

QIAamp® DNA Micro プロトコールとトラブルシューティング

少量の血液

乾燥血液斑

尿

組織

LMD 採取した組織

からのゲノム DNA の精製

ゲノム DNA のクリーンアップ



目次

プロトコール

少量の血液からのゲノム DNA 分離	3
乾燥血液斑からのゲノム DNA 分離	6
尿からのゲノム DNA 分離	9
組織サンプルからのゲノム DNA 分離	12
LMD 採取した組織からのゲノム DNA 分離	15
ゲノム DNA のクリーンアップ	18
トラブルシューティング	20

プロトコール：少量の血液からのゲノム DNA 分離

本プロトコールは EDTA、クエン酸、ヘパリンなどの抗凝固剤で処理した 1 ~ 100 μ l の全血からゲノム DNA を分離するためのものです。

実験を始める前の重要事項：

- すべての遠心操作は室温（15 ~ 25°C）で行ないます。

実験開始前の準備事項

- サンプルを室温（15 ~ 25°C）に戻します。
- 溶出用 Buffer AE あるいは蒸留水を室温に戻します。
- ステップ 5 で使用するサーモミキサーあるいはインキュベーターを 56°C にセットします。
- 英語版 Handbook 14 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。
- Buffer AL あるいは Buffer ATL が沈殿物を形成している場合には、70°C に温めて静かに攪拌し沈殿物を溶かします。
- オプション：微量のサンプル (<10 μ l) を処理する場合には、英語版 Handbook 15 ページの説明に従って Buffer AE で溶解調製したキャリア RNA を Buffer AL に添加します。

操作手順

1. 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に 1 ~ 100 μ l の全血をピペットで入れる。
2. Buffer ATL を加えて最終容量を 100 μ l にする。
3. 10 μ l の Proteinase K を添加する。
4. 100 μ l の Buffer AL を添加後、蓋を閉めてパルスボルテックスで 15 秒間混和する。

効率的な溶解を行なうために、サンプル、Buffer ATL、Proteinase K、Buffer AL を完全に混和して均一な溶液にします。

注：血液量が 10 μ l より少ない場合には Buffer AL にキャリア RNA を添加することをお勧めします（英語版 Handbook 14 ページ参照）。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないため、まず Buffer AE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。

Buffer AL を Buffer ATL に添加した際に白い沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は QIAamp 調製法には影響しません。これはステップ 5 での加熱インキュベーションの間に溶解します。

5. **56℃で 10 分間インキュベートする。**
注：インキュベーション中にサンプルを攪拌すると、DNA 収量が増加します。
6. スピンドウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。
7. **50 µl のエタノール (96 ~ 100%) をサンプルに添加し、蓋を閉め、15 秒間パルスボルテックスで完全に混和する。室温で 3 分間インキュベートする。**
注：室温が 25℃を超える場合には、氷上で冷やしたエタノールを添加してください。
8. スピンドウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。
9. **QIAamp MinElute® Column (2 ml コレクションチューブ中) のカラムの縁を濡らさないように注意して、ステップ 8 の全ライセートをアプライする。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。**
遠心操作の後、ライセートが完全にカラムを通過していない場合には、QIAamp MinElute Column が空になるまでさらに高速で遠心操作を行ないます。
10. **QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 500 µl の Buffer AW1 を添加する。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。**
11. **QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 500 µl の Buffer AW2 を添加する。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。**
QIAamp MinElute Column とフロースルーが接触しないように注意します。ある種の遠心ローターでは減速の際に振動し、エタノールを含んだフロースルーが QIAamp MinElute Column に接触することがあります。また QIAamp MinElute Column とコレクションチューブをローターから取り出す際、フロースルーが QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。
12. **最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で 3 分間遠心操作してメンブレンを完全に乾燥させる。**
溶出液へのエタノールのキャリーオーバーはダウンストリームのアプリケーションで問題になることがあるので、このステップは必要です。

