

Gentra® Puregene®

プロトコールとトラブルシューティング

下記サンプルから長期保存に安定なゲノム DNA の精製：

ヒト全血

骨髄液

バフィコート

口腔細胞

体液

培養細胞

組織

マウス尾

酵母

バクテリア



目次

プロトコール

全血あるいは骨髓液からの DNA 精製 (Gentra Puregene Blood Kit を使用)	3
全血からの DNA 精製 (Enhanced Productivity プロトコール、Gentra Puregene Blood Kit を使用)	6
最適な条件で保存されていなかった血液からの DNA 精製 (Gentra Puregene Blood Kit を使用)	8
パフィコートからの DNA 精製 (Gentra Puregene Blood Kit を使用)	10
口腔粘膜細胞採取ブラシからの DNA 精製 (Gentra Puregene Buccal Cell Kit を使用)	12
口腔洗浄液中の口腔細胞からの DNA 精製 (Gentra Puregene Buccal Cell Kit を使用)	14
体液からの DNA 精製 (Gentra Puregene Blood Kit を使用)	16
培養細胞からの DNA 精製 (Gentra Puregene Cell Kit を使用)	18
固定された $1 \sim 2 \times 10^6$ 個の細胞からの DNA 精製 (Gentra Puregene Tissue Kit 使用)	21
組織からの DNA 精製 (Gentra Puregene Tissue Kit 使用)	23
固定組織からの DNA 精製 (Gentra Puregene Tissue Kit 使用)	25
FFPE 組織からの DNA 精製 (Gentra Puregene Tissue Kit 使用)	27
マウス尾組織からの DNA 精製 (Gentra Puregene Mouse Tail Kit 使用)	30
酵母からの DNA 精製 (Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit 使用) キット	32
グラム陰性菌からの DNA 精製 (Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit 使用)	34
グラム陽性菌からの DNA 精製 (Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit 使用)	36
トラブルシューティング	38
Appendix A : ウイルス DNA 精製用プロトコール	44
Appendix B : DNA の濃度・収量・純度・長さの測定	45
Appendix C : DNA サンプルの再精製	46
Appendix D : 精製した DNA サンプルからの RNA 除去	48
Appendix E : DNA の濃縮	49

プロトコール：全血あるいは骨髄液からの DNA 精製 (Genra Puregene Blood Kit を使用)

本プロトコールは、Genra Puregene Blood Kit を用いて、300 μ l、3 ml、10 ml の全血（新鮮あるいは凍結）からゲノム DNA を精製します。本プロトコールは血液細胞ペレット、バフィコート、骨髄液からの DNA 精製にも使用できます。

実験を始める前の重要事項

- 操作手順のステップにおいて、次の 3 種類の値から検体量にあったものを選択してください；血液検体の量が 300 μ l の場合は■、3 ml の場合は▲、10 ml の場合は●。
- 血液細胞ペレットあるいはバフィコートサンプルを処理する場合には、最初の血液検体量に対応する試薬量を用いてください（例；10 ml の全血から 1 ml のバフィコートを調製した場合には、10 ml の血液検体に使用する試薬量を使用する）。
- 骨髄液検体は全血検体より白血球細胞をより多く含有していることがあります。Cell Lysis Solution の添加後、溶液が均一であることを確認してください。溶液が均一でない場合には、追加の Cell Lysis Solution を添加し、使用する他の試薬量もプロトコールに従って調節します。
- 凍結した血液および骨髄検体は 37°C のウォーターバスで軽く攪拌しながら急速に解凍し、使用直前まで氷上に保存してください。

実験開始前の準備事項

- ステップ 19 で使用するためにウォーターバスを予め 65°C に加熱します。
- オプション：ステップ 8 で使用するためにウォーターバスを予め 37°C に加熱します。

