

DNeasy[®] Blood & Tissue

プロトコールとトラブルシューティング

DNeasy Blood & Tissue Kit

DNeasy 96 Blood & Tissue Kit

下記サンプルからのトータル DNA 精製：

動物血液

動物組織

げっ歯類の尾

耳穿孔

培養細胞

固定組織

バクテリア

昆虫



目次

DNA 精製プロトコール

動物血液あるいは細胞からのトータル DNA 精製 (スピнкаラム・プロトコール)	3
動物組織からのトータル DNA 精製 (スピнкаラム・プロトコール)	6
動物血液あるいは細胞からのトータル DNA 精製 (DNeasy 96 プロトコール)	10
動物組織からのトータル DNA 精製 (DNeasy 96 プロトコール)	14

前処理プロトコール

パラフィン包埋組織の前処理	20
ホルマリン固定した組織の前処理	22
グラム陰性菌の前処理	23
グラム陽性菌の前処理	24
トラブルシューティング	26

プロトコール：動物血液あるいは細胞からのトータル DNA 精製（スピンカラム・プロトコール）

本プロトコールは、動物血液（有核および無核赤血球）あるいは動物／ヒト・培養細胞からのトータル DNA 精製用にデザインされています。

実験を始める前の重要事項

- DNeasy Blood & Tissue Kit を初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 15 ページ）をお読みください。
- すべての遠心操作はマイクロ遠心機を用いて室温（15～25℃）で行なってください。
- ポルテックス操作は 5～10 秒間のパルスポルテックスを行なってください。
- PBS はステップ 1 で必要です（組成に関しては英語版 Handbook 14 ページを参照）。Buffer ATL はこのプロトコールでは必要ありません。
- オプション：操作中に RNA を分解するために RNase A を使用できます。RNase A は DNeasy Blood & Tissue Kit に添付されておりません（英語版 Handbook 19 ページの“Copurification of RNA”を参照）。

実験を始める前の準備事項

- Buffer AL は保存中に沈殿物を形成することがあります。その際は、56℃に加熱して沈殿物を完全に溶かします。
- Buffer AW1 および Buffer AW2 は濃縮液としてお届けします。最初に使用する前に、容器に記載されているように適切な量のエタノール（96～100%）を加えてワーキング溶液を調製します。
- ステップ 2 で使用するサーモミキサー、シェーカー付ウォーターバスあるいはペリーダンスを前もって 56℃に設定します。

操作手順

1. 無核赤血球からなる血液はステップ 1a、有核赤血球からなる血液はステップ 1b、培養細胞はステップ 1c に進む。

哺乳動物の血液は無核赤血球を含んでいます。鳥類、魚類、カエルのような動物の血液は有核赤血球を含んでいます。

- 1a. 無核赤血球血液：20 μ l の Proteinase K を 1.5 ml あるいは 2 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）にピペットで入れる。抗凝血処理された 50～100 μ l の血液を添加する。PBS で容量を 220 μ l に調節する。ステップ 2 に進む。

オプション：RNA フリーのゲノム DNA が必要な場合は、4 μ l の RNase A（100 mg/ml）を添加し、室温（15～25℃）で 2 分間インキュベートしてからステップ 2 に進みます。

- 1b. 有核赤血球血液：20 μ l の Proteinase K を 1.5 ml あるいは 2 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）にピペットで入れる。抗凝血処理された血液 5 ~ 10 μ l を添加する。PBS で容量を 220 μ l に調節する。ステップ 2 に進む。

オプション：RNA フリーのゲノム DNA が必要な場合は、4 μ l の RNase A (100 mg/ml) を添加し、室温 (15 ~ 25°C) で 2 分間インキュベートしてからステップ 2 に進みます。

- 1c. 培養細胞：適切な数の細胞（最大 5×10^6 個）を 300 x g で 5 分間遠心分離する。ペレットを PBS 200 μ l で再懸濁する。20 μ l の Proteinase K を添加し、ステップ 2 に進む。

凍結した細胞ペレットを使用する場合は、PBS を加える前にペレットが見えなくなるまでチューブを指で弾いて細胞を解凍します。

適切な細胞数を操作で用いていることを確認します。HeLa 細胞など多倍数性の細胞株では、英語版 Handbook 16 ページ、Table 1 に記載されている最大細胞数よりは少ない数を使用することをお勧めします。

オプション：RNA フリーのゲノム DNA が必要な場合は、4 μ l の RNase A (100 mg/ml) を添加しボルテックス操作で混和、室温 (15 ~ 25°C) で 2 分間インキュベートしてからステップ 2 に進みます。

2. 200 μ l の Buffer AL（エタノール未添加）を加える。ボルテックス操作で完全に混和後、56°C で 10 分間インキュベートする。

Buffer AL にエタノールを添加していないことを確認してください（英語版 Handbook 18 ページの“Buffer AL”を参照）。Buffer AL の別途購入も可能です（英語版 Handbook 56 ページの ordering information を参照）。

サンプルと Buffer AL を迅速かつ十分にミックスし、ボルテックス操作あるいはピペティングで完全に均一な溶液とすることが重要です。

3. エタノール（96 ~ 100%）200 μ l をサンプルに添加し、ボルテックス操作で十分にミックスする。

サンプルとエタノールを完全に混和し、均一な溶液にすることが重要です。

4. ステップ 3 の混合液を新しい 2 ml コレクションチューブ（添付）中の DNeasy Mini Spin Column に移す。6,000 x g (8000 rpm) 以上で 1 分間遠心操作する。ろ液およびコレクションチューブを捨てる*。

5. DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ（添付）に移し、Buffer AW1 500 μ l を添加し、6,000 x g (8,000 rpm) 以上で 1 分間遠心分離する。ろ液およびコレクションチューブを捨てる*。

* フロースルー液は Buffer AL あるいは Buffer AW1 を含んでいるので、漂白剤と一緒にしないでください。“Safety Information” は英語版 Handbook 8 ページをご覧ください。

6. **DNeasy Mini Spin Column** を新しい 2 ml コレクションチューブ (添付) に移し、500 μ l の **Buffer AW2** を添加し、20,000 x g (14,000 rpm) 以上で 3 分間遠心して **DNeasy** を乾燥させる。ろ液およびコレクションチューブを捨てる。

残存エタノールはその後の反応を阻害することがあるので、DNeasy Mini Spin Column のメンブレンが完全に乾燥していることが重要です。次の溶出ステップでエタノールが残留しないようにこの遠心操作を行ないます。

遠心分離後、エタノールのキャリーオーバーが起きるので、DNeasy Mini Spin Column がろ液と接触しないように気をつけてローターからカラムを取り出してください。エタノールのキャリーオーバーが生じた場合は、空にしたコレクションチューブを再度用いて、もう一度 20,000 x g (14,000 rpm) で 1 分間遠心操作します。

7. **DNeasy Mini Spin Column** を新しい 1.5 ml あるいは 2 ml マイクロチューブ (別途準備) に移し、200 μ l の **Buffer AE** を **DNeasy** メンブレン上に直接添加する。室温 (15 ~ 25°C) で 1 分間インキュベートした後、6,000 x g (8,000 rpm) 以上で 1 分間遠心分離し、溶出する。

