

英語版 September 2010 に対応

DNeasy[®] *mericon*[™] Food

プロトコールとトラブルシューティング

様々なタイプの食品検体から迅速なトータル核酸精製



Sample & Assay Technologies

目次

キットに含まれていない器具および試薬	3
重要事項	4
ホモジナイゼーション	4
QIAGEN TissueRuptor/TissueLyser LT システムを用いた破碎	5
プロトコール	
標準プロトコール (2 g)	6
標準プロトコール (200 mg)	8
短いDNA フラグメント精製用プロトコール (2 g)	11
短いDNA フラグメント精製用プロトコール (200 mg)	13
トラブルシューティング	16

ご注意

ご利用になる機器に従って、スタートサンプルの量が 2 g あるいは 200 mg のプロトコールのどちらかをお選びください。詳細は 3 ページの“キットに入っていない機器および試薬”をご覧ください。

キットに含まれていない器具および試薬

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MSDS (material safety data sheet) をご覧ください。

標準プロトコールおよび短いDNAフラグメント精製用プロトコール (2 g)

- ホモジナイザー (4 ページの “重要事項” を参照)
- ボルテックス
- エタノール (96 ~ 100%)*
- クロロホルム
- 遠心チューブ (50 ml)
- マイクロ遠心チューブ (1.5 ml あるいは 2 ml)
- 遠心機 (50 ml チューブ用のローター付き)
- 17,900 x g の遠心力があるマイクロ遠心機 (1.5 ml あるいは 2 ml 用のローター付き)
- シェーカー付きインキュベーターあるいはシェーカー付きウォーターバス (60℃に設定可能)
- ピペットおよびピペットチップ

標準プロトコールおよび短いDNAフラグメント精製用プロトコール (200 mg)

- ホモジナイザー (4 ページの “重要事項” を参照)
- ボルテックス
- エタノール (96 ~ 100%)*
- クロロホルム
- マイクロ遠心チューブ (2 ml)
- 17,900 x g の遠心力があるマイクロ遠心機 (2 ml チューブ用のローター付き)
- サーマミキサー (2 ml チューブ用) あるいはシェーカー付きウォーターバス (60℃に設定可能)
- ピペットおよびピペットチップ

* メタノールやメチルエチルケトンのような物質を含む変性アルコールは使用しないでください。

重要事項

ホモジナイゼーション

記載のプロトコールにおいて検体を確実に破砕することは、食品の溶解やDNA遊離を容易に行なうために重要なだけでなく、食品全体を反映する均一なスタートサンプルを得るためにも重要です。

スタートサンプルから、予測される感度や検体量を考慮する必要があります。より高い感度を必要とする場合（食品中の微量DNA検出、例えばアレルゲンあるいは遺伝子組み換え作物 [GMO]）、あるいは不均一な食品（ソーセージ中の粗ミンチ肉など）では、食品全体を反映する均一なスタートサンプルを操作で使用するために、多量の検体をホモジナイズする必要があります。検体量に加えてさらに検体のタイプもまたホモジナイゼーション操作で重要な要因です。これら両方の側面から、効率的な破砕に最適なホモジナイザーを決めなければなりません。

最適なホモジナイザー選ぶためには、食品が柔らかい、硬い、非常に硬いかを決めなければなりません。各タイプの食品検体用にいくつかのオプションがあります（以下参照）。

柔らかい検体（フルーツジャム中の全果物あるいは野菜）

- 少量のスタートサンプル量：ナイフミル（少量用）、QIAGEN® TissueRuptor™、ハンドブレンダー
- 大量のスタートサンプル量：ナイフミル（大量用）

固形／硬い検体（サラミあるいは冷凍食品など）

- 少量のスタートサンプル量：ナイフミル（少量用）、QIAGEN TissueLyser LT、QIAGEN TissueLyser II、乳鉢と乳棒
- 大量のスタートサンプル量：ナイフミル（大量用）

非常に硬い検体（根あるいは種など）

- 少量のスタートサンプル量：インパクトミル（少量用）、QIAGEN TissueLyser LT、QIAGEN TissueLyser II
- 大量のスタートサンプル量：インパクトミル（大量用）