操作手順

1. ■ 900 μ l / ▲ 9 ml / ● 30 ml の RBC Lysis Solution を、■ 1.5 ml マイクロ遠心チューブ / ▲ 15 ml 遠心チューブ / ● 50 ml 遠心チューブに分注する。
2. ■ 300 μ l / ▲ 3 ml / ● 10 ml の全血あるいは骨髄液を添加し、チューブを 10 回転倒させて混和する。
3. 室温（15 ~ 25°C）で ■ 1 分間 / ▲ 5 分間 / ● 5 分間 インキュベートする。インキュベーション中に少なくとも一回はチューブを転倒させて混和する。
■ プロトコール開始前 1 時間以内に採血した新鮮血は、インキュベーション時間を 3 分間にして、赤血球を完全に溶血させます。
4. ■ 13,000 ~ 16,000 \times g で 20 秒 / ▲ 2,000 \times g で 2 分間 / ● 2,000 \times g で 2 分間遠心操作し、白血球細胞をペレット化する。

5. 白血球細胞ペレットと■約 10 μ l / ▲約 200 μ l / ●約 200 μ l の溶液を残し、上清をピペットあるいは傾けて注意深く除去する。
6. チューブを激しくボルテックスし、ペレットを残液中で再懸濁する。
ボルテックスにより、次のステップの細胞溶解が容易に行なえます。
ボルテックスの後、ペレットが完全に溶解したことを確認します。
7. ■ 300 μ l / ▲ 3 ml / ● 10 ml の Cell Lysis Solution を添加し、ピペットを用いて吸排出を行なうか、10 秒間激しくボルテックスして、細胞を溶解する。
混和後に細胞塊が見える場合は、溶液が均質になるまで、37°C または室温でインキュベートする。
Cell Lysis Solution で溶解したサンプルは室温で少なくとも 2 年間は安定です。
8. オプション：RNA フリーの DNA が必要な場合は、■ 1.5 μ l、▲ 15 μ l、● 50 μ l の RNase A Solution を添加し、25 回チューブを転倒して混和する。サンプルを 37°C で 15 分間インキュベートする。その後、急速に冷却するために氷上で■ 1 分間 / ▲ 3 分間 / ● 3 分間インキュベートする。
9. ■ 100 μ l / ▲ 1 ml / ● 3.33 ml の Protein Precipitation Solution を添加し、高速で 20 秒間激しくボルテックスする。
10. ■ 13,000 ~ 16,000 \times g で 1 分間 / ▲ 2,000 \times g で 5 分間 / ● 2,000 \times g で 5 分間遠心操作する。
沈殿したタンパク質は暗褐色の固いペレットになります。タンパク質ペレットがよく固まっていない場合は、5 分間氷冷した後、遠心操作を繰り返します。
11. ■ 300 μ l のイソプロパノールを新しい 1.5 ml チューブ / ▲ 3 ml のイソプロパノールを新しい 15 ml チューブ / ● 10 ml のイソプロパノールを新しい 50 ml チューブにピペットで入れ、前ステップからの上清を静かに添加する。
添加中にタンパク質ペレットが剥がれないように注意します。
12. DNA が糸状あるいは塊状として観察されるまで、チューブを 50 回、穏やかに転倒して混和する。
13. ■ 13,000 ~ 16,000 \times g で 1 分間 / ▲ 2,000 \times g で 3 分間 / ● 2,000 \times g で 3 分間遠心操作する。
DNA は白い小さなペレットとして観察されます。
14. 注意深く上清を除去し、清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。
15. ■ 300 μ l / ▲ 3 ml / ● 10 ml の 70% エタノールを添加し、チューブを数回転倒させて DNA ペレットを洗浄する。
16. ■ 13,000 ~ 16,000 \times g で 1 分間 / ▲ 2,000 \times g で 1 分間 / ● 2,000 \times g で 1 分間遠心操作する。

17. 遠心上清を静かに取り除く。清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。ペレットを ■ 5分 / ▲ 5 ~ 10分 / ● 5 ~ 10分間空気乾燥する。

ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。

DNA の溶解が難しくなるので、DNA ペレットを過剰に乾燥させることは避けてください。

18. ■ 100 μ l / ▲ 300 μ l / ● 1 ml の DNA Hydration Solution を添加し、中程度の速度で 5 秒間ボルテックスする。
19. 65°C で ■ 5 分間 / ▲ 1 時間 / ● 1 時間インキュベートして、DNA を溶解する。
20. 静かに攪拌しながら室温 (15 ~ 25°C) で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。その後、サンプルをスピンドウンし、保存用チューブに移す。

