

# FlexiGene DNA Kit

## プロトコールとトラブルシューティング

ヒト全血からのDNA精製

バッフィーコートからのDNA精製

培養細胞からのDNA精製

February 2002



# 目次

100 ~ 500 $\mu$ l 全血からのDNA分離用プロトコール	3
1 ~ 3 ml 全血からのDNA分離用プロトコール	6
4 ~ 14 ml 全血からのDNA分離用プロトコール	9
20 ml 全血からのDNA分離用プロトコール	12
100 ~ 500 $\mu$ l バッフィーコートからのDNA分離用プロトコール	15
1 ~ 2 x 10 <sup>6</sup> 培養細胞からのDNA分離用プロトコール	18
トラブルシューティングガイド	21

# 100～500 µl 全血からのDNA 分離用プロトコール

## 試薬の調製

### QIAGEN Protease ストック溶液

凍結乾燥しているQIAGEN Protease を次の容量の Buffer FG3 (水和用バッファー) に再懸濁させます。

- 50 ml FlexiGene DNA Kit を用いる場合には0.3 ml
- 250 ml FlexiGene DNA Kit を用いる場合には1.4 ml

溶けたQIAGEN Protease は2～8°C あるいは分注して-20 °C で保存します。

### Buffer FG2/QIAGEN Protease 混合液

処理する血液のトータル量を計算します。1 ml 血液毎に 500 µl の Buffer FG2 (変性バッファー) と 5 µl の調製済みの QIAGEN Protease (表2 参照) を添加して攪拌します。Buffer FG2/QIAGEN Protease は使用 1 時間以内に調製してください。

表 2. 様々なバッチ容量で必要な Buffer FG2 および QIAGEN Protease 容量

バッチ中の血液のトータル量 (µl)	100	300	500	1000	3000	5000	6000
Buffer FG2 の量 (µl)	50	150	250	500	1500	2500	3000
QIAGEN Protease の量 (µl)	0.5	1.5	2.5	5	15	25	30

## 実験を始める前の重要事項

- 次のプロトコールで用いるバッファー量は300 µl の全血サンプルからのDNA 分離に最適です。用いる血液サンプル量に比例して、試薬の量を調整することにより、100～500 µl の血液サンプルからのDNA 分離に適応します (4 ページ、表3 参照)。しかしながら、ステップ13 でDNA の溶解に用いる Buffer FG3 の容量は、100 µl のスタート血液サンプルでは100 µl に減少し、200 µl あるいはそれ以上のスタート血液サンプル量では200 µl 用います。

表 3. 100 ~ 500  $\mu\text{l}$  の血液サンプル処理に必要な試薬量

	血液量 ( $\mu\text{l}$ )				
	100	200	300	400	500
Buffer FG1 ( $\mu\text{l}$ )	250	500	750	1000	1250
Buffer FG2/QIAGEN Protease ( $\mu\text{l}$ )	50	100	150	200	250
100% イソプロパノール ( $\mu\text{l}$ )	50	100	150	200	250
70% エタノール ( $\mu\text{l}$ )	50	100	150	200	250
Buffer FG3 ( $\mu\text{l}$ )	100	200	200	200	200

- 凍結した血液を37℃の水浴で、静かに攪拌させながら、すみやかに解凍させ、調製を始める直前まで氷上に保存します。
- ステップ5 および13 で、ヒーティングブロックあるいは水浴を65℃に熱します。
- すべての遠心ステップは室温で固定アングルローターを用いて行います。
- 300  $\mu\text{l}$  ~ 500  $\mu\text{l}$  の血液サンプルからのDNA分離は、2 ml の遠心チューブを用います。

#### 操作手順

- 750  $\mu\text{l}$  のBuffer FG1 を1.5 ml の遠心チューブにピペットで入れる。300  $\mu\text{l}$  の全血を添加して、チューブを5回上下に転倒させて攪拌する。
- 固定アングルローターで、10,000 x g で20秒間遠心操作する。
- 上清を捨て、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に2分間置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。

注：ペレットがルーズな場合は静かに上清を捨ててください。チューブを転倒させることにより、チューブの縁や脇からのペレットへの上清の逆流を最小限に抑えます。

- 150  $\mu\text{l}$  のBuffer FG2/QIAGEN Protease (“試薬の調製”を参照)を添加し、チューブを閉め、迅速にペレットが完全に均一化されるまでボルテックスを行う。ホモジナイズが完全に行われたことを確認する。

注：多数のサンプルを処理する場合には、Buffer FG2/QIAGEN Protease 添加後、すぐにそれぞれのチューブをボルテックスします。すべてのサンプルへのバッファー添加が終了するまで待たないでください。

通常、ペレットの均一化には3~4回、5秒間の高スピードのボルテックスで十分です。しかしながら、ゼリー状の粘度があるペレット残留物が残っている場合には、30  $\mu\text{l}$  のBuffer FG2を添加して再びボルテックスします。

5. チューブを3回上下に転倒させ、ヒーティングブロックあるいは水浴にセットし、65℃で5分間インキュベートする。

注：サンプルの色が赤からオリーブグリーンに変化して、タンパク質の分解を示します。

6. 150 µl のイソプロパノール（100%）を添加後、DNA 沈澱が糸状あるいは塊のように観察できるまで、チューブを上下に転倒させて完全にミックスする。

注：イソプロパノールと完全にミックスすることは、DNA を沈澱させるために非常に重要です。これは検査により確認します。非常に少ない白血球細胞数を持つサンプルで、DNA が確認できない場合には、チューブを少なくとも20回転倒させてください。

