

# AllPrep<sup>®</sup> DNA/RNA FFPE プロトコールとトラブルシューティング

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織切片からの  
ゲノム DNA およびトータル RNA (small RNA を含む) の  
同時精製

目次	ページ
プロトコール	
FFPE 組織切片からのゲノム DNA および トータル RNA (small RNA を含む) の精製	2
トラブルシューティング	10



# プロトコール: FFPE 組織切片からのゲノム DNA および トータル RNA (small RNA を含む) の精製

## 実験を始める前の重要事項

- AllPrep DNA/RNA FFPE Kit を初めて使う際には、“Important Notes” (英語版 Handbook 13 ページ) をお読みください。
- RNA を初めて調製する場合には Appendix A (英語版 Handbook 32 ページ) をお読みください。
- Buffer RL1、Buffer FRN、Buffer AL、Buffer AW1 はグアニジン塩を含んでいるため、漂白剤を含む消毒薬と一緒に使用しないでください。Safety information は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。
- 特別な表記がない限り、この実験のすべてのステップは室温 (15 ~ 25℃) で行なってください。操作は迅速に行なってください。
- すべての遠心操作はマイクロ遠心機を用いて 15 ~ 25℃で行ないます。冷却機能付きマイクロ遠心機を使用する場合は、15℃以下に冷却されないように温度を 20 ~ 25℃に設定します。
- 下の操作で▲は **small RNA を含まない** トータル RNA の精製を行なうためのステップを、●は **small RNA を含む** トータル RNA の精製を行なうためのステップを示しています。

## 実験開始前の準備事項

- Buffer FRN、Buffer RPE、Buffer AW1、Buffer AW2 と RNase-Free DNase I を初めて使用する場合には、英語版 Handbook 15 ページ “Preparation of buffers” に記載されているようにこれらを調製してください。
- 必要に応じて Buffer RL1、Buffer ATL、Buffer AL を静かに攪拌しながら加熱し、形成している沈殿物を溶かします。
- すべてのバッファーを室温 (15 ~ 25℃) に戻します。調製した Buffer FRN、Buffer RPE、Buffer AW1、Buffer AW2 を振盪して混和します。
- ステップ 6 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。56℃ (ステップ 6 と 26) および 80℃ (ステップ 10) のインキュベーションは攪拌してもしなくても問題ありません。90℃ (ステップ 27) でのインキュベーションは攪拌なしで行ないます。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ウォーターバスを使用できます。

## 操作手順

1. メスを使用してサンプルブロックの余分なパラフィンを取り除く。
2. 切片を 10 ~ 20  $\mu\text{m}$  の厚さにカットする。

表面積 150  $\text{mm}^2$  の 10  $\mu\text{m}$  切片は 4 枚以下、表面積 150  $\text{mm}^2$  の 20  $\mu\text{m}$  切片は 2 枚以下をご使用ください。

サンプル表面が空気に触れていた場合には、最初の 2 ~ 3 切片は捨てます。
3. 切片を 1.5 ml のセーフロックのマイクロ遠心チューブ（別途準備）に即座に入れ、蓋を閉める。
4. ステップ 4a、4b あるいは 4c に従ってパラフィンを除去する。
- 4a. **Deparaffinization Solution**（別途準備；cat. no. 19093）を用いた脱パラフィン：
  - **Deparaffinization Solution** の添加：10  $\mu\text{m}$  の切片 2 枚あるいは 20  $\mu\text{m}$  の切片 1 枚に 320  $\mu\text{l}$  の **Deparaffinization Solution** を添加；サンプル量がこれより多い場合は 640  $\mu\text{l}$  の **Deparaffinization Solution** を添加する。
  - 10 秒間激しくボルテックスした後、スピンドウンしてサンプルをチューブの底に回収する。
  - 56°C で 3 分間インキュベートした後、室温（15 ~ 25°C）に戻し、最高速度で 2 分間遠心する。
  - ペレットが剥がれないように上清をピペットで慎重に取り除く。細かいピペットチップを用いて残留している **Deparaffinization Solution** を慎重に取り除く。
  - ペレットを乾燥するために、蓋を開いて 37°C で 10 分間インキュベートする。ステップ 5 に進む。
- 4b. ヘプタンを用いた脱パラフィン（ステップ 8 で得られるペレットは固い可能性あり）：
  - 500  $\mu\text{l}$  のヘプタンを添加し、10 秒間激しくボルテックスして、室温（15 ~ 25°C）で 10 分間インキュベートする。
  - 25  $\mu\text{l}$  のメタノールを添加し、10 秒間激しくボルテックスして、9,000 x g で 2 分間遠心する。
  - ペレットが剥がれないように上清をピペットで慎重に取り除く。細かいピペットチップを用いて残留しているヘプタン/メタノールを慎重に取り除く。
  - ペレットに 1 ml のエタノール（96 ~ 100%）を添加し、ボルテックスで混和後、最高速度で 2 分間遠心する。
  - ペレットが剥がれないように上清をピペットで慎重に取り除く。細かいピペットチップを用いて、残留しているエタノールを慎重に取り除く。
  - 蓋を開け、室温（15 ~ 25°C）あるいは最高 37°C で 10 分間あるいは残存エタノールが蒸発するまでインキュベートする。ステップ 5 に進む。

