

QIAGEN Supplementary Protocol

EZ1 Advanced あるいは EZ1 Advanced XL を用いた骨あるいは歯からの DNA 精製

本文書は、EZ1 Advanced 装置と EZ1 Advanced DNA Investigator Large-Scale Bone Card/EZ1 Advanced XL DNA Investigator Large-Scale Bone Card との組み合わせで、EZ1 DNA Investigator Kit を用いた粉末化した大量の骨／歯からミトコンドリアおよびトータル DNA の自動精製について記述しています。1 ランあたり最高 6 (EZ1 Advanced) あるいは最高 14 (EZ1 Advanced XL) の骨／歯のライセートサンプルを 1 ml、1.5 ml、1.8 ml のサンプル容量で調製します。

重要：キット成分の取り扱いおよび保存に関する一般的な情報は EZ1 DNA Investigator Kit Handbook を参照ください。装置のセットアップに関する詳細情報は、EZ1 Advanced あるいは Advanced XL User Manual を参照してください。

装置および試薬

化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。詳細は製品メーカーの相当する SDS (safety data sheet) をご覧ください。

用意するもの

- EZ1 DNA Investigator Kit (cat. no. 952034)
- ウォーターバスあるいはヒートブロック
- 5 ml あるいは 15 ml 遠心チューブ
- 遠心機 (5 ml あるいは 15 ml チューブ用)
- ボルテックス
- マイクロ遠心機
- ピペットおよびピペットチップ
- QIAGEN Proteinase K (cat. no. 19131 または 19133)
- Buffer MTL (cat. no. 19112)
- 0.5 M EDTA、pH 8.3
- 液体窒素
- 2 ml Sarstedt 社製チューブ (cat. no. 72.693.005)
- TissueLyser II (cat. no. 85300) と Grinding Jar Set, S. Steel (cat. no. 69985)、あるいは同等のビーズミル



EZ1 Advanced ユーザーが用意するもの

- EZ1 Advanced 装置
- EZ1 Advanced DNA Investigator Large-Scale Bone Card (cat. no. 9022499)

EZ1 Advanced XL ユーザーが用意するもの

- EZ1 Advanced XL 装置
- EZ1 Advanced XL DNA Investigator Large-Scale Bone Card (cat. no. 9022497)

前処理用プロトコール

このプロトコールは骨や歯の EDTA による脱灰処理および Proteinase K を用いた溶解について記載しています。

実験を始める前の重要事項

- 必ず適切なサンプルチューブを使用してください: 2 ml Sarstedt チューブ (cat. no. 72.693.005)。このチューブはヒートブロックを含めてどのステップでも使用できます。EZ1 DNA Investigator Kit に梱包されているサンプルチューブはヒートブロックで使用できませんのでご注意ください。
- 骨／歯を粉砕する前に TissueLyser Handbook を参照し、TissueLyser II の操作を確認してください。
- まず前処理用プロトコールを実施してから、DNA 精製プロトコールに進んでください。
- 操作手順のステップにおいて、次の 3 種類から選択してください。400 mg の生体サンプルを調製する場合は ■；600 mg の生体サンプルを調製する場合は ▲；750 mg の生体サンプルを調製する場合は ●。これらのサンプル量以上は使用しないでください。

実験開始前の準備事項

- ステップ 2 の脱灰処理のために、5 ml あるいは 15 ml の遠心チューブをウォーターバスあるいはヒートブロックを 37℃ に加熱してください。
- 以下の方法で骨／歯から細かい粉末を調製します。骨や歯の表面を綺麗に取り除きます。TissueLyser II システムあるいは同様のビーズミルを用いて骨あるいは歯根を粉砕し細かい粉末にします。

- Tissuelyser IIを使用する際には、骨あるいは歯のサンプルとボールを粉砕ジャーに入れます。粉砕ジャーの中のボールと骨あるいは歯の断片の上に液体窒素*を注ぎます。温度が平衡化するまで待ちます（液体窒素の沸騰が停止する）。デカンテーションにより過剰な液体窒素を棄て、粉砕ジャーの蓋を閉め、粉砕ジャーをTissuelyser IIにセットします。骨あるいは歯を30 Hzで1分間、あるいは粉末になるまで粉砕します（粉砕時間はサンプルのタイプ、状態、大きさにより異なる）。