13. 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に **QIAamp MinElute Column** をセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。**QIAamp MinElute Column** の蓋を静かに開き、**20 ~ 100 μ l** の **Buffer AE** あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。

高い pH や EDTA が感度の高いダウンストリーム・アプリケーションに影響する場合には、溶出液に水を使用します（英語版 Handbook 12 ページ参照）。

重要：Buffer AE あるいは蒸留水を室温（15 ~ 25°C）に戻したことを確認します。少量（<50 μ l）で溶出を行なう際には、カラムに結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer AE または蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。ダウンストリームのアプリケーションでの必要性に応じて容量を調節します。回収される溶出液量は、カラムにアプライした溶出バッファー量よりも 5 μ l（最高）少なくなります。

14. 蓋を閉めて、室温（15 ~ 25°C）で 1 分間インキュベートする。最高速度（**20,000 x g ; 14,000 rpm**）で 1 分間遠心操作する。

Buffer AE あるいは水をアプライした QIAamp MinElute Column を遠心操作の前に室温で 5 分間インキュベートすると、DNA 収量は一般に増加します。

プロトコール：乾燥血液斑からのゲノム DNA 分離

これは、切り抜いた直径約 3 mm (1/8 インチ) の blood card からゲノム DNA を分離するためのプロトコールです。このプロトコールは未処理血液および EDTA、クエン酸、ヘパリンなどの抗凝固剤で処理した血液に最適です。血液は、903 paper あるいは FTA® Card (Whatman®)、Guthrie test card あるいは類似の blood card などのろ紙にスポットしたものを使用します。

実験を始める前の重要事項：

- すべての遠心操作は室温 (15 ~ 25℃) で行ないます。

実験開始前の準備事項

- 溶出用 Buffer AE あるいは蒸留水を室温 (15 ~ 25℃) に戻します。
- Buffer AL あるいは Buffer ATL が沈殿物を形成している場合には、70℃に温めて静かに攪拌し沈殿物を溶かします。
- ステップ 4 で使用するサーモミキサーあるいはインキュベーターを 56℃に、ステップ 7 で使用するサーモミキサーあるいはインキュベーターを 70℃にセットします。サーモミキサーあるいはインキュベーターの代わりにヒートブロックあるいは水浴を使用できます。
- 英語版 Handbook 14 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。
- オプション：微量のサンプルを処理する場合には、英語版 Handbook 15 ページの説明に従って Buffer AE で溶解調製したキャリア RNA を Buffer AL に添加します。

操作手順

1. 一穴式の紙パンチで直径 3 mm (1/8 インチ) の乾燥血液斑を切り抜く。切り抜いた blood card (1 ~ 3 枚) を 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ (別途準備) に入れる。
2. 180 µl の Buffer ATL を添加する。
3. 20 µl の Proteinase K ストック溶液を添加し、ボルテックスにより完全に混和する。
4. 1.5 ml チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、56℃で 1 時間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。
ヒートブロックまたは水浴を用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを 10 分毎に 10 秒間ボルテックスし混和します。
5. スピンドアウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。

6. 200 μ l の Buffer AL を添加後、蓋を閉めてボルテックスで 10 秒間混和する。

効率的な溶解を行なうためには、サンプルと Buffer AL が完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。

Buffer AL を Buffer ATL に添加した際に白い沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は QIAamp 調製法には影響しません。これはステップ7での加熱インキュベーションの間に溶解します。

注：直径 3 mm あるいはそれ以下のパンチした blood card を 1 枚のみ処理する場合には、Buffer AL にキャリア RNA を添加することをお勧めします（英語版 Handbook14 ページ参照）。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないため、まず Buffer AE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。

7. 1.5 ml チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、70°C で 10 分間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。

ヒートブロックまたは水浴をインキュベーションに使用する場合には、チューブは 3 分毎に 10 秒間ボルテックスします。

8. スピンドアウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。

9. QIAamp MinElute Column (2 ml コレクションチューブ中) のカラムの縁を濡らさないように注意して、ステップ 8 の全ライセートをアプライする。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。