100 μ l (200 μ l のかわりに) で溶出する場合には、溶出液中の最終 DNA 濃度は増加しますが、DNA 収量は減少します (英語版 Handbook 21 ページ、Figure 2 参照)。

8. **推奨** : DNA 収量を最大にするために、ステップ7に記載されている溶出をもう一度繰り返す。

このステップにより DNA 収量は全体的に増加します。

2 回目の溶出に新しいマイクロチューブを使用することで、最初の溶出液の希釈を避けることが可能です。または、ステップ7で用いたマイクロチューブをそのまま 2 回目の溶出ステップでも用いて、溶出液を一緒にすることもできます。

注 : DNeasy Mini Spin Column と溶出液が接触するのを避けるために、1.5 ml マイクロ遠心チューブでは、200 μ l 以上で溶出を行なわないでください。

プロトコール：動物組織からのトータル DNA 精製 (スピнкаラム・プロトコール)

本プロトコールは、げっ歯類の尾など動物組織からのトータル DNA 精製用にデザインされています。

実験を始める前の重要事項

- DNeasy Blood & Tissue Kit を初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 15 ページ）をお読みください。
- 固定組織に関しては、20 ページの前処理プロトコール“パラフィン包埋組織の前処理”や 22 ページの“ホルマリン固定した組織の前処理”を参照してください。
- すべての遠心操作はマイクロ遠心機を用いて室温（15～25℃）で行なってください。
- ボルテックス操作は 5～10 秒間のパルスボルテックスを行なってください。
- オプション：操作中に RNase A を用いて RNA を分解することができます。RNase A は DNeasy Blood & Tissue Kit に添付されておりません（英語版 Handbook 19 ページの“Copurification of RNA”を参照）。

実験を始める前の準備事項

- Buffer ATL および Buffer AL は保存中に沈殿物を形成することがあります。その際は、56℃で加熱して沈殿物を完全に溶かします。
- Buffer AW1 および Buffer AW2 は濃縮液としてお届けします。最初に使用する前に、容器に記載されている様に適切な量のエタノール（96～100%）を加えてワーキング溶液を調製します。
- ステップ 2 で使用するサーモミキサー、シェーカー付ウォーターバスあるいはペリダンスを前もって 56℃に設定します。
- 凍結サンプルを使用の場合はサンプルを室温（15～25℃）にしてください。DNA のサイズが短くなるのでサンプルの解凍・融解を繰り返さないでください。

操作手順

1. 組織 25 mg（脾臓は 10 mg まで）を細かくカットし、1.5 ml のマイクロ遠心チューブに入れる。げっ歯類の尾を使用する場合は、長さ 0.4～0.6 cm に切断した尾 1 片（ラット）あるいは 2 片（マウス）を 1.5 ml マイクロ遠心チューブに入れる。180 μ l の Buffer ATL を添加する。

正確な量のスタートサンプルを用いたことを確認します（英語版 Handbook 15 ページの“Starting amounts of samples”を参照）。脾臓のような一定重量中に非常に多くの細胞数を含む組織から DNA を調製する場合には、10 mg 以上は使用しないでください。

溶解をより効率的に行なうために組織を必ず細かくカットすることをお勧めします。Buffer ATLとProteinase Kを添加する前に、液体窒素中*でサンプルをすり砕くことにより、溶解時間を短縮することができます。

あるいは、Proteinase K分解を行なう前に、QIAGEN TissueRuptor™などのローター/ステーター方式ホモジナイザー、あるいはQIAGEN TissueLyserのようなビーズミルを用いて組織サンプルを効率的に破碎することも可能です（英語版 Handbook 56 ページの ordering information を参照）。TissueLyserを用いて最高 48 サンプルまでの同時破碎を行なうための追加プロトコルは、弊社テクニカルサポート（Tel：03-6890-7300）にお問い合わせください。

尾の使用量は、最高 1.2 cm（マウス）あるいは 0.6 cm（ラット）です。成熟マウスあるいはラットの尾から DNA を精製する際には、0.4 ~ 0.6 cm の尾を使用することをお勧めします。

- 2. Proteinase K 20 μ l を添加後、ボルテックス操作して混和し、組織が完全に溶解するまで 56°C でインキュベートする。サンプルを効率的に溶解するためにインキュベーション中に時々ボルテックス操作する、またはサーモミキサー、シェーカー付ウォーターバスあるいはベリードランスを使用する。**

溶解時間は使用する組織タイプにより変動します。溶解は通常 1 ~ 3 時間で、げっ歯類の尾では 6 ~ 8 時間で完了します。溶解を一晩中行なっても調製には影響しません。

インキュベーション後、ライセートが粘性を帯びることがありますが、ゼラチン状になってしまうと DNeasy Mini Spin Column の目詰まりをおこします。ライセートがゼラチン状になった場合には、26 ページのトラブルシューティングを参照してください。

オプション：RNA フリーのゲノム DNA が必要な場合は、4 μ l の RNase A (100 mg/ml) を添加しボルテックス操作で混和、室温 (15 ~ 25°C) で 2 分間インキュベートしてからステップ 3 に進みます。

肝臓や腎臓のような転写反応が活発な組織は RNA 含有量が高いので、ゲノム DNA と共に RNA が精製されます。げっ歯類の尾のように RNA 含有量が低い組織、あるいは残存 RNA が問題にならない場合は、RNase 分解は不要です。

- 3. 15 秒間ボルテックス操作する。200 μ l の Buffer AL をサンプルに添加し、ボルテックス操作で十分にミックスする。200 μ l のエタノール (96 ~ 100%) をサンプルに添加し、再びボルテックス操作で十分にミックスする。**

サンプル、Buffer AL およびエタノールをボルテックス操作あるいはピペッティングで迅速かつ十分に混和し、完全に均一な溶液にすることが重要です。Buffer AL とエタノールを前もってミックスして 1 ステップで一緒に添加することにより、複数のサンプルを処理する際に時間を節約することができます。

* 試薬類を取り扱う際には適切な実験着、使い捨て手袋、保護眼鏡を常に着用してください。詳細は製品メーカーの相当する MSDS (material safety data sheet) をご覧ください。

Buffer AL とエタノールの添加により白色の沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は DNeasy 調製に影響しません。ある種の組織（例；脾臓、肺）は Buffer AL とエタノールの添加後にゼラチン状のライセートを形成することがあります。この場合には、調製液を激しく攪拌するかボルテックス操作することをお奨めします。