7. 10,000 x g で3分間、遠心操作を行う。

注：ペレットがルーズな場合には、遠心時間を延ばすかあるいはg値を増やします。

8. 上清を捨て、チューブを転倒させ、吸収性のある清潔な紙の上に置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。

注：ペレットがルーズな場合があるので、静かに上清を捨てます。

サンプルの白血球細胞数が多い場合には、DNA は小さな白いペレットとして観察されます。

9. 150 µl の70%エタノールを添加して5秒間ボルテックスする。

10. 10,000 x g で3分間遠心操作を行う。

注：ペレットがルーズな場合には、遠心時間を延ばすかあるいはg値を増やします。

11. 上清を捨て、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に少なくとも5分間置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。

注：ペレットがルーズな場合があるので、静かに上清を捨ててください。チューブを転倒させることによって、チューブの縁や脇からのペレットへの上清の逆流を最小限に抑えます。

12. 液体が完全に蒸発するまで、DNA ペレットを5分間空気乾燥させる。

注：DNA を長く乾燥させると溶解が非常に難しくなるので、DNA ペレットを乾燥させすぎないように注意してください。

13. 200 µl のBuffer FG3を添加し、低スピードで5秒間ボルテックスを行う。ヒーティングブロックあるいは水浴中で65℃5分間インキュベートして、DNA を溶解させる。

注：DNA が完全に溶解されない場合は、DNA が完全に溶解するまでインキュベーション時間を延長してください。Buffer FG3の使用量が少ないと、インキュベーション時間を長くする必要があります。

# 1～3 ml 全血からのDNA 分離用プロトコール

## 試薬の調製

### QIAGEN Protease ストック溶液

凍結乾燥した QIAGEN Protease を次の容量の Buffer FG3 (hydration buffer) に再懸濁させます。

- 50 ml FlexiGene DNA Kit を用いた場合は 0.3 ml
- 250 ml FlexiGene DNA Kit を用いた場合は 1.4 ml

溶解した QIAGEN Protease は 2～8℃ あるいは -20℃ で分注して保存します。

### Buffer FG2 / QIAGEN Protease 混合液

処理する血液のトータル量を計算します。1 ml 血液毎に 500 µl の Buffer FG2 (変性バッファー) と 5 µl の調製済み QIAGEN Protease (表 4 参照) を添加して攪拌します。Buffer FG2/QIAGEN Protease は使用する 1 時間以内に調製してください。

表 4. 様々なバッチ容量で必要な Buffer FG2 および QIAGEN Protease 容量

バッチ中の血液のトータル量 (ml)	1	3	6	12	18	36
Buffer FG2 の量 (ml)	0.5	1.5	3	6	9	18
QIAGEN Protease の量 (µl)	5	15	30	60	90	180

## 実験を始める前の重要事項

- 次のプロトコールで用いるバッファー量は 3 ml の全血サンプルからの DNA 分離に最適です。用いる血液サンプル量に比例して、試薬の量を調節することで、約 1～3 ml の血液サンプルからの DNA 分離に適応します (表 5 参照)。しかしながら、ステップ 13 で DNA の溶解に用いる Buffer FG3 の容量は、200 µl 以上を用います。

表 5. 1～3 ml の血液サンプル処理に必要な試薬量

	血液量 (ml)		
	1.0	2.0	3.0
Buffer FG1 (ml)	2.5	5.0	7.5
Buffer FG2/QIAGEN Protease (ml)	0.5	1.0	1.5
100% イソプロパノール (ml)	0.5	1.0	1.5
70% エタノール (ml)	0.5	1.0	1.5
Buffer FG3 (ml)	0.2	0.2	0.3

- 凍結した血液を37℃の水浴で、静かに攪拌させながら、すみやかに解凍させ、調製を始める前まで氷上に保存します。
- ステップ5および13で、ヒーティングブロックあるいは水浴を65℃に熱します。
- すべての遠心ステップは室温でスイングローターを用いて行います。

## 操作手順

1. **7.5 mlのBuffer FG1** を15 mlの遠心チューブにピペットで入れる。**3 mlの全血**を添加して、チューブを5回上下に転倒させて攪拌する。
2. スイングローターで、**2,000 x g**で5分間遠心操作する。
3. 上清を捨てて、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に2分間置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。

注：ペレットがルーズな場合は静かに上清を捨ててください。チューブを転倒させることによって、チューブの縁や脇からのペレットへの上清の逆流を最小に抑えます。

4. **1.5 mlのBuffer FG2/QIAGEN Protease** (“試薬の調製”を参照)を添加、チューブを閉め、迅速にペレットが完全に均一化されるまでボルテックスを行う。ホモジナイズが完全に行われたことを確認する。

注：多数のサンプルを処理する場合には、Buffer FG2/QIAGEN Protease 添加後、迅速に各チューブをボルテックスします。すべてのサンプルへのバッファー添加が終了するまで待たないでください。

通常、ペレットのホモジナイズには3～4回の高スピードのボルテックスで十分です。しかしながら、ゼリー状の粘度があるペレット残留物が残っている場合には30 µlのBuffer FG2を添加して、もう一度ボルテックスします。