#### 4c. キシレンを用いた脱パラフィン：

- 1 ml のキシレンを添加し、10 秒間激しくボルテックスした後、最高速度で 2 分間遠心する。
  - ペレットが剥がれないように上清をピペットで慎重に取り除く。
  - ペレットに 1 ml のエタノール (96 ~ 100%) を添加し、ボルテックスで混和後、最高速度で 2 分間遠心する。  
エタノールは、サンプルに残留しているキシレンを抽出します。
  - ペレットが剥がれないように上清をピペットで慎重に取り除く。細かいピペットチップを用いて、残留しているエタノールを慎重に取り除く。
  - 蓋を開け、室温 (15 ~ 25°C) あるいは最高 37°C で 10 分間あるいは残存エタノールが蒸発するまでインキュベートする。ステップ 5 に進む。
5. ペレットに 150  $\mu$ l の Buffer PKD を加え、チューブを指で軽く叩いてペレットをルーズにして再懸濁する。10  $\mu$ l の proteinase K 溶液を添加し、ボルテックスにより混和する。
6. 56°C で 15 分間インキュベートする。  
サンプルのタイプによっては完全に溶解されないことがあります。操作には影響しません。ステップ 7 に進みます。
7. 氷上で 3 分間インキュベートする。  
ステップ 8 での沈殿を効率的に行なうためには完全に冷却することが重要です。
8. 20,000 x g で 15 分間遠心操作する。
9. RNA 精製ステップ 10 ~ 24 で使用する▲ 1.5 ml あるいは● 2 ml のセーフロックチューブにペレットを剥がさないように慎重に上清をアプライする。ステップ 25 ~ 35 の DNA 精製のためにペレットを保存する。

注：FFPE サンプルの量と特性により異なりますが、ペレットが非常に小さかったり、見つけにくいことがあります。ペレットが上清とともに吸引された場合は、ペレットをチューブの底にゆっくりと戻します。ピペットチップを使ってペレットをチューブに再度付着させる、あるいは再び遠心し、残りの上清を慎重に吸引します。

DNA を含むペレットは室温 (15 ~ 25°C) で 2 時間、2 ~ 8°C で 1 日間、-20°C では長期保存可能です。

## トータル RNA 精製

### 10. ステップ 9 からの上清を 80°C で 15 分間インキュベートする。

このインキュベーションにより、核酸のホルムアルデヒドによるクロスリンクが部分的に外れます。より長時間あるいは高温度のインキュベーションにより、断片化した RNA が増えることがあります。

ヒートブロックを一台しか使用しない場合には、ヒートブロックが 80°C になるまで、サンプルを室温に置きます。最大の RNA 収量を得るためには、上清を 80°C で正確に 15 分間インキュベートしてください。

### 11. チューブをスピンドウンして蓋の内側に付着した溶液を回収する。

### 12. 結合条件に合わせるために 320 µl の Buffer RLT を添加し、ボルテックスあるいはピペッティングにより混和する。

### 13. ▲ 720 µl あるいは● 1,120 µl のエタノール (96 ~ 100%) を添加して、ボルテックスあるいはピペッティングにより混和する。すぐにステップ 14 に進む。エタノールの添加後、沈殿物が観察されることがあります。これは操作には影響しません。