4. ステップ 3 の混合液（形成した沈殿物を含む）を、新しい 2 ml コレクションチューブ（添付）中の DNeasy Mini Spin Column に移す。6,000 x g (8,000 rpm) 以上で 1 分間遠心操作する。ろ液およびコレクションチューブを捨てる*。
5. DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ（添付）に移し、500 μ l の Buffer AW1 を添加し、6,000 x g (8,000 rpm) 以上で 1 分間遠心分離する。ろ液およびコレクションチューブを捨てる*。
6. DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ（添付）に移し、500 μ l の Buffer AW2 を添加し、20,000 x g (14,000 rpm) で 3 分間遠心して DNeasy メンブレンを乾燥させる。ろ液およびコレクションチューブを捨てる。残存エタノールはその後の反応を阻害することがあるので、DNeasy Mini Spin Column のメンブレンが完全に乾燥していることが重要です。次の溶出ステップでエタノールのキャリーオーバーを避けるためにこの遠心操作を行いません。遠心分離後、エタノールのキャリーオーバーを避けるために、DNeasy Mini Spin Column がろ液と接触しないように気をつけてローターからカラムを取り出してください。エタノールのキャリーオーバーが生じた場合は、コレクションチューブを空にして、このチューブを用いて、もう一度 20,000 x g (14,000 rpm) で 1 分間遠心操作します。
7. DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5 ml あるいは 2 ml マイクロチューブ（別途準備）に移し、200 μ l の Buffer AE を DNeasy メンブレン上に直接ピペットで添加する。室温 (15 ~ 25°C) で 1 分間インキュベートした後、6,000 x g (8,000 rpm) 以上で 1 分間遠心分離し、溶出する。100 μ l (200 μ l のかわりに) で溶出する場合には、溶出液中の最終 DNA 濃度は増加しますが、DNA の全体量は減少します（英語版 Handbook 21 ページ、Figure 2 参照）。

* フロースルー液は Buffer AL あるいは Buffer AW1 を含んでいるので、漂白剤と一緒にしないでください。“Safety Information” は英語版 Handbook 8 ページをご覧ください。

8. 推奨：DNA 収量を最大にするために、ステップ7に記載されている溶出をもう一度繰り返す。

このステップにより DNA 収量は全体的に増加します。

2 回目の溶出に新しいマイクロチューブを使用することで、最初の溶出液の希釈を避けることが可能です。または、ステップ7で用いたマイクロチューブをそのまま2回目の溶出ステップでも用いて、溶出液を一緒にすることもできます。

注：DNeasy Mini Spin Column と溶出液が接触するので、1.5 ml マイクロ遠心チューブでは、200 μ l 以上で溶出を行わないでください。

プロトコール：動物血液あるいは細胞からのトータルDNA精製 (DNeasy 96 プロトコール)

本プロトコールは、動物血液（有核および無核赤血球）あるいは動物／ヒトの培養細胞からのトータルDNAのハイスループット精製用にデザインされています。

実験を始める前の重要事項

- DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 15 ページ）をお読みください。
- 全ての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。
- PBS はステップ 1 で必要です（組成に関しては英語版 Handbook 14 ページを参照）。Buffer ATL はこのプロトコールでは必要ありません。
- 使用前に Buffer AL にエタノールを添加していないことを確認してください（英語版 Handbook 15 ページの “Important Notes” を参照）。Buffer AL の別途購入も可能です（英語版 Handbook 56 ページの ordering information を参照）。
- オプション：操作中に RNA を分解するために RNase A を使用できます。RNase A は DNeasy 96 Blood & Tissue Kit に添付されておりません（英語版 Handbook 19 ページの “Copurification of RNA” を参照）。

実験を始める前の準備事項

- Buffer ATL および Buffer AL は保存中に沈殿物を形成することがあります。その際は、56℃で5分間インキュベートして沈殿物を完全に溶かします。
- Buffer AW1 および Buffer AW2 は濃縮液としてお届けします。最初に使用する前に、容器に記載されている適切な量のエタノール(96～100%)を加えてワーキング溶液を調製します。
- 使用前に容器を数回反転させて Buffer AW1 を混和する。
- ステップ 2 で使用するインキュベーターを前もって 56℃に設定します。

操作手順

1. 無核赤血球からなる血液はステップ 1a、有核赤血球からなる血液はステップ 1b、培養細胞はステップ 1c に進む。

哺乳動物の血液は無核赤血球を含んでいます。鳥類、魚類、カエルのような動物の血液は有核赤血球を含んでいます。

- 1a. 無核赤血球血液：20 μ l の Proteinase K を各コレクション・マイクロチューブに添加する。抗凝血処理された血液 50～100 μ l をコレクション・マイクロチューブ 1 本あたりに添加する。96-Well-Plate Register（付属品）を用いて各サンプルの位置を決定する。PBS で容量を 220 μ l にそれぞれ調節する。ステップ 2 に進む。

オプション：RNA フリーのゲノム DNA が必要な場合は、4 μ l の RNase A (100 mg/ml) を添加し、室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートしてからステップ 2 に進みます。

ステップ 3 で使用するためにコレクション・マイクロチューブのラックからラック蓋を保管します。

- 1b. 有核赤血球血液：20 μ l の Proteinase K を各コレクション・マイクロチューブに添加する。抗凝血処理された血液 5 ~ 10 μ l を添加する。96-Well-Plate Register (付属品) を用いて各サンプルの位置を決定する。PBS で容量を 220 μ l にそれぞれ調節する。ステップ 2 に進む。**

オプション：RNA フリーのゲノム DNA が必要な場合は、4 μ l の RNase A (100 mg/ml) を添加し、室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートしてからステップ 2 に進みます。

ステップ 3 で使用するためにコレクション・マイクロチューブのラックからラック蓋を保管します。

- 1c. 培養細胞：適切な数の細胞 (各最大 5 x 10⁶ 個) を 300 x g で 5 分間遠心分離する。96-Well-Plate Register (付属品) を用いて各サンプルの位置を決定する。各ペレットを PBS 200 μ l で再懸濁する。各ウェルあたり 20 μ l の Proteinase K を添加する。ステップ 2 に進む。**

凍結した細胞ペレットを使用する場合は、PBS を加える前に、ペレットが見えなくなるまでチューブを指で弾いて細胞を解凍します。

適切な細胞数を操作で用いていることを確認します。HeLa 細胞など多倍数性の細胞株では、英語版 Handbook 16 ページ、Table 1 に記載されている最大細胞数よりは少ない数を使用することをお勧めします。

オプション：RNA フリーのゲノム DNA が必要な場合には、4 μ l の RNase A (100 mg/ml) を添加します。付属のキャップでコレクション・マイクロチューブをしっかりと閉じ、ボルテックス操作で混和し、室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートしてから、ステップ 2 に続けます。

ステップ 3 で使用するためにコレクション・マイクロチューブのラックからラック蓋を保管します。

- 2. 200 μ l の Buffer AL (エタノール未添加) を各サンプルに加える。**

使用前に Buffer AL にエタノールを添加していないことを確認してください (英語版 Handbook 18 ページの “Buffer AL” を参照)。Buffer AL の別途購入も可能です (英語版 Handbook 56 ページの ordering information を参照)。

- 3. 付属のキャップでコレクション・マイクロチューブをしっかりと閉めます。ラック蓋 (ステップ 1 で保管) をコレクション・マイクロチューブの各ラック上にセットし、15 秒間ラックを上下に激しく振る。キャップに付着した溶液を回収するために、コレクション・マイクロチューブを遠心する。遠心速度が 3,000 rpm に到達したら、遠心をストップする。**

このステップを延長しないでください。

重要：コレクション・マイクロチューブのラックを両手で上下に激しく振り、均一なライセートを作製します。コレクション・マイクロチューブのラックを転倒させるだけでは、混和が不十分です。激しく振ってもゲノム DNA は切断しません。ライセートと Buffer AL を迅速かつ十分にミックスし、完全に均一な溶液を調製します。

ステップ6で使用するためにコレクション・マイクロチューブのラックからラック蓋を保管します。

4. **56℃で10分間インキュベートする。**インキュベーション中、キャップの上に重しを置く。サンプルを効率的に溶解するために、時々混和するかベリードランスを使用する。

