

ゲノムDNA分離 クイックガイド

DNA組織キット編

QuickGene DNA tissue kit S (DT-S)



このシートは、組織からゲノム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組織キット (DT-S)		マイクロピペット (P-200、P-1000等)	チューブミキサー
特級エタノール (>99%)	マイクロチューブ (1.5ml)		 または 
遠心分離機			
手袋			
保護めがね			
ヒートブロック (マウス尾以外の組織で使用)			
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)		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)

使用前の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 ; Thermo Fisher Scientific 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処理あたり動物組織5mgに対応しています。
Balb/cマウス（メス、7週齢）の肝臓5mgから4.5 μ g、尾5mgから4.0 μ gのゲノムDNAを分離することができます。
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。

※ 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 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 $^{\circ}$ C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）180 μ l、前処理酵素（EDT）20 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。

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 \times g（およそ10,000rpm）、3分、室温程度)
- 6) 溶解上清液を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 $^{\circ}$ Cに設定します。(マウス尾以外の組織の場合)

3 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20 μ l添加します。(Cat. No. 12091は60 μ l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の含有量が違います。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20 μ l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20 μ l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。
- 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分離の場合

4 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) 混合が不十分なときは、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添加時に混合液が白くなることがありますが、70°Cに
加温すると溶解します。

- 4) 70°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。

5 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 (>99%) 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) 混合が不十分なときは、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、エタノール混合後に白い沈澱ができる
ことがまれにあります。55°Cに加温し、沈澱を溶解後、室
温に戻してから使用してください。

マウス尾ゲノムDNA分離の場合

4 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
(>99%) 240 μ lをサンプル数充分に混合し、調製しま
す。

5 LDT/エタノール混合液を添加後、
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) 混合が不十分なときは、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) エタノールの混合液を添
加後に白い沈澱ができることがまれにあります。55°Cに加
温し、沈澱を溶解後、室温に戻してから使用してください。

6 ライゼート完成

ライゼート完成後、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処理あたり動物組織5mgに対応しています。
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。

※ 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 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



70 $^{\circ}$ Cのウォーター
バス



*1: 180 μ l、240 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 2mlマイクロチューブを使用し、組織溶解を行います。

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) シェーカーを55 $^{\circ}$ C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。
- 3) 直ちに組織溶解液 (MDT) 180 μ l、前処理酵素 (EDT) 20 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。

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 \times g (およそ10,000rpm)、3分、室温程度)
- 6) 溶解上清液を96ディープウェルプレートへ移します。

3 ウォーターバスを70 $^{\circ}$ 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。

裏面に続きます。

4 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
LDT	4ml	4.5ml	5.5ml	6ml	7ml	7.5ml	8.5ml	9ml	10ml
特級エタノール (>99%)	5ml	6ml	7ml	8ml	9ml	10ml	11ml	12ml	13ml
WDT (特級エタノール添加済)	40ml	50ml	60ml	70ml	75ml	85ml	95ml	105ml	115ml
CDT	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。

5 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20 μ l添加します。(Cat. No. 12091は60 μ l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の含有量が違います。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20 μ l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20 μ l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) ピペティング5回を行い、RNaseをサンプル液とよく混ぜます。

- 3) 室温で2分間インキュベーションします。

6 LDTを添加後、ピペティング20回を行います。

マルチチャンネルピペットでLDTを180 μ l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、LDT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。

7 70°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、70°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。

8 特級エタノール (>99%) を添加後、ピペティング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240 μ l添加し、ピペティング動作を20回繰り返し混合します。

9 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。

ライセートのままで放置すると、収量が低下する可能性があります。

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