5. チューブを3回転倒させて、ヒーティングブロックあるいは水浴にセットして、**65℃**で10分間インキュベートする。

注：サンプルの色が赤からオリーブグリーンに変化して、タンパク質の分解を示します。

6. **1.5 mlのイソプロパノール (100%)**を添加後、DNA沈澱が糸状あるいは塊のように観察できるまで、チューブを上下に転倒させてよく攪拌する。

注：イソプロパノールと完全にミックスすることは、DNAを沈澱させるために非常に重要です。非常に低い白血球細胞数を持つサンプルで、DNAが確認できない場合には、チューブを少なくとも20回転倒させてください。

7. **2000 x g**で3分間、遠心操作を行う。

注：ペレットがルーズな場合には、遠心時間を延長するかあるいはg値を上げます。

8. 上清を捨て、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。

注：ペレットがルーズな場合は静かに上清を捨ててください。

サンプルの白血球細胞数が多い場合には、DNA は小さな白いペレットとして観察されます。

9. 1.5 mlの70% エタノールを添加して5 秒間ボルテックスする。

10. 2000 x gで3分間遠心操作を行う。

注：ペレットがルーズな場合には、遠心時間を延長するか、あるいはg 値を上げます。

11. 上清を捨て、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に少なくとも5分間置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。

注：ペレットがルーズな場合は静かに上清を捨てます。チューブを転倒させることによって、チューブの縁や脇からのペレットへの上清の逆流を最小限に抑えます。

12. 液体が完全に蒸発するまで、DNA ペレットを5 分間空気乾燥させる。

注：DNA を長く乾燥させると溶解が非常に難しくなるので、DNA ペレットを乾燥させすぎないように注意します。

13. 300  $\mu$ lのBuffer FG3を添加し、低スピードで5 秒間ボルテックスし、ヒーティングブロックあるいは水浴中で65  $^{\circ}$ C、1 時間インキュベートして、DNA を溶解させる。

注：DNA が完全に溶解されない場合には、溶液を室温で一晩インキュベーションします。Buffer FG3 の使用量が少ないと、インキュベーション時間を延長する必要があります。



## 4 ~ 14 ml 全血からのDNA分離用プロトコール

### 試薬の調製

#### QIAGEN Protease ストック溶液

凍結乾燥しているQIAGEN Proteaseを次の容量のBuffer FG3 (水和用バッファー) に再懸濁させます。

- 50 ml FlexiGene DNA Kit を用いる場合には0.3 ml
- 250 ml FlexiGene DNA Kit を用いる場合には1.4 ml

溶けたQIAGEN Protease は2 ~ 8°C あるいは分注して-20 °C で保存する。

#### Buffer FG2/QIAGEN Protease 混合液

処理する血液のトータル量を計算します。4 ml 血液毎に2 ml のBuffer FG2 (変性バッファー) 20 µl の調製済みQIAGEN Protease (表6 参照) を添加して攪拌します。Buffer FG2/QIAGEN Protease は使用前1時間以内に調製します。

表 6. 様々なバッチ容量で必要なBuffer FG2 およびQIAGEN Protease 容量

バッチ中の血液のトータル量 (ml)	4	10	14	24	48	60	84	120	168
Buffer FG2 の量 (ml)	2	5	7	12	24	30	42	60	84
QIAGEN Protease の量 (µl)	20	50	70	120	240	300	420	600	840

### 実験を始める前の重要事項

- 次のプロトコールで用いるバッファー量は10 mlの全血サンプルからのDNA分離に最適です。用いる血液サンプル量に比例して、試薬の量を調節することで、約4 ~ 14 mlの血液サンプルからのDNA分離に適応します (表7参照)。しかしながら血液量が10 ml以上の場合にはBuffer FG1 の量のみを増加し、その他の試薬の量は血液10 mlで用いた量を使用します。

表 7. 4 ~ 14 mlの血液サンプル処理に必要な試薬量

	血液量 (ml)					
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
Buffer FG1 (ml)	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0	22.5
Buffer FG2/QIAGEN Protease (ml)	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
100 % イソプロパノール (ml)	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
70 % エタノール (ml)	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
Buffer FG3 (ml)	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9

次ページに続く

表 7. 続き

	血液量 (ml)				
	10.0	11.0	12.0	13.0	14.0
<b>Buffer FG1 (ml)</b>	25.0	27.5	30.0	32.5	39.0
<b>Buffer FG2/QIAGEN Protease (ml)</b>	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
<b>100%イソプロパノール (ml)</b>	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
<b>70%エタノール (ml)</b>	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
<b>Buffer FG3 (ml)</b>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

- 凍結した血液を37℃の水浴で、静かに攪拌させながらすみやかに解冻させ、調製を始める前まで氷上に保存する。
- ステップ5および13で、ヒーティングブロックあるいは水浴を65℃に熱する。
- すべての遠心ステップは室温でスイングローター中で、コニカルチューブを用いて行う。

#### 操作手順

- 25 mlのBuffer FG1を50 mlの遠心チューブにピペットで入れる。10 mlの全血を添加して、チューブを5回上下に転倒させて攪拌する。**
- スイングローターで、2000 x gで5分間遠心操作する。**
- 上清を捨て、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に2分間置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。**

注：ペレットがルーズな場合は静かに上清を捨ててください。チューブを転倒させることによって、チューブの縁や脇からのペレットへの上清の逆流を最小限に抑えます。

- 5 mlのBuffer FG2/QIAGEN Protease ("試薬の調製"を参照)を添加、チューブを閉め、迅速にペレットが完全に均一化されるまでボルテックスを行う。ホモジナイズが完全に行われたことを確認する。**