注：連続回転中にキャップが外れることがあるので、回転式あるいは垂直型のシェーカーを使用しないでください。ウォーターバスでインキュベーションを行なう際には、コレクション・マイクロチューブが完全に沈んでいないこと、ステップ5でキャップを外す前に付着した水を除去したことを必ず確認してください。

5. キャップを慎重に取り除き、各サンプルにエタノール (96 ~ 100%) 200 μ l を添加する。
6. 付属のキャップでコレクション・マイクロチューブをしっかりと閉める。ラック蓋をコレクション・マイクロチューブの各ラック上にセットし、15秒間ラックを上下に激しく振る。キャップに付着した溶液を回収するために、コレクション・マイクロチューブを遠心する。遠心速度が3,000 rpm に到達したら、遠心をストップする。

このステップを延長しないでください。

重要：コレクション・マイクロチューブのラックを両手で持ち上下に激しく振り、均一なライセートを作製します。コレクション・マイクロチューブのラックを転倒させるだけでは、混和が不十分です。激しく振ってもゲノム DNA は切断しません。ライセートとエタノールを迅速かつ十分にミックスし、完全に均一な溶液を調製します。

7. **S-Block (付属) 上に2枚のDNeasy 96 Plate をセットする。**後でサンプル同定するために DNeasy 96 Plate に印をつける。
8. コレクション・マイクロチューブからキャップを外し捨てる。ステップ6の各サンプルの溶解混和物 (最大 900 μ l) を DNeasy 96 Plate の各ウェルに慎重に移す。

遠心操作中にエアゾールの発生を避けるために、ウェルの縁が濡れないようにします。1ウェルあたり 900 μ l 以上を添加しないでください。

注：ウェルの底までピペット・チップを下げると、サンプルがオーバーフローしてクロスコンタミの原因になります。従って、キャップを一つずつ取り除き、ピペットの先が溶液に接触した状態でサンプルをウェルに注入します。すべてのサンプルが DNeasy 96 Plate に移るまでこれを繰り返します。

9. 各 DNeasy 96 Plate を AirPore Tape Sheet (付属) でシールする。6,000 rpm で 4 分間遠心操作を行なう。

AirPore Tape は遠心中のサンプル間のクロスコンタミを防ぎます。

遠心後、DNeasy 96 Plate の各ウェルのメンブレンをライセートがすべて通過したことを確認します。ライセートがウェルに残っている場合は、さらに 4 分間遠心操作します。

10. テープを除去する。500 μ l の Buffer AW1 を各サンプルに慎重に加える。

注：使用前にエタノールを Buffer AW1 に添加したことを確認します。

11. それぞれの DNeasy 96 Plate を新しい AirPore Tape Sheet (付属) でシールする。6,000 rpm で 2 分間遠心操作を行なう。

12. テープを除去する。500 μ l の Buffer AW2 を各サンプルに慎重に加える。

注：使用前にエタノールを Buffer AW2 に添加したかを確認します。

13. 6,000 rpm で 15 分間遠心操作を行なう。

プレート AirPore Tape でシールしないでください。

次の反応を阻害する可能性のあるサンプル中の残存エタノール (Buffer AW2 から) は、遠心中に発生する熱により蒸発します。

14. Elution Microtubes RS (付属) の新しいラック上に各 DNeasy 96 Plate を正しい位置にセットする。

15. DNA を溶出するために、各サンプルに 200 μ l の Buffer AE を添加し、DNeasy 96 Plate を新しい AirPore Tape Sheet (付属) でシールする。室温 (15 ~ 25°C) で 1 分間インキュベートする。6,000 rpm で 4 分間遠心操作を行なう。

200 μ l の Buffer AE で DNeasy 96 Plate の各ウェルから最高 75% の DNA を溶出することができます。

200 μ l 以下の容量で溶出すれば DNA の最終濃度は高くなりますが、DNA のトータル収量が減少することがあります。1 μ g 未満の DNA を含むサンプルに関しては、50 μ l の Buffer AE で溶出することをお勧めします。

16. 推奨：DNA 収量を最大にするために、ステップ 15 に記載されているように 200 μ l の Buffer AE で溶出をもう一度繰り返す。

200 μ l の Buffer AE を用いた 2 回目の溶出により、トータル DNA 収量は最高 25% まで増加します。しかし容量が増加するために、DNA 濃度は低下します。高濃度の DNA を得るためには、この 2 度目の溶出ステップに最初の溶出液 200 μ l を使って溶出します。これにより収量は最高 15% 増加します。

新しいキャップ (付属) で Elution Microtubes RS をシールして保存します。

プロトコール：動物組織からのトータル DNA 精製 (DNeasy 96 プロトコール)

本プロトコールは、げっ歯類の尾など動物組織からのトータル DNA のハイスループレット精製用にデザインされています。

実験を始める前の重要事項

- DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 15 ページ）をお読みください。
- 全ての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。
- オプション：操作中に RNA を分解するために RNase A を使用できます。RNase A は DNeasy 96 Blood & Tissue Kit に添付されておりません（英語版 Handbook 19 ページの“Copurification of RNA”を参照）。

実験を始める前の準備事項

- 使用前に Buffer AL とエタノールを前もって混和します。86 ml の Buffer AL を含んだ容器に 90 ml のエタノール（96～100%）、あるいは 247 ml の Buffer AL を含んだ容器に 260 ml のエタノールを添加し、十分に攪拌します。エタノールを添加した容器に印をつけます（動物血液からの DNA 精製には、エタノール未添加の Buffer AL を使用します。動物血液からの DNA 精製に同じキットを使用する場合には、Buffer AL を別途購入できます）。
- Buffer AW1 および Buffer AW2 は濃縮液としてお届けします。最初に使用する前に、容器に記載されている様に適切な量のエタノール（96～100%）を加えてワーキング溶液を調製します。
- Buffer ATL および Buffer AL は保存中に沈殿物を形成することがあります。その際は、56℃で5分間インキュベートして沈殿物を完全に溶解します。
- 使用前に容器を何度か反転して Buffer AW1 を混和します。
- ステップ 4 で使用するインキュベーターを前もって 56℃に設定します。
- 凍結組織を使用する場合はサンプルを室温（15～25℃）にしてください。DNA のサイズが短くなるのでサンプルの解凍・融解を繰り返さないでください。

操作手順

1. 組織 20 mg (脾臓は 10 mg まで) を細かくカットする。長さ 0.4 ~ 0.6 cm に切断した尾を 1 片 (ラット) あるいは 2 片 (マウス) をコレクション・マイクロチューブに入れる。96-Well-Plate Register (付属品) を用いて各サンプルの位置を決定する。

正確な量のスタートサンプルを用いていることを確認します (英語版 Handbook 15 ページ “Starting amounts of samples” を参照)。脾臓のような同一重量中に非常に多くの細胞数を含む組織からの DNA 調製の場合には、10 mg 以上は使用しないでください。

溶解をより効率的に行なうために組織を必ず細かくカットすることを強くお勧めします。Buffer ATL と Proteinase K を添加する前に、QIAGEN TissueLyser のようなビーズミルを用いて組織サンプルを効率的に破碎することにより、溶解時間を短縮することができます (英語版 Handbook 56 ページの ordering information を参照)。TissueLyser を用いて最高 48 組織サンプルの同時破碎を行なうための追加プロトコールは、弊社テクニカルサポートにお問い合わせください。