QIAGEN TissueRuptor/Tissuelyser LT システムを用いた破碎

QIAGEN TissueRuptor あるいは Tissuelyser システムは液体窒素中での検体凍結と組み合わせることにより、最高のホモジナイズを実現します。これによりホモジナイズの難しい検体でも均一なスタートサンプルが得られます。

TissueRuptor は Food Lysis Buffer なしに、液体窒素中での検体の凍結後に破碎します。あるいは、果物や野菜などの新鮮な検体は液体窒素を使用せずに Food Lysis Buffer 中で直接破碎が可能です。しかしこれは高分子量 DNA の剪断を引き起こす可能性があります。ゲノム DNA の剪断を避けるために、破碎時間はできるだけ短くします。Tissuelyser LT を用いると、新鮮な検体は液体窒素中での検体の凍結を行わずに溶解バッファー中で直接破碎できます。あるいは、新鮮または凍結した検体は液体窒素で凍結後に溶解バッファーなしでも破碎できます。

凍結した検体を溶解バッファー中で破碎すると、DNA の収量低下や分解の原因になるのでお奨めしません。

プロトコール：標準プロトコール（2 g）

このプロトコールは、ラージスケール（2 g）の生鮮あるいは加工食品検体からトータル DNA を抽出するためにデザインされています。

実験を始める前の重要事項

- 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。

実験開始前の準備事項

- 食品検体をホモジナイズします。破碎操作ならびに破碎装置に関する情報詳細は4ページの“重要事項”をご覧ください。
- Buffer AW2 は濃縮状態でお届けします。最初に使用する際に、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。

操作手順

1. **50 ml の遠心チューブにホモジナイズした食品検体 2 g を入れる。10 ml の Food Lysis Buffer と 25 μ l の Proteinase K 溶液を添加する。試薬を完全に分布させ、サンプル材料を湿潤させるために簡単にボルテックスする。**

注：デンプンなどの大幅に膨潤するサンプルに関しては、Food Lysis Buffer を2倍量（20 ml）にして、バッファー溶液でサンプルを確実に覆います。

2. **一定速度で振盪しながら 60℃で 30 分間インキュベートする。阻害物質を効率よく沈殿させるために、インキュベーション後、サンプルを氷上に置いて室温（15～25℃）まで冷ます。**
3. **2,500 x g で 5 分間遠心操作する。**

注：上清の量は、アプライしたスタートサンプルの性質と沈殿した CTAB・阻害物質のコンプレックスの量により大幅に変動します。遠心操作後の上清量は、2 ml（ホモジナイズしたコーンフレークなど膨潤する食品）から 7 ml（ケチャップなど膨潤しない食品）の範囲であると予想されます。チューブの底の沈殿物を次のステップに混入させないようにしてください。

4. **2 ml のマイクロ遠心チューブに 500 μ l のクロロホルムをピペットで入れる。**

注：クロロホルムは有害物質です。クロロホルムのピペッティングはドラフト内で行なってください。

注：有機溶媒なのでチューブから他のチューブに移す際にピペットチップからクロロホルムが漏れることがあります。2～3回クロロホルムをピペッティングしてピペットマン内部をクロロホルムガスで飽和させてから一定の量を吸うことで、漏れを回避することができます。

5. ステップ3の透明な上清 700 μ l を、クロロホルムが入ったマイクロ遠心チューブに慎重に入れる。下の層には沈殿した食品残渣が含まれているので、混入しないように気をつける。

注：上清は強く着色されていることがあります。またステップ3の遠心操作後3層になる食品があります。この場合は、ピペットで上層を突き通し、透明の中層から700 μ lのみ吸い取り、使用します。上層が半固体膜（チョコレートなどで観察される）を形成している場合は、ピペットで膜を破り、透明の中層から700 μ lのみ吸い取り、使用します。

6. ステップ5のマイクロ遠心チューブを15秒間激しくボルテックスし、14,000 \times gで15分間遠心操作する。

注：上清が透明でない場合は5分間、再度遠心します。

7. 350 μ lのBuffer PBを新しい2 mlマイクロ遠心チューブにピペットで入れて、ステップ6からの上部の水層350 μ lを添加し、ボルテックスで完全に混和する。