### 14. 700 µl のサンプル (形成した沈殿物を含む) を、2 ml コレクションチューブ (キットに同梱) にセットされた RNeasy® MinElute® Spin Column にアプライする。蓋を静かに閉めて、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる\*。

コレクションチューブはステップ 15 で再使用します。

### 15. 残りのサンプルも RNeasy MinElute Spin Column に通すようステップ 14 を繰り返す。

コレクションチューブはステップ 16 で再使用します。

### 16. 350 µl の Buffer FRN を RNeasy MinElute Spin Column に添加する。蓋を静かに閉めて、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心操作する。フロースルー液を棄てる†。

注：Buffer FRN は濃縮液でお届けします。使用前に、英語版 Handbook 16 ページの “Preparing Buffer FRN” に記載されている方法でイソプロパノールを添加したことをご確認ください。

コレクションチューブはステップ 17 で再使用します。

\* フロースルー液は Buffer RLT 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 6 ページをご覧ください。

† フロースルー液は Buffer FRN 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 6 ページをご覧ください。

17. 10  $\mu$ l の DNase I ストック溶液を 70  $\mu$ l の Buffer RDD に添加する。チューブを転倒させて静かに混和する。チューブの壁に残っている溶液を集めるために、スピンドウンする。

注：凍結乾燥状態でお届けする DNase I は、英語版 Handbook 16 ページの “Preparing DNase I stock solution” に記述されている方法で調製します。

注：DNase I は物理的変性に特に敏感です。チューブを上下に静かに転倒させて混和します。ボルテックスは使用しないでください。

18. 80  $\mu$ l の DNase I インキュベーション反応液を RNeasy MinElute Spin Column メンブレンに直接アプライし、実験台上で (20 ~ 30°C) 15 分間インキュベートする。

注：DNase I インキュベーション反応液は直接メンブレンにアプライしてください。溶液の一部がスピнкаラムの壁や O リングに付着していると、DNase 分解は不完全になります。

19. 500  $\mu$ l の Buffer FRN を RNeasy MinElute Spin Column に添加する。蓋を静かに閉めて、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。ステップ 20 で使用するためにフロースルー液を保存する。

注：このフロースルー液は small RNA を含む RNA を含んでいるので廃棄しないでください。

20. RNeasy MinElute Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (キットに同梱) にセットする。ステップ 19 のフロースルー液をスピнкаラムにアプライする。蓋を静かに閉めて、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる\*。

コレクションチューブはステップ 21 で再使用します。

21. 500  $\mu$ l の Buffer RPE を RNeasy MinElute Spin Column に添加する。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレンを洗浄するため、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる。

コレクションチューブはステップ 22 で再使用します。

注：Buffer RPE は濃縮液でお届けします。使用前に、英語版 Handbook 16 ページの “Preparing Buffer RPE” に記載されている方法でエタノールを添加したことをご確認ください。

22. 500  $\mu$ l の Buffer RPE を RNeasy MinElute Spin Column に添加する。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレンを洗浄するために 8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液の入ったコレクションチューブを廃棄する。

\* フロースルー液は Buffer FRN 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 6 ページをご覧ください。

- 23. RNeasy MinElute Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (キットに同梱) にセットする。蓋を開けて最大速度で 5 分間遠心する。フロースルー液の入ったコレクションチューブを捨てる。**

蓋の破損を防ぐために、遠心操作の際にはカラムを少なくとも一つおきにセットしてください。遠心ローターの回転方向と反対の方向に蓋を向けてセットします (例えば、ローターが時計方向に回転する場合には、時計方向と反対方向に蓋を向けます)。

残留しているエタノールが続いて行なう反応を阻害することがあるため、スピンカラム・メンブレンを乾燥させることは非常に重要です。蓋を開いて遠心することで、RNA 溶出の際にエタノールがキャリアオーバーしません。

- 24. RNeasy MinElute Spin Column を新しい 1.5 ml コレクションチューブ (キットに同梱) にセットする。14 ~ 30  $\mu$ l の RNase フリー水をスピンカラム・メンブレンに直接添加する。蓋を静かに閉めて室温 (15 ~ 25°C) で 1 分間インキュベートする。最高速度で 1 分間遠心して RNA を溶出する。**

少量の RNase フリー水で溶出すると、トータル RNA の濃度は高くなりますが、収量は低下します。

RNeasy MinElute Spin Column のテッドボリュームは 2  $\mu$ l なので、14  $\mu$ l の RNase フリー水で溶出すると、最終的な溶出容量は 12  $\mu$ l になります。