操作手順

1. ■ 400 mg、▲ 600 mg、● 750 mgの粉末にした骨／歯を5 mlあるいは15 mlの遠心チューブに入れる。
これらのサンプル量以上は使用しないでください。
2. ■ 1.2 ml、▲ 1.7 ml、● 2 mlの0.5 M EDTA (pH 8.3)を添加し、サンプルを37℃で24～48時間インキュベートする。
インキュベーションの後、次のインキュベーションステップのために56℃に設定します。
3. 1 µlのcarrier RNA solution (1 µg/µl)を添加する。
4. ■ 40 µl、▲ 60 µl、● 75 µlのQIAGEN Proteinase Kを添加し56℃で3時間インキュベートする。
5. 6,000 x gで4分間遠心操作する。■ 1 mlあるいは▲● 1.5 mlの上清を■ 2本あるいは▲● 3本の2 mlサンプルチューブにそれぞれ500 µlずつ入れる。
6. 400 µlのBuffer MTLをサンプルチューブ1に添加し、■ 1120 µlのBuffer MTLをサンプルチューブ2あるいは▲● 1120 µlのBuffer MTLをサンプルチューブ2および3に入れる。簡単にボルテックスし、溶液をチューブ底に回収するためマイクロ遠心機でスピンドウンする。
7. 次ページの“DNA 精製プロトコール”を続けて行なう。

* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。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。

DNA 精製プロトコール

本プロトコールは、2 ページの“前処理用プロトコール”の記載に従って処理済みの骨／歯からミトコンドリアおよびトータル DNA を精製するための操作手順です。この DNA 精製プロトコールでは、EZ1 Advanced 装置のセットアップおよびスタートのための簡単な操作法について記載しています。

実験を始める前の重要事項

- 本プロトコールの全ステップは室温（15 ～ 25℃）で実施し、セットアップ操作は迅速に行なってください。
- 試薬カートリッジおよび Buffer MTL はグアニジン塩を含んでいるので漂白剤を含む消毒薬とは一緒に使用しないでください。
- DNA 操作を開始する前に必ず“前処理用プロトコール”を実施してください。

実験開始前の準備事項

- 試薬カートリッジを 2 ～ 8℃で保存していた場合には、使用前に必ず操作する温度に戻してください。少なくとも使用 2 時間前に、試薬カートリッジをシェーカー付きのインキュベーターにセットし、30 ～ 40℃で軽く攪拌しながらインキュベートしてください。ウェルの底に沈殿物が見られる場合には、30 ～ 40℃で軽く攪拌しながら、さらに 2 時間インキュベートしてください。沈殿物が溶解されない場合はその試薬カートリッジは使用しないでください。
- 試薬カートリッジ中の溶解バッファーが保存中に沈殿物を形成することがあります。必要な場合には、37℃で軽く攪拌しながら加温して再溶解した後、室温（15 ～ 25℃）で使用します。

操作手順

1. EZ1 Advanced DNA Investigator Large-Scale Bone Card を EZ1 Advanced の EZ1 Advanced Card 用スロット、あるいは EZ1 Advanced XL DNA Investigator Large-Scale Bone Card を EZ1 Advanced XL の EZ1 Advanced XL Card 用スロットに完全に差し込む。
2. EZ1 Advanced 装置のスイッチを入れる。
3. “START” ボタンを押し、工程を開始する。モニターの解説に従ってデータをトラッキングする。
4. “1”（1.0 ml プロトコール用）、“2”（1.5 ml プロトコール用）、あるいは“3”（1.8 ml プロトコール用）を押し。