8. 2 ml コレクションチューブ（添付）にセットされたQIAquick® Spin Columnにステップ7の溶液をピペットで入れる。17,900 \times gで1分間遠心し、フロースルー液を廃棄する。コレクションチューブはステップ9で再使用する。

9. 500 μ lのBuffer AW2をQIAquick Spin Columnに添加し、17,900 \times gで1分間遠心操作して、フロースルー液を廃棄する。コレクションチューブを再利用し、もう一度17,900 \times gで1分間遠心操作してメンブレンを乾燥する。

注：エタノールをBuffer AW2に添加したことを確認します。6ページの“実験開始前の準備事項”を参照してください。

注：フロースルー液を除去した後に2回目の遠心操作を行わなければ、Buffer AW2由来の残留エタノールを完全に除去できません。

10. QIAquick Spin Columnを1.5 mlあるいは2 mlマイクロ遠心チューブ（別途準備）に移し、150 μ lのBuffer EBをQIAquickメンブレン上に直接ピペットで添加する。室温（15～25℃）で1分間インキュベートした後、17,900 \times gで1分間遠心操作して溶出する。

プロトコール：標準プロトコール（200 mg）

このプロトコールは、スモールスケール（200 mg）の生鮮あるいは加工食品検体からトータル DNA を精製するためにデザインされています。

実験を始める前の重要事項

- 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。
- このプロトコールはスタートサンプル量の少ない食品検体を処理するために使用します。しかしながら全体的なDNA収量は、標準プロトコール（2 g）を用いて得られる収量と同等です。これは、ステップ5で上清をプールし、DNA精製の際に同量のサンプルを処理するためです。サンプルをプールできるように十分な本数の溶解用チューブ（3～4本）を準備してください。

実験開始前の準備事項

- 食品検体をホモジナイズします。破碎操作ならびに破碎装置に関する情報詳細は4ページの“重要事項”をご覧ください。
- Buffer AW2は濃縮状態でお届けします。最初に使用する際に、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。

操作手順

1. 2 ml のマイクロ遠心チューブにホモジナイズした食品検体 **200 mg** を入れる。1 ml の Food Lysis Buffer と 2.5 μ l の Proteinase K 溶液を添加する。試薬を完全に分布させ、サンプル材料を湿潤させるために簡単にボルテックスする。
注：標準プロトコール（2 g）を用いて得られるDNA収量と同等になるようにステップ5で上清をプールします。スタートサンプルにより異なりますが、1 ml の溶解バッファーからの上清は700 μ l 未満になります。その結果、次のクロロホルム抽出操作に最適な700 μ l になるように上清をプールするために、十分な本数の溶解用チューブ（3～4本）を準備します。
注：デンプンなどの大幅に膨潤するサンプルに関しては、Food Lysis Buffer を2倍（2 ml）にして、バッファー溶液でサンプルを確実に覆います。
2. 一定速度で振盪（1,000 rpm）しながら60℃で30分間サーモミキサーでインキュベートする。阻害物質を効率よく沈殿させるために、インキュベーション後、サンプルを氷上に置いて室温（15～25℃）まで冷ます。

3. 2,500 x g で 5 分間遠心操作する。

注：上清の量は、アプライしたスタートサンプルの性質と沈殿した CTAB・阻害物質のコンプレックスの量により大幅に変動します。遠心操作後の上清量は、200 μ l（ホモジナイズしたコーンフレークなど膨潤する食品）から 700 μ l（ケチャップなど膨潤しない食品）の範囲であると予想されます。チューブの底の沈殿物を次のステップに混入させないようにしてください。

4. 2 ml のマイクロ遠心チューブに 500 μ l のクロロホルムをピペットで入れる。

注：クロロホルムは有害物質です。クロロホルムのピペッティングはドラフト内で行なってください。

注：有機溶媒なのでチューブから他のチューブに移す際にピペットチップからクロロホルムが漏れることがあります。2～3 回クロロホルムをピペッティングして（ピペットマン内部をクロロホルムガスで飽和させて）から一定の量を吸うことで、漏れを回避することができます。

5. ステップ 3 の各溶解用チューブから透明な上清をできるだけ多く慎重に吸い取る。その際に、チューブの底にある沈殿した阻害物質を剥がさないように気をつける。1 本のマイクロ遠心チューブに上清を集め、溶液をピペットで数回アップダウンして完全に均一にする。