## ゲノム DNA 精製

- 25. ステップ 9 からのペレットを 180  $\mu$ l の Buffer ATL で再懸濁し、40  $\mu$ l の proteinase K を添加して、ボルテックスで混和する。**

再懸濁前にペレットを室温 (15 ~ 25°C) に戻します。

- 26. 56°C で 1 時間インキュベートする。**

- 27. 90°C で 2 時間攪拌しないでインキュベートする。**

このインキュベーションにより、核酸のホルムアルデヒドによるクロスリンクが部分的に外れます。より長時間あるいは高温度のインキュベーションにより、断片化した DNA が増えることがあります。

ヒートブロックを一台しか使用しない場合には、ヒートブロックが 90°C になるまで、サンプルを室温に置きます。

注：このインキュベーション・ステップで攪拌すると DNA 収量の低下を引き起こします。

- 28. マイクロ遠心チューブをスピンドウンして蓋の内側に付着したサンプルを集める。**

オプション：汎用されている DNA 調製法と比較すると、AllPrep DNA/RNA FFPE 調製法では RNA が効率的に分離されるため、精製した DNA には微量の RNA しか含まれて居ません。RNA フリーのゲノム DNA が必要な場合は、サンプルを室温 (15 ~ 25°C) に戻してから 4  $\mu$ l の RNase A (100 mg/ml) を添加します。室温で 2 分間インキュベートしてからステップ 29 に進みます。

29. 200  $\mu$ l の Buffer AL を添加し、ボルテックスで完全に混和する。200  $\mu$ l のエタノール (96 ~ 100%) を添加し、ボルテックスあるいはピペッティングにより再び完全に混和する。

サンプル、Buffer AL、エタノールをボルテックスあるいはピペッティングで迅速かつ十分に混和し、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混和し、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。

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 AllPrep 調製法に影響しません。

30. 2 ml のコレクションチューブ (キットに同梱) にセットされた QIAamp® MinElute Spin Column に全サンプルを入れる。蓋を静かに閉めて、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 1 分間遠心する。フロースルー液の入ったコレクションチューブを廃棄する\*。

遠心操作の後、ライセートが完璧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。

31. QIAamp MinElute Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (キットに同梱) にセットする。700  $\mu$ l の Buffer AW1 をスピncラムに添加する。蓋を静かに閉め、スピncラム・メンブレンを洗浄するため、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる\*。

コレクションチューブはステップ 32 で再使用します。

注：Buffer AW1 は濃縮液でお届けします。使用前に、英語版 Handbook 17 ページの “Preparing Buffer AW1” に記載されている方法でエタノールを添加したことをご確認ください。

32. 700  $\mu$ l の Buffer AW2 を QIAamp MinElute Spin Column に添加する。蓋を静かに閉め、スピncラム・メンブレンを洗浄するため、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる。

コレクションチューブはステップ 33 で再使用します。

注：Buffer AW2 は濃縮液でお届けします。使用前に、英語版 Handbook 17 ページの “Preparing Buffer AW2” に記載されている方法でエタノールを添加したことをご確認ください。

33. 700  $\mu$ l のエタノール (96 ~ 100%) を QIAamp MinElute Spin Column に添加する。蓋を静かに閉めて、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心操作する。フロースルー液の入ったコレクションチューブを廃棄する。

\* 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 6 ページをご覧ください。



- 34. QIAamp MinElute Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (キットに同梱) にセットする。スピncラムの蓋を開き、最大速度で 5 分間遠心する。フロースルー液の入ったコレクションチューブを捨てる。**

蓋の破損を防ぐために、遠心操作の際にはカラムを少なくとも一つおきにセットしてください。遠心ローターの回転方向と反対の方向に蓋を向けてセットします (例えば、ローターが時計方向に回転する場合には、時計方向と反対方向に蓋を向けます)。

残留しているエタノールが続いて行なう反応を阻害することがあるため、スピncラム・メンブレンを乾燥させることは非常に重要です。蓋を開いて遠心することで、DNA 溶出の際にエタノールがキャリアオーバーしません。

