

ゲノムDNA抽出 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-Mini80

DNA全血キット (DB-S)



マイクロピペット



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℃のヒートブロック

簡易卓上遠心機

手袋

マイクロチューブ



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℃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℃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℃で溶解してください。

◆ 洗浄液 (WDB)

未開封の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 ヒートブロックを56 $^{\circ}$ 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添加します。
- 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) を確実にし、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。



EDB添加



全血添加



LDB添加→ピペッティング後

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 $^{\circ}$ 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分まで延長しても収量に影響しません。



インキュベート後

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 (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分以内に抽出を行ってください。

続いてstep3 抽出を行います。

step3 抽出

QuickGene-Mini80を使って、ゲノムDNAを抽出します。

1 QuickGene-Mini80抽出フロー

抽出フロー中の加圧マーク  は下記操作を意味しています。

- ① チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQuickGene-Mini80にセットする
- ② 加圧スイッチを手前に回して加圧開始
- ③ カートリッジ(CA)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元の位置に戻す
- ④ チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQuickGene-Mini80から取り出す