遠心操作の後、ライセートが完全にカラムを通過していない場合には、QIAamp MinElute Column が空になるまでさらに高速で遠心操作を行ないます。

10. QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l の Buffer AW1 を添加する。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。

11. QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l の Buffer AW2 を添加する。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。

QIAamp MinElute Column とフロースルーが接触しないように注意します。ある種の遠心ローターでは減速の際に振動し、エタノールを含んだフロースルーが QIAamp MinElute Column に接触することがあります。また QIAamp MinElute Column とコレクションチューブをローターから取り出す際、フロースルーが QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。

12. 最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で 3 分間遠心操作してメンブレンを完全に乾燥させる。

溶出液へのエタノールのキャリーオーバーはダウンストリームのアプリケーションで問題になることがあるので、このステップは必要です。

13. 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に **QIAamp MinElute Column** をセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。**QIAamp MinElute Column** の蓋を静かに開き、**20 ~ 100 µl** の **Buffer AE** あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。

高い pH や EDTA が感度の高いダウンストリーム・アプリケーションに影響する場合には、水を用いて溶出します（英語版 Handbook 12 ページ）。

重要：Buffer AE あるいは蒸留水を室温（15 ~ 25°C）に戻したことを確認します。少量（<50 µl）で溶出を行なう際には、カラムに結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer AE または蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。ダウンストリームのアプリケーションでの必要性に応じて容量を調節します。回収される溶出液量は、カラムにアプライした溶出バッファ量よりも 5 µl（最高）少なくなります。

14. 蓋を閉めて、室温（15 ~ 25°C）で **1 分間インキュベート**する。**最高速度（20,000 x g ; 14,000 rpm）** で **1 分間遠心操作**する。

Buffer AE あるいは水をアプライした QIAamp MinElute Column を遠心操作の前に室温で 5 分間インキュベートすると、DNA 収量は一般に増加します。

プロトコール：尿からのゲノム DNA 分離

これは、尿からゲノム DNA を分離するためのプロトコールです。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。
- キャリア RNA が必要かどうかをチェックします（英語版 Handbook 13 および 15 ページ）。

実験開始前の準備事項

- サンプルを室温（15～25℃）に戻します。
- 溶出用 Buffer AE あるいは蒸留水を室温に戻します。
- ステップ 5 で使用するサーモミキサーあるいはインキュベーターを 56℃ にセットします。サーモミキサーあるいはインキュベーターの代わりにヒートブロックあるいは水浴を使用できます。
- Buffer AL あるいは Buffer ATL が沈殿物を形成している場合には、70℃ に温めて静かに攪拌し沈殿物を溶かします。
- オプション：1 M の DTT (dithiothreitol) ストック溶液を調製します。分注して -20℃ で保管します。使用直前に速やかに解凍します。
- 英語版 Handbook 14 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。

操作手順

1. 1 ml までの尿を 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に入れ、**6,000 x g (8,000 rpm)** で 2 分間遠心操作する。

尿サンプルの容量が 1～10 ml の場合は、適切なサイズの遠心チューブで細胞をペレット化します。上清を棄て、500 μ l の Buffer AE をペレットに添加し、5 秒間ボルテックスします。数秒間遠心操作し、サンプルを 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に移します。ステップ 3 に続けます。

2. 上清を棄て、500 μ l の Buffer AE を添加して、5 秒間ボルテックスする。
3. **6,000 x g (8,000 rpm)** で 2 分間遠心操作する。
4. 上清を棄て、300 μ l の Buffer ATL と 20 μ l の Proteinase K をペレットに添加する。10 秒間パルスボルテックスで完全に混和する。

尿には精子が含まれており、これは DTT や β -メルカプトエタノールのような還元剤の存在下でのみ溶解されるため、20 μ l の 1 M DTT 添加により感度が高くなる場合があります。