- 35. QIAamp MinElute Spin Column を新しい 1.5 ml コレクションチューブ (キットに同梱) にセットする。30 ~ 100  $\mu$ l の Buffer ATE をスピncラム・メンブレンに直接添加する。蓋を静かに閉め、室温 (15 ~ 25°C) で 1 分間インキュベートする。最高速度で 1 分間遠心して DNA を溶出する。**

**重要：** Buffer ATE を室温に戻したことを確認してください。少量 (<50  $\mu$ 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 ATE をメンブレンの中央にピペットでアプライします。

QIAamp MinElute Spin Column では溶出量を調節できるので、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 Buffer ATE 量よりも最大で 5  $\mu$ l 少なくなります。

Buffer ATE をアプライした QIAamp MinElute Spin 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、一般的に DNA 収量は増加します。

# トラブルシューティング

## コメント

### 遠心操作後に沈殿した DNA ペレットがルーズ

- |                     |   |
|---------------------|---|
| a) 上清を取り除く操作が激しすぎる  | ペレットが上清とともに吸引される場合は、ペレットをチューブの底にゆっくりと落とし、ピペットチップを使ってペレットをチューブに再度付着させる。あるいは上清を再び遠心する。                  |
| b) スタートサンプル量が不十分    | スタートサンプル量を増やす。薄い切片を数枚使用する代わりに厚い切片 (20 $\mu\text{m}$ ) を使用する。  |
| c) 脱パラフィンが十分でない     | 脱パラフィン用のヘプタンを使用して精製操作をもう一度行なう。  |
| d) 沈殿前にサンプルを冷却していない | 最初の proteinase K 分解を行なった後、サンプルを氷上で冷却することで効率的に沈殿させる (プロトコールのステップ 7)。サンプルが冷却されていないと、DNA は沈殿できず上清中に消失する。 |

### RNeasy あるいは QIAamp MinElute Spin Column の目詰まり

- |                   |   |
|-------------------|---|
| a) スタートサンプル量が多すぎる | スタートサンプル量を減らす。正確なサンプル量で実験を始めることが重要である (英語版 Handbook 13 ページ参照)。  |
| b) 遠心操作時の温度が低すぎる  | 遠心温度を 15 ~ 25°C に設定する。20°C に設定しても 15°C 以下に冷却される遠心機もある。これが RNeasy あるいは QIAamp MinElute Spin Column の目詰りをおこす沈殿物を形成する原因となる。このような場合は遠心温度を 25°C に設定する。RNeasy あるいは QIAamp MinElute Spin Column にサンプルを入れる前に、エタノールを添加したサンプルを 37°C で温める (プロトコールのステップ 14 および 30)。 |

## コメント

---

### 核酸収量が低い

- a) スタートサンプルの品質が低い 20 時間以上固定した、あるいは長期間保存したサンプルから調製した核酸はほとんど使用できない。  
顕微鏡スライド上に固定された切片は長期間空気に触れているため、使用可能な核酸がほとんど含まれていない。
- b) スタートサンプル量が多すぎる 溶解に用いたサンプル量が多すぎて RNeasy あるいは QIAamp MinElute Spin Column にオーバーロードした場合、核酸収量が顕著に減少し核酸の断片化を引き起こす。スタートサンプル量を減らす（英語版 Handbook 13 ページ参照）。
- c) 脱パラフィンが不十分、あるいはサンプル中のパラフィン含有量が多すぎる パラフィン除去の際（プロトコールのステップ 4）、ペレットが剥がれないように慎重に上清を取る。パラフィン含量が多いサンプルを調製する場合には、パラフィン除去ステップをもう一度繰り返す。
- d) パラフィン除去後のサンプル乾燥が不十分 パラフィン除去後、残留する溶媒を確実に蒸発させる（プロトコールのステップ 4）。
- e) サンプルの溶解が不十分 Proteinase K がより高温で長期間保存されていた。新しいサンプルと新しい proteinase K を用いて操作を繰り返す。包埋前にサンプルが完全に脱水されていたことを確認する。残留しているホルマリンは proteinase K による分解を阻害する。  
Proteinase K の添加前にチューブを指で叩いてペレットをルーズにする。
- f) 96 ~ 100%エタノールではなく低濃度のエタノールを使用した 96 ~ 100%エタノールを用いて新しいサンプルで精製操作をやり直す。メタノールやメチルエチルケトンのような物質を含んだ変性アルコールは使用しない。
- g) Buffer FRN、Buffer RPE、Buffer AW1、Buffer AW2 の調製が不正確 バッファー濃縮液を正確な量のエタノールあるいはイソプロパノールで希釈したことを確認（英語版 Handbook 15 ページの“Preparation of buffers”参照）。