げっ歯類の尾の使用量は、最高 1.2 cm (マウス) あるいは 0.6 cm (ラット) です。成熟マウス/ラットの尾から DNA を精製する際には、0.4 ~ 0.6 cm の尾を使用することをお勧めします。

適切な数のサンプルが集まるまで (最高 192 サンプル)、サンプルを -20°C で保存します。サンプルは -20°C で数週間から数ヶ月保存可能で、DNA 収量の低下はありません。DNA 収量はサンプルの種類、長さ、週齢、動物種により異なりますが、平均約 10 ~ 30 µg です (英語版 Handbook 22 ページの “Expected yields” を参照)。

ステップ 3 で使用するためにコレクション・マイクロチューブのラックからラック蓋を保管しておきます。

2. 1 サンプルあたり、20 µl の Proteinase K ストック溶液と 180 µl の Buffer ATL を含む Proteinase K-Buffer ATL ワーキング溶液を調製し、ボルテックス操作により混和する。96 サンプル 1 セットでは 2 ml の Proteinase K ストック溶液と 18 ml の Buffer ATL を使用する。尾切片あるいは組織サンプルの入ったコレクション・マイクロチューブに各 200 µl のワーキング溶液を迅速にピペットで入れる。付属のキャップでマイクロチューブをしっかりと閉める。

注: Buffer ATL の沈殿をチェックします。必要であればワーキング溶液を調製する前に 56°C で 5 分間インキュベートして沈殿物を完全に溶解します。

重要: 調製後、Proteinase K-Buffer ATL ワーキング溶液を即座に、尾あるいは組織サンプルの入ったコレクション・マイクロチューブに分注します。基質の無い状態でワーキング溶液を 30 分以上インキュベートすると、溶解効率と DNA 純度が低下します。

3. 振盪中の漏れを避けるために、マイクロチューブをしっかりとシールする。ラック蓋（ステップ1で保管）をコレクション・マイクロチューブの各ラック上にセットし、コレクション・マイクロチューブのラックを転倒混和する。キャップに付着した溶液を回収するために、コレクション・マイクロチューブを遠心する。遠心速度が3,000 rpm に到達したら、遠心をストップする。遠心操作の後、サンプルを完全に Proteinase K-Buffer ATL ワーキング溶液中に沈めることが重要。

サンプルが完全に Proteinase K-Buffer ATL ワーキング溶液に浸っていない場合には、溶液をサンプルあたり 300 μ l 増加します（試薬が必要な場合は別途購入可能、英語版 Handbook 56 ページの ordering information を参照）。次のステップでコレクション・マイクロチューブの許容量を越えてしまうので、容量は 300 μ l 以上にならないようにします。

ステップ5で使用するためにコレクション・マイクロチューブのラックからラック蓋を保管します。

4. 56°C でオーバーナイトあるいはサンプルが完全に溶解するまでインキュベートする。インキュベーション中、キャップの上に重しを置く。サンプルを効率的に溶解するために、時々ボルテックス操作するかベリダンスを使用する。溶解時間は使用する尾や組織の種類、週齢、量により変動します。通常、溶解は1～3時間で、げっ歯類の尾では6～8時間で完了しますが、一晩溶解すると最良の結果が得られます。

インキュベーション後、ライセートが粘性を帯びることがありますが、ゼラチン状になってしまうと DNeasy 96 メンブレンの目詰まりをおこします。ライセートがゼラチン状になった場合には、27 ページのトラブルシューティングを参照してください。

注：連続回転中にキャップが外れることがあるので、回転式あるいは垂直型のシェーカーを使用しないでください。ウォーターバスでインキュベーションを行なう際には、コレクション・マイクロチューブが完全に沈んでいないこと、ステップ5で遠心する前に付着した水を除去したことを必ず確認してください。

5. 振盪中の漏れを避けるために、マイクロチューブをしっかりとシールする。ラック蓋をコレクション・マイクロチューブの各ラック上にセットし、15 秒間ラックを上下に激しく振る。キャップに付着した溶液を回収するために、コレクション・マイクロチューブを遠心する。遠心速度が3,000 rpm に到達したら、遠心をストップする。

重要：コレクション・マイクロチューブのラックを両手で上下に激しく振り、均一なライセートを作製します。コレクション・マイクロチューブのラックを転倒させるだけでは、混和が不十分です。激しく振ってもゲノム DNA は切断しません。

ステップ7で使用するためにコレクション・マイクロチューブのラックからラック蓋を保管しておきます。

溶解が完了してからステップ6に進みます。激しく攪拌してライセートを均一にします。これをチェックするために、コレクション・マイクロチューブのラックをゆっくり転倒し（キャップを固く閉めていることを確認）、ゼラチン状の塊を探します。ゼラチン状の塊が観察される場合は、さらに 100 μ l の Buffer ATL と 15 μ l の Proteinase K を添加し、3 時間インキュベートします。最高の収量を得るために、また DNeasy 96 Plate の各ウェルの目詰まりを避けるためには、サンプルが完全に溶解していることが重要です。

オプション： RNA フリーのゲノム DNA が必要な場合には、4 μ l の RNase A (100 mg/ml) を添加します。新しいキャップでコレクション・マイクロチューブをしっかりと閉じ、激しく攪拌して混和し、室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートします。キャップに付着した溶液を回収するために、コレクション・マイクロチューブを遠心します。遠心速度が 3,000 rpm に到達したら、遠心をストップします。キャップを外し、ステップ6のプロトコールに進みます。

肝臓や腎臓のような転写反応が活発な組織は RNA 含有量が高いので、ゲノム DNA と共に RNA が精製されます。げっ歯類の尾のように RNA 含有量が低い組織、あるいは残存 RNA が問題にならない場合は、通常 RNase A 分解は不要です。

6. キャップを慎重に取り除く。混和済みの Buffer AL- エタノール 410 μ l を各サンプルに加える。

注：使用前に Buffer AL にエタノールを添加したことを確認してください（英語版 Handbook 18 ページの “Buffer AL” を参照）。

注：Buffer AL とエタノールをライセートに添加すると、白色の沈殿物が生じることがあります。沈殿も含む全ライセートをステップ9で DNeasy 96 Plate にアプライすることが重要です。この沈殿物は DNeasy 調製あるいはどのような精製後の実験にも影響を与えません。

ステップ3あるいは5で Buffer ATL と Proteinase K の量が増加した場合は、Buffer AL- エタノールの量を適宜増やしてください。例えば、300 μ l の Proteinase K-Buffer ATL ワーキング溶液には 615 μ l の Buffer AL- エタノールが必要です。

7. 振盪中の漏れを避けるために、マイクロチューブをしっかりとシールする。ラック蓋をコレクション・マイクロチューブの各ラック上にセットし、15 秒間ラックを上下に激しく振る。キャップに付着した溶液を回収するために、コレクション・マイクロチューブを遠心する。遠心速度が 3,000 rpm に到達したら、遠心をストップする。