6. マイクロ遠心チューブにプールした透明な上清 700 μ l を、クロロホルムの入ったマイクロ遠心チューブに入れる。

注：上清は強く着色されていることがあります。またステップ 3 の遠心操作後 3 層になる食品があります。この場合は、ピペットで上層を突き通し、透明の中層から溶液のみ吸い取り、使用します。上層が半固体膜（チョコレートなどで観察される）を形成している場合は、ピペットで膜を破り、透明の中層から溶液のみ吸い取り、使用します。

7. ステップ 6 のマイクロ遠心チューブを 15 秒間激しくボルテックスし、14,000 x g で 15 分間遠心操作する。

注：上清が透明でない場合は 5 分間、再度遠心します。

8. 350 μ l の Buffer PB を新しい 2 ml マイクロ遠心チューブにピペットで入れて、ステップ 7 からの上部の水層 350 μ l を添加し、ボルテックスで完全に混和する。

9. 2 ml コレクションチューブ（添付）にセットした QIAquick Spin Column にステップ 8 の溶液をピペットで入れる。17,900 x g で 1 分間遠心し、フロースルー液を廃棄する。コレクションチューブはステップ 10 で再使用する。

10. 500 μ l の Buffer AW2 を QIAquick Spin Column に添加し、17,900 x g で 1 分間遠心操作して、フロースルー液を廃棄する。コレクションチューブを再利用し、もう一度 17,900 x g で 1 分間遠心操作してメンブレンを乾燥する。

注：エタノールを Buffer AW2 に添加したことを確認します。8 ページの“実験開始前の準備事項”を参照してください。

注：フロースルー液を除去した後に 2 回目の遠心操作を行わなければ、Buffer AW2 由来の残留エタノールを完全に除去できません。

11. QIAquick Spin Column を 1.5 ml あるいは 2 ml マイクロ遠心チューブ(別途準備)に移し、150 μ l の Buffer EB を QIAquick 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、17,900 x g で 1 分間遠心操作して溶出する。

プロトコール：短い DNA フラグメント精製用プロトコール (2 g)

このプロトコールは、ラージスケール (2 g) の生鮮あるいは加工食品検体からトータル DNA を精製するためにデザインされています。これは、短い DNA フラグメントを最大限に回収するためにカラム結合条件が最適化されています。DNA が熱処理 (例：調理、加熱滅菌など)、高圧、照射、pH 変動、乾燥などを受け、その結果 DNA が断片化 (100 ~ 200 bp) されている高度に加工された食品に推奨します。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作はマイクロ遠心機を用いて室温 (15 ~ 25°C) 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。

実験開始前の準備事項

- 食品検体をホモジナイズします。破碎操作ならびに破碎装置に関する情報詳細は 4 ページの“重要事項”をご覧ください。
- Buffer AW2 は濃縮状態でお届けします。最初に使用する際に、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。

操作手順

1. 50 ml の遠心チューブにホモジナイズした食品検体 2 g を入れる。10 ml の Food Lysis Buffer と 25 μ l の Proteinase K 溶液を添加する。試薬を完全に分布させ、サンプル材料を湿潤させるために簡単にボルテックスする。

注：デンプンなどの大幅に膨潤するサンプルに関しては、Food Lysis Buffer を 2 倍 (20 ml) にして、バッファー溶液でサンプルを確実に覆います。

2. 一定速度で振盪しながら 60°C で 30 分間インキュベートする。阻害物質を効率よく沈殿させるために、インキュベーション後、サンプルを氷上に置いて室温 (15 ~ 25°C) まで冷ます。
3. 2,500 x g で 5 分間遠心操作する。

注：上清の量は、アプライしたスタートサンプルの性質と沈殿した CTAB・阻害物質のコンプレックスの量により大幅に変動します。遠心操作後の上清量は、2 ml (ホモジナイズしたコーンフレークなど膨潤する食品) から 7 ml (ケチャップなど膨潤しない食品) の範囲であると予想されます。チューブの底の沈殿物を次のステップに混入させないようにしてください。