注：多数のサンプルを処理する場合には、Buffer FG2/QIAGEN Protease 添加後、迅速に各チューブをボルテックスします。すべてのサンプルへのバッファー添加が収量するまで待たないでください。

通常、ペレットのホモジナイズには3~4回の高スピードのボルテックス5秒間で十分です。しかしながら、ゼリー状の粘度があるペレット残留物が残っている場合には1 mlのBuffer FG2を添加して、再びボルテックスします。

5. チューブを3回転倒させて、ヒーティングブロックあるいは水浴にセットして、65℃で10分間インキュベートする。

注：サンプルの色が赤からオリーブグリーンに変化して、タンパク質の分解を示します。

6. 5 mlのイソプロパノール（100%）を添加後、DNA沈澱が糸状あるいは塊のように観察できるまで、チューブを上下に転倒させてよく攪拌する。

注：イソプロパノールと完全にミックスすることは、DNAを沈澱させるために非常に重要です。非常に低い白血球細胞数を持つサンプルで、DNAが確認できない場合には、チューブを少なくとも20回転倒させてください。

7. 2000 x gで3分間、遠心操作を行う。

注：ペレットがルーズな場合には、遠心時間を延長するか、あるいはg値を上げます。

8. 上清を捨て、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。

注：ペレットがルーズな場合は静かに上清を捨ててください。

サンプルの白血球細胞数が多い場合には、DNAは小さな白いペレットとして観察されます。

9. 5 mlの70%エタノールを添加して5秒間ボルテックスする。

10. 2000 x gで3分間遠心操作を行う。

注：ペレットがルーズな場合には、遠心時間を延長するかあるいはg値を上げます。

11. 上清を捨て、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に少なくとも5分間置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。

注：ペレットがルーズな場合は、静かに上清を捨てます。チューブを転倒させることによって、チューブの縁や脇からのペレットへの上清の逆流を最小限に抑えます。

12. 液体が完全に蒸発するまで、DNAペレットを5分間空気乾燥させる。

注：DNAを長く乾燥させると溶解が非常に難しくなるので、DNAペレットを乾燥させすぎないように注意します。

13. 1 mlのBuffer FG3を添加し、低スピードで5秒間ボルテックスし、ヒーティングブロックあるいは水浴中65℃1時間インキュベートして、DNAを溶解させる。

注：DNAが完全に溶解されない場合には、溶液を室温で一晩インキュベーションしてください。Buffer FG3の使用量が少ないと、インキュベーション時間を延長する必要があります。

# 20 ml 全血からのDNA 分離用プロトコール

## 試薬の調製

### QIAGEN Protease ストック溶液

凍結乾燥しているQIAGEN Protease を次の容量のBuffer FG3 (水和用バッファー) に再懸濁させます。

- 50 ml FlexiGene DNA Kit を用いる場合には0.3 ml
- 250 ml FlexiGene DNA Kit を用いる場合には1.4 ml

溶けたQIAGEN Protease は2 ~8°C あるいは分注して-20 °C で保存します。

### Buffer FG2/QIAGEN Protease 混合液

処理する血液のトータル量を計算します。20 ml 血液毎に5 mlのBuffer FG2 (変性バッファー) と50 µlの調製済みQIAGEN Protease (表8 参照) を添加して攪拌します。Buffer FG2/QIAGEN Protease は使用する1 時間以内に調製します。

表 8. 様々なバッチ容量で必要なBuffer FG2 およびQIAGEN Protease 容量

バッチ中の血液のトータル量 (ml)	20	120	240
Buffer FG2の量 (ml)	5	30	60
QIAGEN Protease の量 (µl)	50	300	600

## 実験を始める前の重要事項

- 凍結した血液を37 °Cの水浴で、静かに攪拌させながらすみやかに解凍させ、調製を始める前まで氷上に保存します。
- ステップ8 および16で、ヒーティングブロックあるいは水浴を65 °Cに熱します。
- すべての遠心ステップは室温、スイングローター中で、コニカルチューブを用いて行います。

### 操作手順

1. 25 mlのBuffer FG1 を50 mlの遠心チューブにピペットで入れる。10 mlの全血を添加して、チューブを5回上下に転倒させて攪拌する。
2. スイングローターで、2000 x gで5分間遠心操作する。
3. 上清を捨て、ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。

注：ペレットがレーズな場合は静かに上清を捨てます。

4. **25 mlのBuffer FG1**を同じ**50 ml**遠心チューブに入れる。さらに**10 ml**全血を添加して、**5回**チューブを上下に転倒させて攪拌する。

5. スイングローターで**5分間2000 x g**で遠心操作する。

6. 上清を捨て、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に**2分間**置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。

注：ペレットがルーズな場合は静かに上清を捨ててください。チューブを転倒させることによって、チューブの縁や脇からのペレットへの上清の逆流を最小に抑えます。

7. **5 mlのBuffer FG2/QIAGEN Protease** (“試薬の調製”を参照)を添加、チューブを閉め、迅速にペレットが完全に均一化されるまでボルテックスを行う。ホモジナイズが完全に行われたことを確認する。

注：多数のサンプルを処理する場合には、Buffer FG2/QIAGEN Protease 添加後、迅速に各チューブをボルテックスします。すべてのサンプルへのバッファー添加が終了するまで待たないでください。

通常、ペレットのホモジナイズには3~4回の高スピードのボルテックス5秒間で十分です。しかしながら、ゼリー状の粘度があるペレット残留物が残っている場合には1 mlのBuffer FG2を添加して、もう一度ボルテックスします。