このステップを延長しないでください。

重要: コレクション・マイクロチューブのラックを両手で持ち上下に激しく振り、均一なライセートを作製します。コレクション・マイクロチューブのラックを転倒させるだけでは、混和が不十分です。激しく振ってもゲノム DNA は切断しません。ライセートと Buffer AL- エタノールを迅速かつ十分にミックスし、完全に均一な溶液を調製します。

8. **S-Block** (付属) 上に **2 枚の DNeasy 96 Plate** をセットする。後でサンプルを同定するために **DNeasy 96 Plate** に印をつける。
9. コレクション・マイクロチューブからキャップを外し捨てる。ステップ 7 の各サンプルのライセート (最大 900 μ l) を **DNeasy 96 Plate** の各ウェルに慎重に移す。

遠心操作中にエアゾールの発生を避けるために、ウェルの縁が濡れないようにします。1 ウェルあたり 900 μ l 以上を添加しないでください。

注: ウェルの底までピペット・チップを下げると、サンプルがオーバーフローしてクロスコンタミの原因になります。従って、キャップを一つずつ取り除き、ピペットの先が溶液に接触した状態でサンプルをウェルに注入します。すべてのサンプルが **DNeasy 96 Plate** に移されるまでこれを繰り返します。

注: ステップ 3 あるいは 5 で Proteinase K-Buffer ATL ワーキング溶液の量が増加した場合は、900 μ l 以下の上清 (ステップ 7 から) を **DNeasy 96 Plate** に移します。これより多いと個々のウェルの許容量を超えます。トータル DNA 収量にあまり影響しないので、ステップ 7 の残った上清は棄てます。

10. 各 **DNeasy 96 Plate** を **AirPore Tape Sheet** (付属) でシールする。6,000 rpm で 10 分間遠心操作を行なう。

AirPore Tape は遠心中のサンプル間のクロスコンタミを防ぎます。

遠心後、**DNeasy 96 Plate** の各ウェルのメンブレンをライセートが全て通過したことを確認します。ライセートがウェルに残っている場合は、さらに 10 分間遠心操作します。

11. テープを除去する。500 μ l の **Buffer AW1** を各サンプルに慎重に加える。

注: 使用前にエタノールを **Buffer AW1** に添加したかを確認します。

ステップ 3 あるいは 5 で Proteinase K-Buffer ATL ワーキング溶液の量を増加した場合でも、**Buffer AW1** の量を増加する必要はありません。

12. 各 **DNeasy 96 Plate** を新しい **AirPore Tape Sheet** (付属) でシールし、6,000 rpm で 5 分間遠心操作を行なう。

13. テープを除去する。500 μ l の Buffer AW2 を各サンプルに慎重に加える。

注：使用前にエタノールを Buffer AW2 に添加したかを確認します。

ステップ 3 あるいは 5 で Proteinase K-Buffer ATL ワーキング溶液の量を増加した場合でも、Buffer AW2 の量を増加する必要はありません。

14. 6,000 rpm で 15 分間遠心操作を行なう。

プレート を AirPore Tape でシールしないでください。

次の反応を妨害する可能性のあるサンプル中の残存エタノール（Buffer AW2 から）は、遠心中に発生する熱により蒸発します。

15. Elution Microtubes RS（付属）の新しいラック上に正しい位置で各 DNeasy 96 Plate をセットする。

16. DNA を溶出するために、各サンプルに 200 μ l の Buffer AE を添加し、DNeasy 96 Plate を新しい AirPore Tape Sheet（付属）でシールする。室温（15 ~ 25°C）で 1 分間インキュベートする。6,000 rpm で 2 分間遠心操作を行なう。

200 μ l の Buffer AE で DNeasy 96 Plate の各ウェルから最高 75% の DNA を溶出することができます。

200 μ l 以下の容量で溶出すれば DNA の最終濃度は高くなりますが、DNA のトータル収量が減少することがあります。1 μ g 未満の DNA を含むサンプルに関しては、50 μ l の Buffer AE で溶出することをお勧めします。

17. 推奨：DNA 収量を最大にするために、ステップ 16 に記載されているように 200 μ l の Buffer AE で溶出をもう一度繰り返す。

200 μ l の Buffer AE を用いた 2 回目の溶出により、トータル DNA 収量は最高 25% まで増加します。しかし容量が増加するために、DNA 濃度は低下します。高濃度の DNA を得るためには、この 2 度目の溶出ステップで最初の溶出液 200 μ l を使って溶出します。これにより収量は最高 15% 増加します。

新しいキャップ（付属）で Elution Microtubes RS をシールして保存します。

プロトコール：パラフィン包埋組織の前処理

本プロトコールは、パラフィン包埋した固定組織から DNeasy Blood & Tissue Kit を用いてトータル DNA を精製するためにデザインされています。本プロトコールではキシレン抽出によるパラフィン除去の前処理について記載しています。

実験を始める前の重要事項

- 固定組織から分離した DNA の長さはサンプルの種類、保存期間および固定化剤の品質により異なりますが、通常 650 bp 以下です。
- アルコールおよびホルマリンのような固定化剤の使用をお勧めします。オスミウム酸のようなクロスリンクを起こす固定化剤で固定した組織からの DNA の増幅は困難なので、固定化剤としてお勧めしません。
- 調製する組織のタイプによりサンプル溶解時間は異なります。
- 調製するサンプルの大きさ、保存期間により収量は異なります。新鮮な組織あるいは凍結した組織と比較して収量は減少することが予想されます。従って 50 ~ 100 μ l の Buffer AE で精製 DNA を溶出することをお勧めします。
- この前処理プロトコールは、DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を用いたハイスループット精製に関してはまだテスト・至適化されていません。本プロトコールで DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を使用する際には、一般的なガイドラインとしてスタートサンプル量を減らすことをお勧めします。

実験を始める前の準備事項

- ステップ 9 で使用するヒートブロック、インキュベーターあるいはウォーターバスを 37°C に加熱しておきます。

操作手順

1. パラフィン包埋組織の切片 (25 mg 以下) を 2 ml マイクロ遠心チューブ (別途準備) に入れる。
2. 1,200 μ l のキシレンを添加する。激しくボルテックス操作する。
3. 室温 (15 ~ 25°C)、フルスピードで 5 分間マイクロ遠心機で遠心分離する。
4. 上清をピペットで除去する。ペレットが剥がれないように注意する。
5. 残留しているキシレンを除去するために、エタノール (96 ~ 100%) 1,200 μ l をペレットに添加し、静かにボルテックス操作して混和する。
6. 室温 (15 ~ 25°C)、フルスピードで 5 分間マイクロ遠心機で遠心操作を行なう。
7. エタノールをピペットで注意深く除去する。ペレットが剥がれないように注意する。
8. ステップ 5 ~ 7 をもう一度繰り返す。

9. エタノールが蒸発するまで 37°C で 10 ~ 15 分間、マイクロ遠心チューブを開いてインキュベートする。
10. 180 μ l の Buffer ATL に組織サンプルのペレットを再懸濁させ、6 ページのプロトコール “動物組織からのトータル DNA 精製 (スピンカラム・プロトコール)” のステップ 2 に進む。

プロトコール：ホルマリン固定した組織の前処理

本プロトコールは、ホルマリン固定組織からのトータル DNA 精製用にデザインされています。本プロトコールでは、固定化剤を除去するために PBS で洗浄する前処理法について記載しています。