4. **2 ml**のマイクロ遠心チューブに**500 μ l**のクロロホルムをピペットで入れる。
注：クロロホルムは有害物質です。クロロホルムのピPETTINGはドラフト内で行なってください。
注：有機溶媒なのでチューブから他のチューブに移す際にピPETチップからクロロホルムが漏れることがあります。2～3回クロロホルムをピPETTINGして（ピPETマン内部をクロロホルムガスで飽和させて）から一定の量を吸うことで、漏れを回避することができます。
5. ステップ3の透明な上清**700 μ l**を、クロロホルムの入ったマイクロ遠心チューブに慎重に入れる。下の層には沈殿した食品残渣が含まれているので、混入しないように気をつける。
注：上清は強く着色されていることがあります。またステップ3の遠心操作後3層になる食品があります。この場合は、ピPETで上層を突き通し、透明の中層から**700 μ l**のみ吸い取り、使用します。上層が半固体膜（チョコレートなどで観察される）を形成している場合は、ピPETで膜を破り、透明の中層から**700 μ l**のみ吸い取り、使用します。
6. ステップ5のマイクロ遠心チューブを**15**秒間激しくボルテックスし、**14,000 x g**で**15**分間遠心操作する。
注：上清が透明でない場合は5分間、再度遠心します。
7. **1 ml**のBuffer PBを新しい**2 ml**マイクロ遠心チューブにピPETで入れて、ステップ6からの上部の水層**250 μ l**を添加し、ボルテックスで完全に混和する。
8. **2 ml**コレクションチューブ(添付)にセットしたQIAquick Spin Columnにステップ7の溶液を**600 μ l**ピPETで入れる。**17,900 x g**で1分間遠心し、フロースルー液を廃棄する。コレクションチューブはステップ9で再使用する。
9. 残ったサンプルでステップ8を繰り返し、フロースルー液を廃棄する。コレクションチューブはステップ10で再使用する。
10. **500 μ l**のBuffer AW2をQIAquick Spin Columnに添加し、**17,900 x g**で1分間遠心操作して、フロースルー液を廃棄する。コレクションチューブを再利用し、もう一度**17,900 x g**で1分間遠心操作してメンブレンを乾燥する。
注：エタノールをBuffer AW2に添加したことを確認します。11ページの“実験開始前の準備事項”を参照してください。
注：フロースルー液を除去した後に2回目の遠心操作を行わなければ、Buffer AW2由来の残留エタノールを完全に除去できません。
11. QIAquick Spin Columnを**1.5 ml**あるいは**2 ml**マイクロ遠心チューブ(別途準備)に移し、**100 μ l**のBuffer EBをQIAquickメンブレン上に直接ピPETで添加する。室温（**15～25 $^{\circ}$ C**）で1分間インキュベートした後、**17,900 x g**で1分間遠心操作して溶出する。

プロトコール：短い DNA フラグメント精製用プロトコール (200 mg)

このプロトコールは、スモールスケール (200 mg) の生鮮あるいは加工食品検体からトータル DNA を精製するためにデザインされています。短い DNA フラグメントを最大限に回収するためにカラム結合条件が最適化されています。DNA が熱処理 (例 ; 調理、加熱滅菌など)、高圧、照射、pH 変動、乾燥などを受け、その結果 DNA が断片化 (100 ~ 200 bp) されている高度に加工された食品に推奨します。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作はマイクロ遠心機を用いて室温 (15 ~ 25°C) 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。
- このプロトコールではスタートサンプル量の少ない食品検体を取り扱います。しかし全体的な DNA 収量は、短い DNA フラグメント精製用プロトコール (2 g) を用いて得られる収量とほぼ同じです。これは、ステップ 5 で上清をプールし、DNA 精製の際に同量のサンプルを処理するためです。サンプルをプールできるように十分な本数の溶解用チューブ (3 ~ 4 本) を準備してください。

実験開始前の準備事項

- 食品検体をホモジナイズします。破碎操作ならびに破碎装置に関する情報詳細は 4 ページの“重要事項”をご覧ください。
- Buffer AW2 は濃縮状態でお届けします。最初に使用する際に、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。

操作手順

1. 2 ml のマイクロ遠心チューブにホモジナイズした食品検体 200 mg を入れる。1 ml の Food Lysis Buffer と 2.5 μ l の Proteinase K 溶液を添加する。試薬を完全に分布させ、サンプル材料を湿潤させるために簡単にボルテックスする。