5. **1.5 ml チューブ**をサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、**56°C**で**1時間、900 rpm**で振盪させながらインキュベートする。
ヒートブロックあるいは水浴をインキュベーションに用いる際には、チューブを15分毎に10秒間ボルテックスして溶解を増進させます。
6. スピンドウンして**1.5 ml チューブ**の蓋の内側に付着したサンプルを集める。
7. **300 µl の Buffer AL**と**50 µl のエタノール (96 ~ 100%)**を添加し、蓋をして、ボルテックスにより**10 秒間**混和する。
ステップ9で結合操作を効率に行なうためには、サンプル、Buffer AL、エタノールが完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。
注：キャリア RNA を Buffer AL に添加することをお勧めします（英語版 Handbook 14 ページ）。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないため、まず Buffer AE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。
8. スピンドウンして**1.5 ml チューブ**の蓋の内側に付着したサンプルを集める。
注：ステップ7で白い沈殿物が生じることがありますが、ペレット化する必要はありません。ライセートと一緒に QIAamp MinElute Column にアプライすることができます。この沈殿物は QIAamp 調製法には影響しません。
9. ステップ8の上清を **QIAamp MinElute Column (2 ml コレクションチューブ中)**にカラムの縁を濡らさないように注意してアプライする。蓋を閉め、**6,000 x g (8,000 rpm)**で**1 分間**遠心操作する。**QIAamp MinElute Column**を新しい**2 ml**のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。
遠心操作の後、ライセートが完全にカラムを通過していない場合には、QIAamp MinElute Column が空になるまでさらに高速で遠心操作を行ないます。
10. **QIAamp MinElute Column**を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように**500 µl**の **Buffer AW1**を添加する。蓋を閉め、**6,000 x g (8,000 rpm)**で**1 分間**遠心操作する。**QIAamp MinElute Column**を新しい**2 ml**のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。
11. **QIAamp MinElute Column**を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように**500 µl**の **Buffer AW2**を添加する。蓋を閉め、**6,000 x g (8,000 rpm)**で**1 分間**遠心操作する。**QIAamp MinElute Column**を新しい**2 ml**のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。
QIAamp MinElute Column とフロースルーが接触しないように注意します。ある種の遠心ローターでは減速の際に振動し、エタノールを含んだフロースルーが QIAamp MinElute Column に接触することがあります。また QIAamp MinElute Column とコレクションチューブをローターから取り出す際、フロースルーが QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。

- 12. 最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で 3 分間遠心操作してメンブレンを完全に乾燥させる。**

溶出液へのエタノールのキャリーオーバーはダウンストリームのアプリケーションで問題になることがあるので、このステップは必要です。

- 13. 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ (別途準備) に QIAamp MinElute Column をセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。QIAamp MinElute Column の蓋を静かに開き、20 ~ 50 μ l の Buffer AE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。**

高い pH や EDTA が感度の高いダウンストリーム・アプリケーションに影響する場合には、水を用いて溶出します (英語版 Handbook 12 ページ参照)。

重要 : Buffer AE あるいは蒸留水を室温 (15 ~ 25°C) に戻したことを確認します。カラムに結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer AE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。ダウンストリームのアプリケーションでの必要性に応じて容量を調節します。回収される溶出液量は、カラムにアプライした溶出バッファ量よりも 5 μ l (最高) 少なくなります。

- 14. 蓋を開けて、室温 (15 ~ 25°C) で 1 分間インキュベートする。最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。**

Buffer AE あるいは水をアプライした QIAamp MinElute Column を遠心操作の前に室温で 5 分間インキュベートすると、DNA 収量は一般に増加します。