実験を始める前の重要事項

- 固定組織から分離した DNA の長さは、サンプルの種類、保存期間および固定化剤の品質により異なりますが、通常 650 bp 以下です。
- アルコールおよびホルマリンのような固定化剤の使用をお勧めします。オスミウム酸のようなクロスリンクを起こす固定化剤で固定した組織からの DNA の増幅は困難なので、固定化剤としてお勧めしません。
- 調製する組織のタイプによりサンプル溶解時間は異なります。
- 調製するサンプルの大きさ、保存期間により収量は異なります。新鮮あるいは凍結した組織と比較して収量は減少することが予想されます。従って 50 ~ 100 μ l の Buffer AE で精製 DNA を溶出することをお勧めします。
- この前処理プロトコールは、DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を用いたハイスルーブット精製に関してはまだテスト・至適化されていません。本プロトコールで DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を使用する際には、一般的なガイドラインとしてスタートサンプル量を減らすことをお勧めします。

操作手順

1. 固定化剤を除去するために PBS で 2 回サンプル (25 mg 以下) を洗浄する。
2. PBS を捨て、6 ページのプロトコール “動物組織からのトータル DNA 精製 (スピンカラム・プロトコール)” のステップ 1 に進む。

プロトコール：グラム陰性菌の前処理

本プロトコールは、大腸菌などのグラム陰性菌からのトータル DNA 精製用にデザインされています。本プロトコールでは、DNA 精製を行なう前の、バクテリアを採取する方法を記述しています。

実験を始める前の重要事項

- サンプルの採取と保存方法に関する詳細、およびバクテリア培養液の細胞数の計算法は英語版 Handbook 17 ページの “Quantification of starting material” を参照してください。
- この前処理プロトコールは、DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を用いたハイスループレット DNA 精製に関してはまだテスト・至適化がされていません。本プロトコールで DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を使用する際には、一般的なガイドラインとしてスタートサンプル量を減らすことをお勧めします。

操作手順

1. **5,000 x g (7,500 rpm)** で **10 分間の遠心分離**によりマイクロ遠心チューブに細胞 (最高 2×10^9 細胞) を回収する。上清を棄てる。
2. **180 μ l** の **Buffer ATL** でベレットを再懸濁する。
3. **6 ページのプロトコール “動物組織からのトータル DNA 精製 (スピンカラム・プロトコール)” のステップ 2** に進む。

プロトコール：グラム陽性菌の前処理

本プロトコールは、*Corynebacterium* spp. や *B. subtilis* などのグラム陽性菌からのトータル DNA 精製用にデザインされています。本プロトコールでは、DNA 精製を行なう前のバクテリアの採取方法および細胞壁を溶解するためにリゾチームとインキュベートする方法に関して記述しています。

実験を始める前の重要事項

- サンプルの採取と保存に関する詳細およびバクテリア培養液中の細胞数の計算方法は英語版 Handbook 17 ページの “Quantification of starting material” を参照してください。
- 使用前に Buffer AL にエタノールを添加していないことを確認してください（英語版 Handbook 18 ページの “Buffer AL” を参照）。Buffer AL の別途購入も可能です（英語版 Handbook 56 ページ、ordering information を参照）。
- この前処理プロトコールは、DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を用いたハイスループト DNA 精製に関してはまだテスト・至適化がされていません。本プロトコールで DNeasy 96 Blood & Tissue Kit を使用する際には、一般的なガイドラインとしてスタートサンプル量を減らすことをお勧めします。

実験を始める前の準備事項

- 英語版 Handbook 14 ページの “Equipment and Reagents to Be Supplied by User” に記載されているように酵素溶解バッファーを調製します。
- ステップ 3 で使用するヒートブロックあるいはウォーターバスをあらかじめ 37℃ に加熱します。

操作手順

1. **5,000 x g (7,500 rpm) で 10 分間の遠心分離によりマイクロ遠心チューブに細胞（最高 2×10^9 細胞）を回収する。上清を棄てる。**
2. **180 μ l の酵素溶解バッファーでバクテリア・ペレットを再懸濁する。**
3. **37℃ で少なくとも 30 分間インキュベートする。**
インキュベーション後、ステップ 5 で同じヒーターブロックあるいはウォーターバスを使用する際は、これらを 56℃ に加熱しておきます。
4. **25 μ l の Proteinase K および 200 μ l の Buffer AL（エタノール無添加）を加える。ボルテックス操作により攪拌する。**

注：Proteinase K を直接 Buffer AL に加えないでください。

使用前に Buffer AL にエタノールを添加していないことを確認してください（英語版 Handbook 18 ページの “Buffer AL” を参照）。Buffer AL の別途購入も可能です（英語版 Handbook 56 ページ、ordering information を参照）。

5. 56℃で 30 分間インキュベートする。

オプション：必要に応じて、病原体を不活性化するために、必要なら 95℃で 15 分間インキュベートします。95℃でのインキュベーションは DNA の分解を引き起こすことがあります。

6. 200 μ l のエタノール (96 ~ 100%) をサンプルに添加し、ボルテックス操作で十分に混和する。

サンプルとエタノールを迅速かつ十分に混和し、ボルテックス操作あるいはピペティングで完全に均一な溶液にすることが重要です。

エタノールの添加により白色の沈殿物が生じることがあります。沈殿物をすべて DNeasy Mini Spin Column にアプライすることが重要です。この沈殿物は DNeasy 調製に影響しません。

7. 6 ページのプロトコール “動物組織からのトータル DNA 精製 (スピンカラム・プロトコール)” のステップ 4 に進む。

トラブルシューティング

コメント

収量が少ない

- a) スタートサンプルの保存
DNA 収量はスタートサンプルの種類、サイズ、保存期間、保存法などにより変動する。サンプルの保存が適切でない場合に、サンプルからの収量が低くなる（英語版 Handbook 17 ページの “Sample collection and storage” 参照）。
- b) スタートサンプル量が多すぎる
次回の調製ではスタートサンプルの量を減らす（英語版 Handbook 16 ページの “Quantification of starting material” を参照）。
- c) 結合する前にサンプル、Buffer AL、エタノールの混和が十分でない
DNeasy スピнкаラム・プロトコール：次回の調製では、まずサンプルを Buffer AL と混和してからエタノールを添加し、それぞれ 15 秒間パルスボルテックスにより混和してからサンプルを DNeasy Mini Spin Column にアプライする。
DNeasy 96 プロトコール：次回の調製では、サンプルを DNeasy 96 Plate にアプライする前に、プロトコールに記載されているようにサンプルを激しく攪拌する。
- d) DNA 溶出が効率的でない
溶出量を 200 μ l まで増やし、溶出ステップをもう一度行なう。英語版 Handbook 21 ページの “Elution of pure nucleic acids” を参照。サンプルを DNeasy Mini Spin Column にアプライする前にエタノールを添加したことを確認する。Buffer ATL および／あるいは Buffer AL 中の沈殿を使用前に溶解したことを確認する。
- e) Buffer AW1 あるいは Buffer AW2 の調製が不正確
使用前にエタノールを Buffer AW1 および Buffer AW2 に添加したことを確認する（3、6、10、14 ページの “実験を始める前の準備事項” を参照）。
- f) Buffer AE の代わりに蒸留水を溶出に用いた
純水製造装置で製造された脱イオン水には pH の低いものがあり、DNA 収量が低下することがある。水で溶出する場合は、水の pH が 7.0 以下でないことを確認する。

