

ゲノムDNA分離 クイックガイド

DNA全血キット編

QuickGene DNA whole blood kit S (DB-S)



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・取扱説明書から抜粋したものです。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-Mini480

DNA全血キット (DB-S)



マイクロピペット

(P-200、P-1000など)



チューブミキサー



特級エタノール (>99%)

ヌクレアーゼフリー水

56°Cのヒートブロック

遠心分離機

手袋

保護めがね

マイクロチューブ

(1.5ml)



2 試薬の準備

◆ 前処理酵素 (EDB)

凍結乾燥品を含む瓶に3.3mlのヌクレアーゼフリーの水を添加し、時々攪拌しながら室温に30分以上置き、完全に溶解させてください。

(溶解後は4°Cで2ヶ月間保存できます。それ以上長期間保存される場合は小分けにして-80°Cで保存してください。)

◆ 溶解液 (LDB)

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 (WDB)

ご使用前のWDB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 (CDB)

核酸溶出時には、必ずCDBを使用してください。

続いて対応するプロトコールを行います。

step2-1 プロトコール A

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処理あたり全血200 μ lに対応しており、標準的なDNA収量は、4~8 μ gです。
回収液量初期値は、200 μ lです。回収液量は50 μ l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。

全血は、抗凝固剤 (EDTA・2Na、EDTA・2Kまたはヘパリン) を用いて採血したできる限り新鮮なものをご使用ください。

1 ヒートブロックを56°Cに設定します。

2 1.5mlマイクロチューブを使用し、1)から3)の作業を行います。 ※1)から3)の手順厳守

- 1) 溶解済みの前処理酵素 (EDB) 30 μ lをマイクロチューブの底に分注します。
- 2) 全血200 μ lを添加します。(全血添加後、直ちに3)を行います。)
- 3) 溶解液 (LDB) 250 μ lを添加し、ピペッティング5回 (あるいは転倒混和5回) を行います。

ピペッティング (あるいは転倒混和) を確実にを行い、EDB、全血、LDBが十分に混合するようにします。
次の作業でボルテックスを行います。もし、お持ちのボルテックスの最大回転数が2,500rpm以下の場合は、
念入りにピペッティング (あるいは転倒混和) を行ってください。

3 ボルテックス：15秒 (最大回転数 (2,500rpm以上推奨) で充分混合)

ボルテックスを15秒間最大回転数で行います。その後、数秒間スピンドア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。

混合が充分でないと、目的の収量が得られないことやカートリッジが詰まることがあります。

4 56°Cで2分間インキュベート

インキュベーション時間は、5分間延長までは収量に影響しません。

5 特級エタノールを添加後、ボルテックス：15秒 (最大回転数 (2,500rpm以上推奨) で充分混合)

特級エタノール (>99%) を250 μ l添加し、15秒間最大回転数でボルテックスを行った後、数秒間スピンドア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。

6 ライセート完成

ライセート完成後、30分以内に分離を行ってください。

続いてstep3 分離を行います。

step2-2 プロトコール B

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処理あたり全血200 μ lに対応しており、標準的なDNA収量は、4~8 μ gです。
回収液量初期値は、200 μ lです。回収液量は50 μ l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。

全血は、できる限り採血後3日以内、EDTA・2Na、EDTA・2Kまたはヘパリンで採血したものをご使用ください。

1 準備

プロトコールBでは、追加で以下の準備物が必要です。

マルチチャンネル
ピペット*1



96ディープウェル
プレート*2



リザーバー



56°Cのウォーター
バス



*1: 200 μ l、250 μ l、750 μ lの液量操作に対応した8連以上のもの

*2: 推奨品: Corning® 96 Well Clear V-Bottom 2mL Polypropylene Deep Well Plate, Sterile (Product #3960)

2 ウォーターバスを56°Cに設定します。

96ディープウェルプレートが半分程度浸かる高さに水面を調整してください。

3 検体数に応じて、試薬を必要量リザーバーに分取します。

	16検体	20検体	24検体	28検体	32検体	36検体	40検体	44検体	48検体
LDB	5ml	6ml	7ml	8ml	9ml	10ml	11ml	12ml	13ml
特級エタノール (>99%)	5ml	6ml	7ml	8ml	9ml	10ml	11ml	12ml	13ml
WDB (特級エタノール添加済)	40ml	50ml	60ml	70ml	75ml	85ml	95ml	105ml	115ml
CDB	4.5ml	5ml	6ml	7ml	7.5ml	8.5ml	9ml	10ml	11ml

記載された量より多く分取するとキット付属の試薬が不足する場合があります。

4 96ディープウェルプレートを使用し、1)から3)の作業を行います。 ※1)から3)の手順厳守

液体操作は特に記載がない場合、シングルチャンネルタイプのマイクロピペットを使用します。

- 1) 溶解済みの前処理酵素 (EDB) 30 μ lを96ディープウェルプレートの底に分注します。
- 2) 全血200 μ lを添加します。(全血添加後、直ちに3)を行います。)
- 3) マルチチャンネルピペットで溶解液 (LDB) 250 μ lを添加し、ピペティング動作を20回繰り返し混合します。

ピペティングを確実にし、EDB、全血、LDBが十分に混合するようにします。
混合が充分でないと、目的の収量が得られないことやカートリッジが詰まる場合があります。

裏面に続きます。

5 56°Cで15分間インキュベート

96ディープウェルプレートにフタをし、56°Cのウォーターバスで15分間インキュベートします。

必要に応じて、96ディープウェルプレートが動かないように重しをしてください。

6 特級エタノールを添加後、ピペッティング20回を行います。

マルチチャンネルピペットで特級エタノール (>99%) を250µl添加し、ピペティング動作を20回繰り返し混合します。

7 室温で10分間インキュベート

インキュベーション時間は、5分間延長までは収量に影響しません。

8 ライセート完成

ライセート完成後、すぐに分離を行ってください。

以降、カートリッジへのライセートのアプライ、洗浄液及び回収液の添加はマルチチャンネルピペットで行うことができます。

続いてstep3 分離を行います。

step3 分離

QuickGene-Mini480を使って、ゲノムDNAを分離します。

1 QuickGene-Mini480分離フロー

分離フロー中の加圧マークは下記操作を意味しています。

- ① ウェイストチューブホルダまたはコレクションチューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQuickGene-Mini480にセットし、カートリッジの1列目が加圧ノズルの真下にくる位置まで押し込む
- ② 加圧スイッチをONの位置に回して加圧する
- ③ カートリッジ内に液が残っていないことを確認してから加圧スイッチをOFFの位置に戻す
- ④ サンプルがセットされている列数に応じてホルダを押し込み、②と③を繰り返す
- ⑤ ウェイストチューブホルダまたはコレクションチューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQuickGene-Mini480から取り出す

