大回転数で充分混合)

- 1) 特級エタノール240 μ lを添加し、サンプル液と混合します。
ボルテックスを15秒間最大回転数で行います。
- 2) 混和が不十分なときは、タッピング、ピペッティングあるいは転倒混和などでよく混ぜます。
- 3) その後、数秒間スピンドウンしてチューブのキャップや壁に付着した溶液を収集します。
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 $^{\circ}$ Cに加熱し沈殿を溶解後、室温に戻してから使用してください。

マウス尻尾ゲノムDNA抽出の場合

5 溶解液 (LDT) と特級エタノール (>99%)
の混合

1サンプルあたり溶解液 (LDT) 180 μ lと特級エタノール240 μ lをサンプル数分充分に混合し、調製します。

6 LDTを添加後、ボルテックス：15秒
(最大回転数で充分混合)

- 1) 溶解液 (LDT) と特級エタノール (>99%) の混合液420 μ lを添加し、サンプル液と混合します。
ボルテックスを15秒間最大回転数で行います。
- 2) 混和が不十分なときは、タッピング、ピペッティングあるいは転倒混和などでよく混ぜます。
- 3) その後、数秒間スピンドウンしてチューブのキャップや壁に付着した溶液を収集します。
室温が低い場合、溶解液 (LDT) とエタノールの混合液を添加後に白い沈殿ができることがまれにあります。55 $^{\circ}$ Cに加熱し沈殿を溶解後、室温に戻してから使用してください。

7 ライセート完成

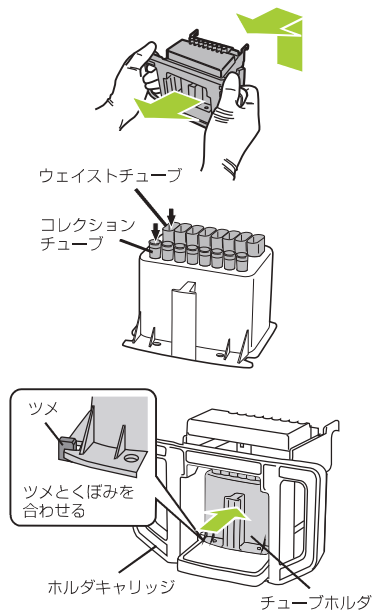
ライセート完成後、30分以内に抽出を行ってください。

8 step3 抽出 ~ step5 後処理

QuickGene-810を使って、ゲノムDNAを抽出します。

step3 抽出

1 消耗品のセット (チューブホルダへのセット)

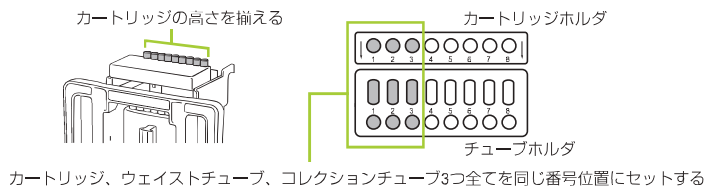


1 フロントカバーを開け、ホルダキャリアッジを取り外します。ホルダキャリアッジからチューブホルダを取り外します。

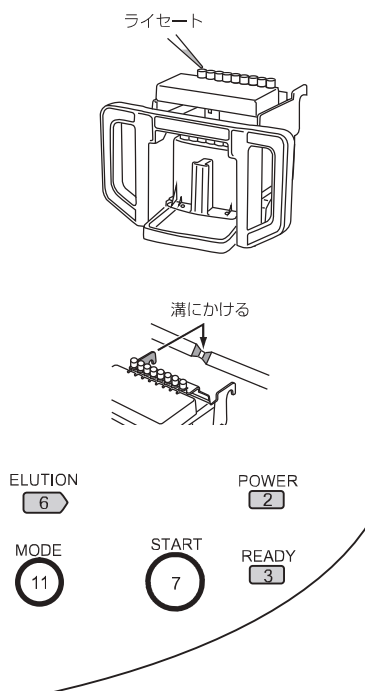
2 チューブホルダに、ウェイトチューブ、コレクションチューブをセットします。

3 チューブホルダをホルダキャリアッジにセットします。

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。



2 サンプル抽出



1 カートリッジに、ライセートを、マイクロピペットを用いて全量アプライします。

2 ホルダキャリアッジを装置へセットします。

3 オペレーションパネルに目的の抽出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 (DT-S)	DNA TISSUE
-----------------	------------

4 〔START〕ボタンを押します。

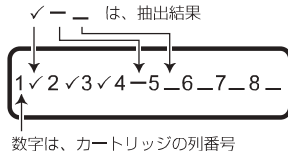
抽出処理中にフロントカバーを開いた場合、装置が一旦停止状態となりますが、抽出処理を再開することができます。詳細は、取扱説明書をご参照ください。

続いてstep4 回収を行います。

step4 回収

3 抽出結果確認

抽出結果の表示例



例では、 1～3列目：正常
4列目：不良
5～8列目：カートリッジセットなし

- 1 ピピーッと音が鳴れば抽出終了です。
オペレーションパネルに抽出結果が表示されます。

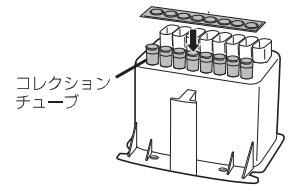
表示	意味
✓ (チェック)	正常終了
- (ハイフン)	抽出不良 (カートリッジのつまり)
- (アンダーバー)	カートリッジがセットされていない、 または抽出前にエラーが発生

4 サンプル回収

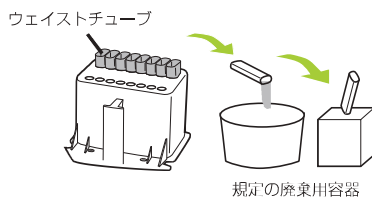
- 1 装置が完全に停止していることを確認した後、フロントカバーを開け、チューブホルダを取り外します。
- 2 コレクションチューブにキャップを付け、取り出し、保存します。

すぐにDNAを使用しない場合は、 -20°C で保管します。

回収液量の初期値は、 $200\mu\text{l}$ です。



5 廃棄・消耗品の処分



- 1 ウェイトチューブを取り出し、廃液は規定に従って廃棄し、ウェイトチューブも廃棄してください。
- 2 ホルダキャリアを取り外します。
- 3 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。

カートリッジホルダの上部をスライドさせ、カートリッジを下に落とし、処分します。



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、使用後廃棄する場合は、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、溶融、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量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。

続いてstep5 後処理を行います。

step5 後処理

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）
 - ・終了して一週間以上、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 ホルダキャリッジにカートリッジホルダ、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