コメント

- g) **動物組織**：溶解が不十分
- 次回の調製ではスタートサンプルの量を減らす（英語版 Handbook 17 ページの “Quantification of starting material” を参照）。
- 溶解をより効率的に行なうために組織を必ず細かくカットする。溶解後サンプルを激しくボルテックス操作する。これにより、DNA が損傷したり、長さが短くなることはない。
- インキュベーションとボルテックス操作の後にゼラチン状のペレットが残っている場合には、56℃の Proteinase K 分解のためのインキュベーション時間を延長するか Proteinase K の量を 40 µl まで増やす (DNeasy 96 プロトコールでは、Buffer AL、エタノールを添加する前にサンプルが完全に溶解していることを確認する。一晩インキュベーションの後でもゼラチン状の塊が観察された場合は溶解時間を延長する)。
- Proteinase K の入ったバッファーにサンプルが完全に浸っていることを確認する。必要ならば Buffer ATL と Proteinase K の量を 2 倍にして、2 ml のマイクロ遠心チューブで溶解する。次のステップで Buffer AL とエタノールの量を適宜調節したか確認する（例えば 360 µl の Buffer ATL と 40 µl の Proteinase K で溶解ステップを行なった場合には、400 µl Buffer AL と 400 µl エタノールを用いて DNA を DNeasy メンブレンに結合させる）。
- DNeasy スピнкаラム・プロトコール**：サンプルを 2 回に分けて DNeasy Mini Spin Column にピペットでアプライする。この 2 回のステップ間に生じるろ液を棄てる。
- DNeasy 96 プロトコール**：各サンプルの最高 900 µl まで DNeasy 96 Plate にアプライする。
- h) **バクテリア**：溶解が不十分
- 細胞壁溶解酵素を用いたインキュベーション時間を延長する、あるいは溶解酵素の量を増やして次回調製する。
- 対数増殖早期にあるバクテリアを採取する（英語版 Handbook 15 ページの “Sample collection and storage”）。

コメント

- i) **DNeasy スピнкаラム**・**プロトコール**：DNA が DNeasy Mini Spin Column に結合しない サンプルを DNeasy Mini Spin Column にアプライする前にエタノールを添加したことを確認する。
- j) **DNeasy 96 プロトコール**：DNA 溶出が不完全 70℃に加熱した Buffer AE でもう一度溶出する。70℃に加熱した Buffer AE を添加後、DNeasy 96 Plate を室温（15～25℃）で1分間インキュベートする。溶解効率を高めるために、インキュベーション時間を70℃で5分間にする。
- k) **DNeasy 96 プロトコール**：マルチチャンネル・ピペッターで分注した Buffer AE あるいは水の量が均等でない 全チップがピペットに固く装着していることを確認する。分注する前に、チップの液量をチェックする。

DNeasy Mini Spin Column あるいは DNeasy 96 Plate が目詰まり

スタートサンプル量が多すぎる、あるいは溶解が不完全 遠心ステップの g 値と遠心時間を増加する。次回の調製ではスタートサンプルの量を減らす（英語版 Handbook 17 ページの “Quantification of starting material” を参照）。げっ歯類の尾あるいはバクテリアでは前述項目 “収量が少ない” の “溶解が不十分” を参照する。

溶出液中の DNA 収量が低い

2 回目の溶出ステップにより DNA が希釈 最初の溶出液の希釈を避けるために 2 回目の溶出に新しいマイクロチューブを使用する。溶出量を 50～100 μ l に減らす。英語版 Handbook 21 ページ、 “Elution of pure nucleic acids” 参照。

精製した DNA の A_{260}/A_{280} 比率が低い

- a) バッファの代わりに蒸留水を用いて A_{260}/A_{280} を測定した 純度の測定には水ではなく 10 mM Tris-Cl, pH 7.5 を用いてサンプルを希釈する。英語版 Handbook 52 ページの Appendix A を参照。
- b) 細胞溶解が不完全 26 ページの “収量が少ない” を参照。

精製した DNA の A_{260}/A_{280} 比率が高い

残存している RNA 量が高い プロトコール中で最適な RNase 処理を行なう。

コメント

DNA を用いたダウンストリーム実験で良い結果がでない

- a) 塩類がキャリアーオーバー Buffer AW2 を室温（15 ～ 25℃）で使用したことを確認する。
Buffer AW1 および AW2 がプロトコール中で正しい順序で使用されていることを確認する。
- b) エタノールのキャリアーオーバー **DNeasy スピнкаラム・プロトコール**：Buffer AW2 で洗浄する際、カラムを 20,000 x g（14,000 rpm）で 3 分間遠心して DNeasy メンブレンを乾燥させる。遠心分離後、ろ液と接触しないように気をつけて DNeasy Mini Spin Column を取り上げる。DNeasy Mini Spin Column でエタノールが観察される場合（液滴あるいは液層として）には、ろ液を棄て、コレクションチューブに入れて DNeasy Mini Spin Column を 20,000 x g で 1 分間遠心分離する。
DNeasy 96 プロトコール：Buffer AW2 を完全に除去するために、2 回目の洗浄後、DNeasy 96 Plate の蓋を取り、オープンあるいはインキュベーターを用いて 80℃、10 分間インキュベートする。
- c) 使用した DNA が多すぎる PCR アプリケーションではシングルコピー遺伝子は 100 ng のテンプレート DNA を用いて通常 35 PCR サイクルで検出される。

DNA が切断

- a) サンプルを繰り返して凍結・融解した スタートサンプルを繰り返して凍結・解凍することを避ける。
- b) サンプルが古い サンプルが古いと分解 DNA のみが得られることがある。

Buffer ATL あるいは Buffer AL 中に白色沈澱物

- 長期保存後、低温で白色沈澱物が形成 Buffer ATL あるいは Buffer AL を添加したときに生じる沈澱物は、沈澱物が完全に溶解するまで各バッファーを 56℃でインキュベートする。

コメント

Buffer AW2 で洗浄後メンブレンが変色あるいは溶出液が着色

- a) **げっ歯類の尾：**
調製中にげっ歯類の尾から毛を取り除いていない
- DNeasy スピニングカラム・プロトコール：** 次回の調製では、Proteinase K 分解した後に 20,000 x g で 5 分間ライセートを遠心する。ステップ 3 に進む前に、新しいチューブに上清を入れる。
- DNeasy 96 プロトコール：** 次回の調製では、ライセートの入ったコレクション・マイクロチューブのラックを 6,000 rpm で 5 分間遠心する（ステップ 5）。キャップを取り除き、ペレット化した細胞破片が剥がれないようにしてライセートを他のコレクション・マイクロチューブのラックに移す。プロトコールのステップ 6 に進む。
- b) **動物血液：**
ヘモグロビンがコンタミ
- 使用した血液の量を減らす、あるいは調製あたりに使用する Proteinase K の量を 2 倍にする。全血の代わりにバフィコートを使用してみる。

Trademarks: QIAGEN®, DNeasy®, TissueRuptor™ (QIAGEN Group).

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。

© 2006 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