8. チューブを**3回**転倒させて、ヒーティングブロックあるいは水浴にセットして、**65°C**で**10分間**インキュベートする。

注：サンプルの色が赤からオリーブグリーンに変化して、タンパク質の分解を示します。

9. **5 mlのイソプロパノール (100%)**を添加後、DNA 沈澱が糸状あるいは塊のように観察できるまで、チューブを上下に転倒させてよく攪拌する。

注：イソプロパノールと完全にミックスすることは、DNA を沈澱させるために非常に重要です。非常に低い白血球細胞数を持つサンプルで、DNA が確認できない場合には、チューブを少なくとも20回転倒させてください。

10. **2000 x g**で**3分間**、遠心操作を行う。

注：ペレットがルーズな場合には、遠心時間を延長するかあるいはg値を上げます。

11. 上清を捨て、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。

注：ペレットがルーズな場合は静かに上清を捨ててください。

サンプルの白血球細胞数が多い場合には、DNA は小さな白いペレットとして観察されます。

**12. 5 ml の70%エタノールを添加して5 秒間ボルテックスする。**

**13. 2000 x g で3 分間遠心操作を行う。**

注：ペレットがルーズ場合には、遠心時間を延長するかあるいは g 値を上げます。

**14. 上清を捨て、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に少なくとも5 分間置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。**

注：ペレットがルーズな場合は静かに上清を捨てます。チューブを転倒させることによって、チューブの縁や脇からのペレットへの上清の逆流を最小限に抑えます。

**15. 液体が完全に蒸発するまで、DNA ペレットを5 分間空気乾燥させる。**

注：DNA を長く乾燥させると溶解が非常に難しくなるので、DNA ペレットを乾燥させすぎないように注意します。

**16. 1 ml のBuffer FG3 を添加し、低スピードで5 秒間ボルテックスし、ヒーティングブロックあるいは水浴中65 °C 1 時間インキュベートして、DNA を溶解させる。**

注：DNA が完全に溶解されない場合には、DNA が完全に溶解するまでインキュベーション時間を延長してください。Buffer FG3 の使用量が少ないと、インキュベーション時間を長くする必要があります。

# 100 ~ 500 $\mu$ l バッフィーコートからのDNA 分離用プロトコール

## 試薬の調製

### QIAGEN Protease ストック溶液

凍結乾燥しているQIAGEN Proteaseを次の容量のBuffer FG3 (水和用バッファー) に再懸濁させます。

- 50 ml FlexiGene DNA Kit を用いる場合には0.3 ml
- 250 ml FlexiGene DNA Kit を用いる場合には1.4 ml

溶けたQIAGEN Protease は2 ~ 8°C あるいは分注して-20 °C で保存します。

### Buffer FG2/QIAGEN Protease 混合液

処理するバッフィーコートのトータル量を計算します。1 ml バッフィーコート毎に1 ml のBuffer FG2 (変性バッファー) と10  $\mu$ l の調製済みQIAGEN Protease (表9 参照) を添加して攪拌します。Buffer FG2/QIAGEN Protease は使用する1 時間以内に調製します。

表9. 様々なバッチ容量で必要なBuffer FG2 およびQIAGEN Protease 容量

バッチ中のバッフィー							
コートのトータル量 ( $\mu$ l)	100	300	500	1000	3000	5000	6000
Buffer FG2 の量 ( $\mu$ l)	100	300	500	1000	3000	5000	6000
QIAGEN Protease							
の量 ( $\mu$ l)	1	3	5	10	30	50	60

## 実験を始める前の重要事項

- 次のプロトコールで用いるバッファー量は300  $\mu$ l のバッフィーコートからのDNA 分離に最適です。用いるバッフィーコートサンプル量に比例して、試薬の量を増減させることで、約100 ~ 500  $\mu$ l のバッフィーコートサンプルからのDNA 分離に適応します (16 ページ、表10 参照)。しかしながら、ステップ13 でDNA の溶解に用いるBuffer FG3 の容量は、すべてのバッフィーコート・スタートサンプル量で、200  $\mu$ l を使用します。

表 10. 100 ~ 500  $\mu$ l のバッフィーコートサンプル処理に必要な試薬量

	バッフィーコート量 ( $\mu$ l)				
	100	200	300	400	500
<b>Buffer FG1 (<math>\mu</math>l)</b>	250	500	750	1000	1250
<b>Buffer FG2/QIAGEN Protease (<math>\mu</math>l)</b>	100	200	300	400	500
<b>100%イソプロパノール (<math>\mu</math>l)</b>	100	200	300	400	500
<b>70%エタノール (<math>\mu</math>l)</b>	100	200	300	400	500
<b>Buffer FG3 (<math>\mu</math>l)</b>	200	200	200	200	200

- 凍結したバッフィーコートを37℃の水浴で、静かに攪拌させながらすみやかに解凍させ、調製を始める前まで氷上に保存します。
- ステップ5 および13 で、ヒーティングブロックあるいは水浴を65℃に熱します。
- すべての遠心ステップは室温で固定アングルローターを用いて行います。
- 300  $\mu$ l ~ 500  $\mu$ l のバッフィーコート・サンプルからのDNA 分離は、2 ml の遠心チューブを用います。

#### 操作手順

- 750  $\mu$ l の Buffer FG1 を 1.5 ml の遠心チューブにピペットで入れる。300  $\mu$ l のバッフィーコートを添加して、チューブを5回上下に転倒させて攪拌する。**
- 固定アングルローターで、10,000 x g で 20 秒間遠心操作する。**
- 上清を捨て、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に2分間置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。**