プロトコール：組織サンプルからのゲノム DNA 分離

これは、10 mg 未満の組織からゲノム DNA を分離するためのプロトコールです。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温（15 ~ 25℃）で行ないます。
- 微量の組織から DNA を分離する際には、キャリア RNA が必要です（英語版 Handbook 15 ページ）。
- 冷却した表面（例；ドライアイスの上に設置したガラス、スチール、アルミニウム板など）で組織サンプルを調製します。
- 凍結組織を使用する場合には、ステップ 2 で Buffer ATL を添加する前にサンプルが解凍しないように注意します。

実験開始前の準備事項

- 溶出用 Buffer AE あるいは蒸留水を室温（15 ~ 25℃）に戻します。
- ステップ 4 で使用するサーモミキサーあるいはインキュベーターを 56℃ にセットします。サーモミキサーあるいはインキュベーターの代わりにヒートブロックあるいは水浴を使用できます。
- Buffer AL あるいは Buffer ATL が沈殿物を形成している場合には、70℃ に温めて静かに攪拌し沈殿物を溶かします。
- 英語版 Handbook 14 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。

操作手順

1. 10 mg 未満の組織サンプルを 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に入れる。
2. 180 μ l の Buffer ATL を迅速に添加し、室温（15 ~ 25℃）に戻す。
3. 20 μ l の Proteinase K を添加し、パルスボルテックスで 15 秒間、混和する。
4. サーマミキサーあるいはインキュベーターに 1.5 ml チューブをセットし、完全にサンプルが溶解するまで 56℃ で一晩インキュベートする。

微量の組織サンプルを使用する際には、溶解は 4 ~ 6 時間で完了しますが、良好な結果は一晩溶解した後に得られます。

5. **200 μ l の Buffer AL を添加後、蓋を閉めてパルスボルテックスで 15 秒間混和する。**

効率的な溶解を行なうためには、サンプルと Buffer AL が完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。

注：キャリア RNA が必要な際は（英語版 Handbook 13 ページ）、溶解した 1 μ g のキャリア RNA を 200 μ l の Buffer AL に添加します。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないため、まず Buffer AE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。

6. **200 μ l のエタノール (96 ~ 100%) をサンプルに添加し、蓋を閉め、15 秒間パルスボルテックスで完全に混和する。室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートする。**

注：室温が 25°C を超える場合には、ライセートに添加する前にエタノールを氷上で冷やしてください。

7. **スピンドウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。**

8. **QIAamp MinElute Column (2 ml コレクションチューブ中) のカラムの縁を濡らさないように注意して、ステップ 7 の全ライセートをアプライする。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。**

遠心操作の後、ライセートが完全にカラムを通過していない場合には、QIAamp MinElute Column が空になるまでさらに高速で遠心操作を行ないます。

9. **QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l の Buffer AW1 を添加する。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。**

10. **QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l の Buffer AW2 を添加する。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。**

QIAamp MinElute Column とフロースルーが接触しないように注意します。ある種の遠心ローターでは減速の際に振動し、エタノールを含んだフロースルーが QIAamp MinElute Column に接触することがあります。また QIAamp MinElute Column とコレクションチューブをローターから取り出す際、フロースルーが QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。

11. **最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で 3 分間遠心操作してメンブレンを完全に乾燥させる。**

溶出液へのエタノールのキャリアオーバーはダウンストリームのアプリケーションで問題になることがあるので、このステップは必要です。

12. 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に **QIAamp MinElute Column** をセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。**QIAamp MinElute Column** の蓋を静かに開き、**20 ~ 100 μ l** の **Buffer AE** あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。

高い pH や EDTA が感度の高いダウンストリーム・アプリケーションに影響する場合には、水を用いて溶出します（英語版 Handbook 12 ページ）。

重要：Buffer AE あるいは蒸留水を室温（15 ~ 25°C）に戻したことを確認します。少量（<50 μ l）で溶出を行なう際には、カラムに結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer AE または蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。ダウンストリームのアプリケーションでの必要性に応じて容量を調節します。回収される溶出液量は、カラムにアプライした溶出バッファ量よりも 5 μ l（最高）少なくなります。