注：短い DNA フラグメント精製用プロトコール (2 g) を用いて得られる DNA 収量に類似するようにステップ 5 で上清をプールのします。スタートサンプルにより異なりますが、1 ml の溶解バッファーからの上清は 700 μ l 未満になります。その結果、次のクロロホルム抽出操作に最適な 700 μ l になるように上清をプールするために、十分な本数の溶解用チューブ (3 ~ 4 本) を準備します。

注：デンプンなどの大幅に膨潤するサンプルに関しては、Food Lysis Buffer を 2 倍 (2 ml) にして、バッファー溶液でサンプルを確実に覆います。

2. 一定速度で振盪 (1,000 rpm) しながら 60°C で 30 分間サーモミキサーでインキュベートする。阻害物質を効率よく沈殿させるために、インキュベーション後、サンプルを氷上に置いて室温 (15 ~ 25°C) まで冷ます。
3. 2,500 x g で 5 分間遠心操作する。

注：上清の量は、アプライしたスタートサンプルの性質と沈殿した CTAB・阻害物質のコンプレックスの量により大幅に変動します。200 μ l (ホモジナイズしたコーンフレークなど膨潤する食品) から 700 μ l (ケチャップなど膨潤しない食品) の範囲で遠心操作後の上清量が予想されます。チューブの底の沈殿物を次のステップに混入させないようにしてください。

4. 2 ml のマイクロ遠心チューブに 500 μ l のクロロホルムをピペットで入れる。

注：クロロホルムは有害物質です。クロロホルムのピペッティングはドラフト内で行なってください。

注：有機溶媒なのでチューブから他のチューブに移す際にピペットチップからクロロホルムが漏れることがあります。2 ~ 3 回クロロホルムをピペッティングして (ピペットマン内部をクロロホルムガスで飽和させて) から一定の量を吸うことで、漏れを回避することができます。

5. ステップ 3 の各溶解用チューブ replicate から透明の上清をできるだけ多く慎重に抜き取る。その際に、チューブの底にある沈殿した阻害物質を剥がさないように気をつける。1 本のマイクロ遠心チューブに上清を集め、溶液をピペットで数回アップダウンして完全に均一にする。

6. マイクロ遠心チューブにブールした透明な上清 700 μ l を、クロロホルムの入ったマイクロ遠心チューブに入れる。

注：上清は強く着色されていることがあります。またステップ3の遠心操作後3層になる食品があります。この場合は、ピペットで上層を突き通し、透明の中層から溶液のみ吸い取り、使用します。上層が半固体膜（チョコレートなどで観察される）を形成している場合は、ピペットで膜を破り、透明の中層から溶液のみ吸い取り、使用します。

7. ステップ6のマイクロ遠心チューブを15秒間激しくボルテックスし、14,000 \times gで15分間遠心操作する。

注：上清が透明でない場合は5分間、再度遠心します。

8. 1 mlのBuffer PBを新しい2 mlマイクロ遠心チューブにピペットで入れて、ステップ7からの上部の水層250 μ lを添加し、ボルテックスで完全に混和する。

9. 2 mlコレクションチューブ（添付）にセットしたQIAquick Spin Columnにステップ8の溶液を600 μ lピペットで入れる。17,900 \times gで1分間遠心し、フロースルー液を廃棄する。コレクションチューブはステップ10で再使用する。

10. 残ったサンプルでステップ9を繰り返し、フロースルー液を廃棄する。コレクションチューブはステップ11で再使用する。

11. 500 μ lのBuffer AW2をQIAquick Spin Columnに添加し、17,900 \times gで1分間遠心操作して、フロースルー液を廃棄する。もう一度17,900 \times gで1分間遠心操作してメンブレンを乾燥する。

注：エタノールをBuffer AW2に添加したことを確認します。13ページの“実験開始前の準備事項”を参照してください。

注：フロースルー液を除去した後に2回目の遠心操作を行わなければ、Buffer AW2由来の残留エタノールを完全に除去できません。

12. QIAquick Spin Columnを1.5 mlあるいは2 mlマイクロ遠心チューブ（別途準備）に移し、100 μ lのBuffer EBをQIAquickメンブレン上に直接ピペットで添加する。室温（15～25 $^{\circ}$ C）で1分間インキュベートした後、17,900 \times gで1分間遠心操作して溶出する。