注：、ペレットがルーズな場合は静かに上清を捨ててください。チューブを転倒させることによって、チューブの縁や脇からのペレットへの上清の逆流を最小限に抑えます。

- 300  $\mu$ l の Buffer FG2/QIAGEN Protease (“試薬の調製”を参照) を添加、チューブを閉め、ペレットが完全に均一化されるまでボルテックスを迅速に行う。ホモジナイズが完全に行われたことを確認する。**

注：多数のサンプルを処理する場合には、Buffer FG2/QIAGEN Protease 添加後、迅速に各チューブをボルテックスします。すべてのサンプルへのバッファー添加が終了するまで待たないでください。

通常、ペレットのホモジナイズには3~4回の高スピードで5秒間のボルテックスで十分です。しかしながら、ゼリー状の粘度があるペレット残留物が残っている場合には30  $\mu$ l の Buffer FG2 を添加して、再びボルテックスします。



5. チューブを3回転倒させて、ヒーティングブロックあるいは水浴にセットして、65℃で5分間インキュベートする。
6. 300 µl のイソプロパノール (100%) を添加後、DNA 沈澱が糸状あるいは塊のように観察できるまで、チューブを上下に転倒させてよく攪拌する。  
注：イソプロパノールと完全にミックスすることは、DNA を沈澱させるために非常に重要です。
7. 10,000 x g で3分間遠心操作する。  
注：ペレットがルーズな場合には、遠心時間を延長するかあるいはg 値を上げます。
8. 上清を捨て、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。  
注：ペレットがルーズな場合は、静かに上清を捨てます。  
DNA は小さな白いペレットとして観察されます。
9. 150 µl の70%エタノールを添加して5秒間ボルテックスする。
10. 10,000 x g で3分間遠心操作を行う。  
注：ペレットがルーズな場合には、遠心時間を延長するかあるいはg 値を増やします。
11. 上清を捨て、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に少なくとも5分間置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。  
注：ペレットがルーズな場合は静かに上清を捨てます。チューブを転倒させることによって、チューブの縁や脇からのペレットへの上清の逆流を最小限に抑えます。
12. 液体が完全に蒸発するまで、DNA ペレットを5分間空気乾燥させる。  
注：DNA を長く乾燥させると溶解が非常に難しくなるので、DNA ペレットを乾燥させすぎないように注意します。
13. 200 µl のBuffer FG3 を添加し、低スピードで5秒間ボルテックスし、ヒーティングブロックあるいは水浴中65℃、5分間インキュベートして、DNA を溶解させる。  
注：DNA が完全に溶解されない場合には、DNA が完全に溶解するまでインキュベーション時間を延長してください。Buffer FG3 の使用量が少ないと、インキュベーション時間を延長する必要があります。

# 1 ~ 2 x 10<sup>6</sup>個の培養細胞からのDNA分離用 プロトコール

## 試薬の調製

### QIAGEN Protease ストック溶液

凍結乾燥した QIAGEN Protease を次の容量の Buffer FG3 (hydration buffer) に再懸濁させます。

- 50 ml FlexiGene DNA Kit を用いた場合は 0.3 ml
- 250 ml FlexiGene DNA Kit を用いた場合は 1.4 ml

溶解した QIAGEN Protease は 2 ~ 8 °C あるいは -20 °C で分注して保存します。

### Buffer FG2 / QIAGEN Protease 混合液

処理するサンプル数を計算します。1 ~ 2 x 10<sup>6</sup> 個の培養細胞を含んだサンプル毎に 300 µl の Buffer FG2 (変性バッファー) と 3 µl の調製済み QIAGEN Protease (表 11 参照) を添加して攪拌します。Buffer FG2/QIAGEN Protease は使用する 1 時間以内に調製します。

表 11. 様々なサンプル数で必要な Buffer FG2 および QIAGEN Protease 容量

サンプル数	1	6	12
Buffer FG2 の量 (µl)	300	1800	3600
QIAGEN Protease の量 (µl)	3	18	36

## 実験を始める前の重要事項

- 凍結した細胞を 37 °C の水浴で、静かに攪拌させながら、解凍させ、調製を始める前まで氷上に保存します。
- ステップ 6 および 14 で、ヒーティングブロックあるいは水浴を 65 °C に熱します。
- すべての遠心ステップは室温で固定アングルローターを用いて行います。

## 操作手順

### 1. 細胞回収

#### a) 浮遊細胞

適切な細胞数（最大 $2 \times 10^6$  個）を1.5 mlのマイクロ遠心チューブに入れて**300 x g**で5分間遠心操作する。細胞ペレットを乱さないように気をつけて、上清を完全に除去して捨てる。ステップ2に続く。

#### b) 付着細胞

付着細胞は培養フラスコからi) トリプシン処理、あるいは ii) 細胞スクレーパーを用いて回収することができる。

i) トリプシン処理：培養液を吸引除去し、PBSで細胞を洗浄。PBSを吸引除去し、トリプシン溶液を添加する。ディッシュあるいはフラスコから細胞を剥離後、培養液に細胞を入れて、1.5 mlマイクロ遠心チューブに適切な細胞数（最大 $2 \times 10^6$  個）を入れる。**300 x g**で5分間遠心操作する。細胞ペレットを乱さないように気をつけて、上清を完全に除去して捨てる。ステップ2に続く。

ii) 細胞スクレーパーの使用：ディッシュあるいはフラスコから細胞を剥離する。1.5 mlマイクロ遠心チューブに適切な細胞数（最大 $2 \times 10^6$  個）を入れて、**300 x g**で5分間遠心操作する。細胞ペレットを乱さないように気をつけて、上清を完全に除去して捨てる。ステップ2に続く。