13. 蓋を閉めて、室温（15 ~ 25°C）で **1 分間インキュベートする**。最高速度（**20,000 x g ; 14,000 rpm**）で **1 分間遠心操作する**。

Buffer AE あるいは水をアプライした QIAamp MinElute Column を遠心操作の前に室温で 5 分間インキュベートすると、DNA 収量は一般に増加します。

プロトコール：LMD 採取した組織からのゲノム DNA 分離

これは、LMD (laser-microdissection) により採取した組織からゲノム DNA を分離するためのプロトコールです。LMD により採取した組織切片からの分子解析は、微量のスタートサンプルから核酸を精製しなければならないために非常に困難です。さらに固定や染色ステップにより DNA の品質が低下します。この問題を最小限に抑えるため、固定化プロトコールの改良あるいは瞬間凍結サンプルから凍結切片を用いる必要性が生じます。

標本の切片作製、染色、マイクロダイセクション用機器および消耗品は Leica® にて入手可能です (www.leica-microsystems.co.jp)。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温 (15 ~ 25°C) で行ないます。
- 少数細胞から DNA を分離するにはキャリア RNA が必要です (英語版 Handbook 15 ページ参照)。

実験開始前の準備事項

- サンプルを室温 (15 ~ 25°C) に戻します。
- 溶出用 Buffer AE あるいは蒸留水を室温に戻します。
- ステップ 3 で使用するサーモミキサーあるいはインキュベーターを 56°C にセットします。サーモミキサーあるいはインキュベーターの代わりにヒートブロックあるいは水浴を使用できます。
- Buffer AL あるいは Buffer ATL が沈殿物を形成している場合には、70°C に温めて静かに攪拌し沈殿物を溶かします。
- 英語版 Handbook 14 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。

操作手順

1. **0.2 ml** のマイクロ遠心チューブ (別途準備) に採取した LMD サンプルに **15 µl** の Buffer ATL を添加する。
2. **10 µl** の Proteinase K を添加し、パルスボルテックスで **15 秒** 間混和する。
3. **0.2 ml** のチューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、**56°C** で **3 時間** (ホルマリン固定組織では **16 時間**)、時々攪拌しながらインキュベートする。
インキュベーション時間は採取した組織量により変動します。
4. **25 µl** の Buffer ATL を添加する。

5. **50 μ l の Buffer AL を添加後、蓋を閉めてボルテックスで 15 秒間混和する。**
効率的な溶解を行なうためには、サンプルと Buffer AL が完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。
6. **50 μ l のエタノール (96 ~ 100%) をサンプルに添加し、蓋を閉め、パルスボルテックスで 15 秒間完全に混和する。室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートする。**
注：室温が 25°C を超える場合には、ライセートに添加する前にエタノールを氷上で冷やしてください。
7. **スピンドウンして 0.2 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。**
8. **QIAamp MinElute Column (2 ml コレクションチューブ中) のカラムの縁を濡らさないように注意して、ステップ 7 の全ライセートをアプライする。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。**
遠心操作の後、ライセートが完全にカラムを通過していない場合には、QIAamp MinElute Column が空になるまでさらに高速で遠心操作を行ないます。
9. **QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l の Buffer AW1 を添加する。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。**
10. **QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l の Buffer AW2 を添加する。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。**
QIAamp MinElute Column とフロースルーが接触しないように注意します。ある種の遠心ローターでは減速の際に振動し、エタノールを含んだフロースルーが QIAamp MinElute Column に接触することがあります。また QIAamp MinElute Column とコレクションチューブをローターから取り出す際、フロースルーが QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。
11. **最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で 3 分間遠心操作してメンブレンを完全に乾燥させる。**
溶出液へのエタノールのキャリーオーバーはダウンストリームのアプリケーションで問題になることがあるので、このステップは必要です。