## コメント

---

- h) DNA あるいは RNA がスピнкаラム・メンブレンにまだ結合している
- 溶出ステップを再度行なうか、まず遠心操作前に、Buffer ATE (DNA 調製用) あるいは RNase フリー水 (RNA 調製用) を QIAamp あるいは RNeasy MinElute Spin Column に加え、実験台上で 10 分間インキュベートする。

### RNA 収量が低い

- a) DNA 沈澱後に上清の回収が不十分
- DNA 沈澱後に、RNA を含む上清を完全に取出したことを確認する (プロトコールのステップ 9)。DNA ペレット上に残った上清の RNA が DNA と一緒に精製される。
- b) DNase 分解後 RNA を再結合していない
- RNA、特に small RNA が失われないように、カラム上での DNase 分解を行なった後のフロースルー液を RNeasy MinElute Spin Column にもう一度アプライする。
- c) RNA を含む上清を常温で長期間保存した
- RNA を含む上清を取り出した後 (プロトコールのステップ 9)、すぐに RNA 精製を続けるか、上清を 2 ~ 8°C で 24 時間あるいは -20°C で最高 1 週間保存できる。RNA 精製を始める前に上清を室温 (15 ~ 25°C) に戻す。

### DNA 収量が低い

- a) 最初の proteinase K 分解時間が長すぎる
- ゲノム DNA が上清に混入して RNA と一緒に精製されることを防ぐために、最初の proteinase K 分解ステップ (プロトコールのステップ 6) が 15 分を超えていないことを確かめる。
- b) DNA 沈澱後のペレットが消失
- RNA を含む上清を取り除いた後、DNA を含むペレットがチューブに残っていることを確認する (プロトコールのステップ 9)。ペレットあるいはペレットの一部が上清とともに取り除かれると、DNA は RNA と一緒に精製される。10 ページの “遠心操作後に沈殿した DNA ペレットがルーズ” も参照する。

## コメント

- c) DNA を含むペレットを長期間常温で保存した  
RNA を含む上清を取り除いた後（プロトコールのステップ 9）、DNA を含むペレットは室温（15 ~ 25℃）で 2 時間まで、2 ~ 8℃で最高 1 日保存できる。ペレットの長期保存は -20℃で凍結保存する。DNA 精製開始前にペレットを室温（15 ~ 25℃）に戻す（プロトコールのステップ 25）。
- d) Proteinase K による溶解が不十分  
DNA を含んだペレットの proteinase K 分解が短すぎる（プロトコールのステップ 26）；56℃で 1 時間インキュベートする。DNA 収量を増加したい場合は、一晚インキュベーションを行なうことが可能。一晚以上インキュベートすると、DNA の断片化が増加する。
- e) 90℃のインキュベーション中に攪拌した  
90℃でのインキュベーション中（プロトコールのステップ 27）、サンプルの攪拌・振盪・ホルテックスを行なわない。サーモミキサーを使用する場合は回転させない。
- f) 分光光度計で測定した収量が他の DNA 精製法よりも少ない  
AllPrep プロトコールでの DNA からの RNA 分離は非常に効果的である。このために、AllPrep DNA/RNA FFPE Kit を用いて精製した DNA 濃度を測定した場合、他の方法に比べて  $A_{260}$  値が低くなることがある。 $A_{260}$  値は DNA と RNA の両方を測定するので、AllPrep DNA/RNA FFPE Kit を用いて精製した DNA の  $A_{260}$  値が低いことは DNA が高純度で RNA の混入がないことを、他の方法を用いて精製した DNA の  $A_{260}$  値が高いことは混入した RNA 量が多いことを示唆する場合がある。

### $A_{260}/A_{280}$ 値が低い

$A_{260}/A_{280}$  測定に核酸を水で希釈

純度を測定する前のサンプルの希釈には水ではなく、10 mM Tris-Cl、pH 7.5 を使用する（英語版 Handbook 34 ページ、Appendix B を参照）。