### 2. 300 µlのBuffer FG1を細胞ペレットに添加して、細胞が再懸濁されるまでピペティングで攪拌する。

注：ライセートは濁っています。

### 3. 固定アングルローターで、10,000 x gで20秒間遠心操作する。

### 4. 上清を捨て、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に2分間置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。

注：ペレットがルーズな場合は静かに上清を捨ててください。チューブを転倒させることによって、チューブの縁や脇からのペレットへの上清の逆流を最小限に抑えます。

### 5. 300 µlのBuffer FG2/QIAGEN Protease ("試薬の調製"を参照)を添加、チューブを閉め、迅速にペレットが完全に均一化されるまでボルテックスを行う。ホモジナイズが完全に行われたことを確認する。

注：多数のサンプルを処理する場合には、Buffer FG2/QIAGEN Protease 添加後、迅速に各チューブをボルテックスします。すべてのサンプルへのバッファー添加が終了するまで待たないでください。

通常、ペレットのホモジナイズには3～4回、5秒間の高スピードのボルテックスで十分です。しかしながら、ゼリー状の粘度があるペレット残留物が残っている場合には30 µlのBuffer FG2を添加して、再びボルテックスします。

6. チューブを3回転倒させ、ヒーティングブロックあるいは水浴にセットして、65℃で10分間インキュベートする。
7. 300  $\mu$ lのイソプロパノール（100%）を添加後、DNA沈澱が糸状あるいは塊のように観察できるまで、チューブを上下に転倒させてよく攪拌する。  
注：イソプロパノールと完全にミックスすることは、DNAを沈澱させるために非常に重要です。
8. 10,000 x gで3分間、遠心操作を行う。  
注：ペレットがルーズな場合には、遠心時間を延長するかあるいはg値を増やします。
9. 上清を捨て、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。  
注：ペレットが消ルーズな場合は、静かに上清を捨ててください。  
DNAは小さな白いペレットとして観察されます。
10. 300  $\mu$ lの70%エタノールを添加して5秒間ボルテックスする。
11. 10,000 x gで3分間遠心操作を行う。  
注：ペレットがルーズな場合には、遠心時間を延長するかあるいはg値を増やします。
12. 上清を捨て、チューブを転倒させて、吸収性のある清潔な紙の上に少なくとも5分間置く。ペレットがチューブ中に残留していることを確認する。  
注：ペレットがルーズな場合は、静かに上清を捨ててください。チューブを転倒させることによって、チューブの縁や脇からのペレットへの上清の逆流を最小限に抑えます。
13. 液体が完全に蒸発するまで、DNAペレットを5分間空気乾燥させる。  
注：DNAを長く乾燥させると溶解が非常に難しくなるので、DNAペレットを乾燥させすぎないように注意します。
14. 200  $\mu$ lのBuffer FG3を添加し、低スピードで5秒間ボルテックスし、ヒーティングブロックあるいは水浴中65℃、5分間インキュベートして、DNAを溶解させる。  
注：DNAが完全に溶解されない場合には、DNAが完全に溶解するまでインキュベーション時間を延長してください。Buffer FG3の使用量が少ないと、インキュベーション時間を長くする必要があります。

# トラブルシューティングガイド

## コメントと提案

---

### DNA 収量が低い

#### QIAGEN Protease 活性の低下

- A) **原因:** プロテアーゼを間違ったバッファーで溶解した、あるいは間違った量のバッファーに溶解した **解決法:** QIAGEN Protease を、プロトコールに記述されているように、正しい量の Buffer FG3 に再懸濁して、新しいサンプルで操作をやりなおす。
- B) **原因:** Buffer FG2/QIAGEN Protease 混合液の調製を間違えたあるいは保存法を間違えた **解決法:** BufferFG2/QIAGEN Protease 混合液に関連したプロトコールの記述通りに調製したことを確認する。

#### サンプル溶解が完全でない

- A) **原因:** サンプルが Buffer FG1 と完全にミックスされていない **解決法:** 新しいサンプルと Buffer FG1 が迅速かつ完全にミックスされたことを確認して、新しいサンプルで精製操作をもう一度やり直す。
- B) **原因:** 血液サンプルが凝固している **解決法:** スタートサンプルには、凝固していない分画のみを用いる。

#### ペレットの再懸濁が困難、あるいはペレットがルーズ、上清と共に捨てた

- 原因:** 遠心スピードが速すぎる、あるいは遅すぎる **解決法:** プロトコールにある推奨される遠心操作に従う。まれに、遠心スピードおよび遠心時間の至適化が必要なおことがある。

#### BufferFG2/QIAGEN Protease 中にペレットを再懸濁した後、ゼリー状の残留ペレットが残った

- 原因:** Buffer FG2/QIAGEN Protease を添加してからサンプルのボルテックスを行うまで1分以上かかった **解決法:** ボルテックスの前に1分以上インキュベーションをしない。ペレットが完全に溶解していない場合には、プロトコールにある適切な量の Buffer FG2 を添加して、もう一度ボルテックスを行う。