12. 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に **QIAamp MinElute Column** をセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。**QIAamp MinElute Column** の蓋を静かに開き、**20 ~ 100 μ l** の **Buffer AE** あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。

高い pH や EDTA が感度の高いダウンストリーム・アプリケーションに影響する場合には、水を用いて溶出します（英語版 Handbook 12 ページ）。

重要：Buffer AE あるいは蒸留水を室温（15 ~ 25°C）に戻したことを確認します。カラムに結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer AE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。ダウンストリームのアプリケーションでの必要性に応じて容量を調節します。回収される溶出液量は、カラムにアプライした溶出バッファ量よりも 5 μ l（最高）少なくなります。

13. 蓋を閉めて、室温（15 ~ 25°C）で 1 分間インキュベートする。最高速度（**20,000 x g ; 14,000 rpm**）で 1 分間遠心操作する。

Buffer AE あるいは水をアプライした QIAamp MinElute Column を遠心操作の前に室温で 5 分間インキュベートすると、DNA 収量は一般に増加します。

プロトコール：ゲノム DNA のクリーンアップ

本プロトコールは、ゲノム DNA のクリーンアップ用です。PCR に最適な DNA の再調製や、DNA の濃縮にご利用ください。

実験を始める前の重要事項：

- すべての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。

実験開始前の準備事項

- サンプルを室温（15～25℃）に戻します。
- 溶出用 Buffer AE あるいは蒸留水を室温に戻します。
- 英語版 Handbook 14 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。

操作手順

1. 100 μ l までのゲノム DNA (10 μ g までの DNA) を 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に入れる。

DNA 容量が 100 μ l より少ない場合には、イオン交換水を加えて最終容量を 100 μ l に調整します。

2. 10 μ l の Buffer AW1 を添加する。
3. 250 μ l の Buffer AW2 を添加してパルスボルテックスにより 10 秒間混和する。
4. ステップ 3 からのサンプルを QIAamp MinElute Column にカラムの縁を濡らさないように注意してアプライする。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。
5. QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l の Buffer AW2 を添加する。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。

QIAamp MinElute Column とフロースルーが接触しないように注意します。ある種の遠心ローターでは減速の際に振動し、エタノールを含んだフロースルーが QIAamp MinElute Column に接触することがあります。また QIAamp MinElute Column とコレクションチューブをローターから取り出す際、フロースルーが QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。

6. 最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で 3 分間遠心操作してメンブレンを完全に乾燥させる。

溶出液へのエタノールのキャリーオーバーはダウンストリームのアプリケーションで問題になることがあるので、このステップは必要です。

7. 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に **QIAamp MinElute Column** をセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。**QIAamp MinElute Column** の蓋を静かに開き、**20 ~ 100 µl** の **Buffer AE** あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。

高い pH や EDTA が感度の高いダウンストリーム・アプリケーションに影響する場合には、水を用いて溶出します（英語版 Handbook 12 ページ）。

重要：Buffer AE あるいは蒸留水を室温（15 ~ 25°C）に戻したことを確認します。少量（<50 µl）で溶出を行なう際には、カラムに結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer AE または蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。ダウンストリームのアプリケーションでの必要性に応じて容量を調節します。回収される溶出液量は、カラムにアプライした溶出バッファー量よりも 5 µl（最高）少なくなります。

8. 蓋を閉めて、室温（15 ~ 25°C）で 1 分間インキュベートする。最高速度（**20,000 x g ; 14,000 rpm**）で 1 分間遠心操作する。

Buffer AE あるいは水をアプライした QIAamp MinElute Column を遠心操作の前に室温で 5 分間インキュベートすると、DNA 収量は一般に増加します。