5. 溶出バッファーおよび容量を選択する:水に溶出する場合には“1”を、TE バッファー*に溶出する場合には“2”を押す。その後、“1”、“2”、“3”あるいは“4”を押して溶出量を選択する。
6. ディスプレイ上に表示されたテキストにより操作する場合には、いずれかのキーを押し、ワークテーブルのセットアップをスタートする。
7. 装置のドアを開ける。
8. 試薬カートリッジを2回転倒し、磁性粒子を混和する。カートリッジを軽く叩いてウェルの底に試薬を回収する。磁性粒子が完全に再懸濁されたことをチェックする。
9. カートリッジラックに試薬カートリッジをセットする。
注: 試薬カートリッジをカートリッジラックに差し込んだ後、カチツという音がするまでカートリッジを確実に押し込んでください。
注: 1.8 ml プロトコール使用時は 300 μ l のサンプルと 680 μ l の Buffer MTL がウェル 10 に添加されたことを確認してください。
10. チップラックの最初の列に蓋を開けたままの溶出チューブをセットする。
11. チップラックの2列目にフィルターチップの入ったチップホルダーをセットする。
12. 分解済みのサンプルを含むサンプルチューブを蓋を開けたままでセットする。1.0 ml プロトコールではステップ 12a に進む; 1.5 ml および 1.8 ml プロトコールではステップ 12b に進む。
- 12a. 1.0 ml プロトコール: 500 μ l のサンプルと 1120 μ l の Buffer MTL を含む 2 ml サンプルチューブを3列目に、そして 500 μ l のサンプルと 400 μ l の Buffer MTL を含む 2 ml サンプルチューブを4列目にセットする。ヒートブロックに空の 2 ml チューブをセットする。ステップ 13 に進む。
注: ヒートブロックに空の 2 ml チューブをセットすることにより、プロセスの安全性を確保します。間違ったプロトコールを選択した場合、サンプルがヒートブロック中の空のホールではなく、2 ml チューブにトランスファーされます。
- 12b. 1.5 ml および 1.8 ml プロトコール: 500 μ l のサンプルと 1120 μ l の Buffer MTL を含む 2 ml サンプルチューブを3列目に、そして 500 μ l のサンプルと 400 μ l の Buffer MTL を含む 2 ml サンプルチューブを4列目にセットする。500 μ l サンプルと 1120 μ l の Buffer MTL を含む 2 ml サンプルチューブをヒートブロックにセットする。ステップ 13 に進む。
13. 装置のドアを閉める。

* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。詳細は製品メーカーの相当する SDS (safety data sheet) をご覧ください。

14. **“START” ボタン**を押し、**精製工程を開始する。**
自動精製工程は 25 分（1.0 ml プロトコール）、32 分（1.5 ml プロトコール）、38 分（1.8 ml プロトコール）かかります。
15. プロトコールが終了するとディスプレイ上に**“Protocol finished”** と表示される。**“ENT”** を押して、**Report file** を作成する。
EZ1 Advanced および EZ1 Advanced XL は 10 個までの Report file を保存可能です。Report file を直接印刷することも、コンピューターに転送することも可能です。
16. 装置のドアを開ける。
17. 精製 DNA を含む溶出チューブを回収する。この DNA 溶液はすぐに使用することも、2 ~ 8℃で 24 時間、あるいは -20℃で長期間保存することも可能。サンプル調製廃液を棄てる*。
精製した DNA をリアルタイム PCR で解析する場合には、磁性粒子のコンタミリスクを最小限に抑えるため、溶出液の入ったチューブを適切なマグネットを用いて磁性粒子を分離し、溶出液を新しいチューブに移します。
18. オプション：モニターの解説に従って、UV によりワークテーブル表面のコンタミを除去する。
19. 他のプロトコールを実施するためには、“ESC” を押し、“Pretreatment protocol” に記載されているようにサンプルを前処理して、ステップ 4 からの操作手順に従う。その他の場合には、“STOP” を 2 回押してディスプレイの最初の画面に戻り、装置のドアを閉めて、EZ1 Advanced 装置のスイッチを切る。
20. EZ1 装置を清掃する。
装置のメンテナンスに関しては EZ1 Advanced 装置の User Manual に従ってください。

* サンプルはグアニジン塩を含んでいるので漂白剤を含む消毒薬とは一緒に使用しないでください。

Trademarks: QIAGEN® (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。

© 2012 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