### RNA 溶出液に DNA が混入

a) スタートサンプル量が  
多すぎる

カラム上での DNase 分解により DNA の除去が非常に効率的に行なわれる。しかし DNA 含有量の高い組織（例；胸腺）を大量に処理した場合、DNA 除去効率は低下する。RNA 溶出液中の DNA 混入が著しい場合は、組織切片量を減らして再度精製を行なう。

b) 組織の DNA 含量が  
高い

DNA 含量の非常に高いある種の組織（例；胸腺）では DNA が完璧に除去されないことがある。組織切片量を減らして精製操作を再度行なう。

あるいは RNase-Free DNase Set (cat. no. 79254) を用いて RNA 溶出液の DNase 分解を行なう。その後、QIAGEN Supplementary Protocol RY26 ([www.qiagen.com/literature](http://www.qiagen.com/literature) からダウンロード可能) に従って RNA をクリーンアップする。

2 ステップのリアルタイム RT-PCR で RNA を用いる場合、ゲノム DNA コンタミの除去と逆転写反応をインテグレートした QuantiTect® Reverse Transcription Kit (cat. no. 205311) を用いて cDNA を合成する。1 ステップのリアルタイム RT-PCR で RNA を用いる場合、ゲノム DNA 除去ステップをインテグレートした QuantiFast™ Probe RT-PCR Plus Kit (cat. no. 204482) を使用することを推奨する。

### 核酸を用いたダウンストリーム実験で良い結果がでない

a) 核酸が断片化されている、またはホルムアルデヒドによりクロスリンクされている

AllPrep DNA/RNA FFPE 操作のインキュベーションステップでホルムアルデヒドによるクロスリンクはある程度外されるが、FFPE 切片から精製した DNA と RNA は酵素反応への使用には最適ではない。cDNA 合成にはランダムプライマーか遺伝子特異的なプライマーのみの使用を推奨する。PCR の増幅産物はできるだけ短くすることを推奨する。

b) エタノールのキャリーオーバー

DNA あるいは RNA を溶出する前に、QIAamp あるいは RNeasy MinElute Spin Column のメンブレンを乾燥させるために必ず最高速度で 5 分間遠心する。

## コメント

---

- c) 保存していた洗浄バッファーを十分に混和していない  
長期保存中に Buffer FRN、Buffer RPE、Buffer AW1、Buffer AW2 の塩とアルコールが分離した。使用前にバッファーを完全に混和すること。
- d) 塩類が DNA/RNA 溶出液に混入  
Buffer RPE および Buffer AW2 を室温 (15 ~ 25°C) で使用したことを確認する。
- e) 逆転写反応に使用した RNA 量が不十分  
ほとんどの逆転写酵素では約 1 µg の RNA を使用する。非常に微量の RNA で逆転写酵素反応を行なう場合には、50 ng 未満の RNA 用の高感度な逆転写反応用にデザインされた Sensiscript® RT Kit (cat. no. 205211) を使用することを推奨する。  
1 ステップ RT-PCR やリアルタイム定量 RT-PCR には、QIAGEN OneStep RT-PCR Kit、QuantiFast/QuantiTect Kit をそれぞれ使用することを推奨する。これらのキットは、反応あたりわずか 1 pg から広範囲にわたる RNA 量での増幅が可能である。詳細は [www.qiagen.com/PCR](http://www.qiagen.com/PCR) を参照。

### small RNA のダウンストリーム・アッセイに RNA を用いて良い結果が得られない

- a) RNA 精製操作で使用したエタノール量が不正確  
RNA 精製操作で●で示した方の多量のエタノールを使用したことを確認する。small RNA が効率的に RNeasy MinElute Spin Column メンブレンに結合するためには多量のエタノールが必要。
- b) DNase 分解後に RNA を再結合していない  
RNA、特に small RNA が失われないように、カラム上での DNase 分解後のフロースルー液を RNeasy MinElute Spin Column に再アプライする (プロトコールのステップ 19 ~ 20)。
- c) Buffer FRN が正しく調製されていない  
バッファー濃縮液を正確な量のイソプロパノールで希釈したことを確認 (英語版 Handbook 16 ページの "Preparation of buffers" 参照)。

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, AllPrep®, MinElute®, QuantiFast™, QuantiTect®, RNeasy®, Sensiscript® (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。

© 2010 QIAGEN, all rights reserved.

[www.qiagen.co.jp](http://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](mailto:techservice-jp@qiagen.com)