トラブルシューティング

コメント

溶出液中に DNA が少ないか皆無

- | | |
|---|--|
| a) キャリア RNA を Buffer AL に添加していない | Buffer AE で溶解したキャリア RNA を Buffer AL と混和する (英語版 Handbook 15 ページ)。新しいサンプルで精製操作を再度行なう。 |
| b) サンプルの凍結と融解を 2 回以上行なわない | サンプルを繰り返して凍結・融解することを避ける。常に新鮮なサンプルあるいは一回のみ解凍したサンプルを使用する。 |
| c) サンプルを室温で長期間放置した | 室温での長期保存によりサンプル中の DNA が分解されることがある。常に新鮮なサンプルを使用するか、2 ~ 8℃ (液状の血液) あるいは -20℃ (組織サンプル) でサンプルを保存する。乾燥血液斑あるいは血痕は DNA 分解がないので遮光して室温で保存することが可能。 |
| d) Buffer AL 中でのサンプル溶解が不十分 | Proteinase K が高温で長期間保存されていた。新しいサンプルと新しく調製した Proteinase K を用いて操作を繰り返す。 |
| e) Buffer AL とキャリア RNA の混和が不十分 | Buffer AL とキャリア RNA の入ったチューブを少なくとも 10 回静かに転倒させることにより混和させる。 |
| f) 96 ~ 100% エタノールの代わりに低いパーセントのエタノールを使用した | 新しいサンプルと 96 ~ 100% エタノールで精製操作を繰り返す。 |
| g) Buffer AW1 あるいは AW2 の調製が不正確 | Buffer AW1 および AW2 濃縮液を 96 ~ 100% のエタノールで正確に希釈したことを確認する。新しいサンプルで精製操作をやり直す。 |
| h) 溶出に使用した水の pH 値が低すぎる | DNA は酸性溶液で溶解しにくい。溶出に使用した水の pH 値が 7 より高いことを確認する。 |

コメント

DNA を用いたダウンストリームの酵素反応で良好な実験結果が得られない

- | | | |
|----|---|---|
| a) | 溶出液中に DNA が少ないか皆無 | “溶出液中の DNA が少ないか皆無” (20 ページ) を参照にして原因究明する。可能なら、反応液に添加する溶出液量を増やす。 |
| b) | 溶出液中のキャリア RNA が多すぎるか少なすぎる | 増幅反応に最適なキャリア RNA の最大量を決める。それに応じて Buffer AL に添加するキャリア RNA の濃度を調節する。 |
| c) | 感度が低下 | 増幅反応に適した溶出液の最大量を決める。それに応じて増幅反応液に添加する溶出液量を増減する。溶出液量はこれに比例して調節する。
溶出の際に Buffer AE の代わりに水を使用 (英語版 Handbook 12 ページ)。 |
| d) | ダウンストリームのアッセイで精製 DNA のパフォーマンスが洗浄バッファの調製日により変動 | 洗浄バッファである Buffer AW1 および AW2 の塩とエタノール成分が長期間放置した後分離した。使用前に常にバッファを完全に混和する。 |
| e) | PCR に使用した溶出液中に Buffer AE が多すぎる | 溶出用 Buffer AE は EDTA を含み pH 9.0 に調節されている。ある種の Taq DNA Polymerase は EDTA により阻害され、かつ／あるいは至適 pH 範囲が狭い。Buffer AE の代わりに蒸留水を溶出に用いる。
QIAGEN HotStarTaq® DNA Polymerase のような他の DNA Polymerase を使用する。 |

一般的な操作

- | | | |
|----|------------------------------|--|
| a) | QIAamp MinElute Column の目詰まり | 溶解が不完全なためにメンブレンが目詰まりした。サンプルを完全に溶解するために溶解時間を延長する。 |
| b) | 溶出量の変動 | 異なるサンプルタイプを調製した。 |

— Memo —

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, HotStarTaq®, MinElute® (QIAGEN Group); FTA®, Whatman® (Whatman PLC); Leica® (Leica Microsystems GmbH).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載の QIAGEN 製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2010 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒 104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II

Tel: 03-6890-7300 ■ Fax: 03-5547-0818 ■ E-mail: techservice-jp@qiagen.com