**イソプロパノールの添加後、DNA 沈殿物が観察できない**

- A) 原因：サンプルとイソプロパノールのミックスが不完全
- B) 原因：血液あるいはバッフィーコートサンプルの白血球細胞数が非常に低い

**解決法：**イソプロパノール添加後、サンプルを完全に上下に転倒させること。DNA は沈殿して、糸状あるいは塊状に観測される。

**解決法：**これらの場合には、遠心後DNAペレットが観察されないことがある。遠心操作の際のチューブの方向に印をつけて、遠心後、ペレットができるのと反対側の壁から上清を吸引除去する。少量の Buffer FG3 でペレットを再懸濁させる。可能なら、スタートサンプルの量を増加して、DNA 分離操作を繰り返す。

**DNA ペレットが観察されない**

- A) 原因：イソプロパノール添加後の遠心スピードが低すぎる
- B) 原因：血液あるいはバッフィーコートサンプルの白血球細胞数が非常に低い

**解決法：**DNA のペレット化のためにプロトコールにある遠心スピードを用いる。

**解決法：**上記の”イソプロパノールの添加後、DNA 沈殿物が観察できない”パートBを参照。

**DNA ペレットがゼリー状の粘性を持つ**

**原因：**DNA ペレットとイソプロパノールとのミックスが不完全

**解決法：**添加した量と同量のイソプロパノールを添加し、DNA 沈殿が完了するまでボルテックスする。DNA をペレット化するために、遠心ステップを繰り返す。

**DNA ペレットが消失**

**原因：**アルコール沈殿ステップでの遠心スピードが低すぎる、あるいは遠心時間が短すぎるために、ペレットがルーズ

**解決法：**プロトコールにある遠心条件を用いる。DNA ペレットがチューブ壁から剥がれる、あるいは見えない場合には再度遠心操作を行い、ピペットを用いて、チューブから上清を注意深く吸引除去する。

**DNA が乾燥しすぎている**

**原因：**70 %エタノールの除去後、DNA ペレットの乾燥しすぎ

**解決法：**乾燥しすぎたゲノムDNA の溶解は困難である。DNA を再懸濁させる時間を2 時間に延長し、その後溶液を室温で振盪 インキュベーター上に一晩、放置する。

**アガロースゲル電気泳動でDNA が観察されない**

**原因：**スタートサンプル中の白血球細胞数が非常に少ないためにDNA 収量が低い

**解決法：**可能な場合は、ゲルにロードする精製DNA の量を増やす、あるいはスタートサンプルの量を増やして精製操作をもう一度行う。操作の最後で、DNA を少量のBuffer FG3 に溶解させるが、この場合インキュベーション時間を増やす。

**DNA 純度が低いかつ／または長さが短い**

**DNA ペレットがベージュ色をしている**

A) **原因：**Buffer FG2/QIAGEN Protease 中にペレットを再懸濁した後、ゼリー状のペレット残留物が見られる

**解決法：**完全にホモジナイゼーションを行うためには、ボルテックスを迅速に行うことが重要である。ボルテックスを行う前に、チューブを1 分以上放置しない。ゼリー状の粘度を持つペレット（かろうじて見える）が残留していることがある。この場合には、プロトコルに記載されている量のBuffer FG2 を添加してもう一度ボルテックスを行う。ペレットが存在するにもかかわらず、ダウンストリームのPCR でこのDNA を用いて、うまくいかないことがある。PCR が失敗した場合には、このステップでペレットが迅速にBuffer FG2/QIAGEN Protease 中でボルテックスしたことを確認して、新しいサンプルで操作を繰り返す。

B) **原因：**プロテアーゼ分解が不完全な結果、DNA 純度が低下

**解決法：**説明書にしたがってQIAGEN Protease を調製し、保存したことを確認する。Buffer FG2/QIAGEN Protease 混合物の調製は使用前1 時間以内に行う。

精製したDNAの $A_{260}/A_{280}$ 比が

1.65より低い

原因：プロテアーゼ活性低下によりDNA純度が低下した

解決法：説明書にしたがってQIAGEN Proteaseが再構成され、保存されていることを確認する。Buffer FG2/QIAGEN Protease ミックスチャーの調製は使用前1時間以内に行う。

アガロースゲル電気泳動により測定した精製DNAの長さが20 kbより短い

原因：血液サンプルの保存中にDNAが分解した

解決法：分子量の大きいDNAが必要な場合には、アポトーシスによるDNA分解を避けるため血液を2～8℃で3～4日以上保存しない。長期保存には-70℃でサンプルを保存することを推奨する。

精製DNAが次の酵素アプリケーションでうまくいかない

最終DNA溶液にエタノールがコンタミ

原因：エタノールをすべて蒸発させる前にBuffer FG3を添加した

解決法：チューブの縁やサイドからのエタノールの逆流を最低限に抑えるために、チューブを転倒させて清潔な吸収紙の上に5分間放置する。

次のアプリケーションで用いるDNAの量を間違えた、あるいはアプリケーション条件が変化した

A) 原因：次の反応で用いたDNAの量が多すぎた

解決法：増幅反応は過剰なDNAにより阻害されることがある。用いるDNA量を減らす。PCRには、一般的には20～50 ngで十分である。

B) 原因：次の反応で用いたDNAの量が多すぎた

解決法：スタートサンプル中の白血球細胞数が少ないと、精製DNAの収量は減少する。次の反応に添加するDNAの量を増やす。

C) 原因：増幅反応のセットアップが変更されている

解決法：増幅反応条件をもう一度至適化する。



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)

[www.qiagen.co.jp](http://www.qiagen.co.jp)