トラブルシューティング

コメント

60°Cでのインキュベーションと続く遠心操作の後、溶解溶液上に固形状の膜を形成

溶解後に遊離した食品成分は、反応溶液の上部に堆積あるいは圧縮される	プロトコルを続ける。ピペットで上層に穴を開ける。透明の中層から 700 μ l を慎重に吸い取り、ピペットチップの先が付着物でブロックされないようにする。
-----------------------------------	---

60°Cでのインキュベーションと続く遠心操作の後、溶解溶液に 700 μ l 吸い取るための上清がない

- | | |
|-------------------------------|--|
| a) 食品破砕が不十分、食品が膨潤 (コーンフレークなど) | Food Lysis Buffer を添加する前に食品が完全にホモジナイズされていることを確認する。 |
| b) ホモジナイズ澄みの食品が膨潤 (デンプンなど) | 同量のサンプルをアプライするが Food Lysis Buffer の量を 2 倍にする。 |

QIAquick メンブレンが着色

溶解/阻害物質沈殿の操作で食品中の阻害物質が混入し、クロロホルム抽出物がメンブレンに付着した

Buffer AW2 で洗浄後、500 μ l のエタノール (96 ~ 100%) でさらに洗浄ステップを実施する。20,000 \times g で 2 分間遠心操作を行ない、メンブレンを乾燥し、プロトコルを続ける。

阻害物質は一般的に以下のタイプのどれかである：

- メンブレンに残留する。洗浄・溶出後メンブレンが着色しているが DNA の溶出と品質は影響を受けない。
- エタノール洗浄ステップを再度行なうことにより取り除かれる。
- DNA と一緒に溶出する。18 ページの “DNA を用いたダウンストリーム実験で良い結果がでない” を参照。

コメント

DNA 溶出液が着色

阻害物質が混入

18 ページの “DNA を用いたダウンストリーム実験で良い結果がでない” を参照。

DNA 収量が低い

a) 破碎が不十分

スタートサンプルが完全に破碎したことを確認する。5 ページの “QIAGEN TissueRuptor/TissueLyser LT システムを用いた破碎” を参照。

b) 溶解が不十分

スタートサンプル量を減らす、および／あるいは Food Lysis Buffer 量を増加する。

正確な量の Proteinase K を溶解反応液に添加したことを確認する。必要に応じて、60°C の Proteinase K 分解のためのインキュベーション時間を 90 分まで延長するか Proteinase K の量を 50 μ l まで増やす。

c) Buffer AW2 の調製が不適切

使用前にエタノールを Buffer AW2 に添加したことを確認する（使用するプロトコールに応じて各ページの “実験開始前の準備事項” を参照）。

d) 結合条件が不適切

クロロホルム抽出の後、正確な量のライセートをピペッティングし、Buffer PB と 1:1（標準プロトコール）あるいは 1:4（短いフラグメント DNA 用プロトコール）の比で混和して結合条件を正確に調節する。

e) DNA がメンブレンに結合したまま

Buffer EB の量を 200 μ l まで増やし、遠心操作前に室温（15 ~ 25°C）でカラムを 5 分間インキュベートする。

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) 阻害物質の混入 阻害物質の混入は溶出液が着色することにより認識できる場合がある。サンプルを 1 : 10 に希釈してから PCR 解析を行なう。
- b) エタノールの混入 Buffer AW2 で洗浄後に遠心操作による乾燥を行なう。遠心操作によるメンブレンの乾燥を完全に行なう前に、洗浄後のフロースルー液を廃棄する必要がある。
- c) 塩の混入 Buffer AW2 を室温（15 ~ 25℃）で使用したことを確認する。
- d) ダウンストリームアプリケーションに使用した DNA が不十分あるいは多すぎる 必要に応じてダウンストリームアプリケーションに使用する DNA 量を最適化する。DNA が不十分あるいは多すぎるとダウンストリームアプリケーションに悪影響を及ぼす可能性がある。

Trademarks: QIAGEN®, QIAquick®, DNeasy®, *mericon*™, 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。

© 2010–2011 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