プロトコール：全血からの DNA 精製 (Enhanced Productivity プロトコール、Genra Puregene Blood Kit を使用)

本プロトコールは、Genra Puregene Blood Kit を用いて 10 ml の全血から試薬の分注順序の変更やインキュベーション時間、遠心時間の最適化により、効果的にゲノム DNA を精製するためのものです。

本プロトコールはサンプル量に比例してスケールアップすることが可能です。詳細は弊社テクニカルサポートにお問い合わせになるか、www.qiagen.co.jp をご覧ください。

実験を始める前の重要事項

- Enhanced Productivity プロトコールのためのサンプル処理およびハイスループトット処理に関しては、それぞれ英語版 Handbook 17 ページまたは 14 ページをご覧ください。

実験開始前の準備事項

- ステップ 16 で使用するためにウォーターバスを予め 65℃ に加熱します。
- 凍結血液検体は 37℃ のウォーターバスで軽く攪拌しながら急速に解凍し、使用直前まで氷上に保存してください。

操作手順

1. 50 ml 遠心チューブに 30 ml の RBC Lysis Solution を添加する。10 ml の全血を添加して転倒混和する。
2. 室温 (15 ~ 25℃) で 5 分間インキュベートする。インキュベーション中に 3 回、静かに転倒混和する。
3. 2,000 x g で 2 分間の遠心分離を行ない、白血球細胞を沈殿させる。
4. ペレットと 200 μ l 未満の溶液を残し、上清を注意深く除去する。
5. チューブを 10 秒間激しくボルテックスし、ペレットを残液中で再懸濁する。ボルテックスにより、次のステップの細胞溶解が容易に行なえます。ボルテックスの後、ペレットが完全に溶解したことを確認します。
6. サンプルの中央に、Protein Precipitation Solution 3.33 ml を加える。10 ml の Cell Lysis Solution を添加し、20 秒間激しくボルテックスして、細胞の溶解とタンパク質を沈殿させる。
7. 2,000 x g で 6 分間遠心操作する。
沈殿したタンパク質は暗褐色の固いペレットになります。タンパク質ペレットがよく固まっていない場合は、5 分間氷冷した後、遠心操作を繰り返します。

8. 10 ml のイソプロパノールを新しい 50 ml 遠心チューブにピペットで入れて、前ステップからの上清を注意深く傾けて添加する。
添加中にタンパク質ペレットが剥がれないように注意します。
9. チューブを静かに 50 回転倒混和する。
10. 2,000 x g で 3 分間遠心操作する。
DNA は白い小さなペレットとして確認できます。
11. 注意深く上清を除去する。清潔なる紙上にチューブを逆さに 1 分間置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。
12. 10 ml の 70%エタノールを添加する。
13. 2,000 x g で 1 分間遠心操作する。
14. 上清を静かに取り除く。清潔なる紙上にチューブを逆さに 5 分間置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。
ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。DNA の溶解が難しくなるので、DNA ペレットを過剰に乾燥させることは避けてください。
15. 1 ml の DNA Hydration Solution を添加し、中程度の速度で 5 秒間ボルテックスして混和する。
16. 65°C で 1 時間インキュベートして DNA を溶解する。
17. 静かに攪拌しながら室温 (15 ~ 25°C) で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。その後、サンプルをスピンドウンし、保存用チューブに移す。

プロトコール：最適な条件で保存されていなかった血液からの DNA 精製(Gentra Puregene Blood Kit を使用)

本プロトコールは、Gentra Puregene Blood Kit を用いて 10 ml の最適な条件で保存されていなかった全血からゲノム DNA を精製します。室温 (15 ~ 25℃) で 24 時間以上、2 ~ 8℃ で 5 日間以上保存されたサンプルあるいは -20℃ で保存した血液サンプルを最適に保存されていなかったサンプルとみなします。

実験開始前の準備事項

- ステップ 7 および 19 で使用するためにウォーターバスを予め 37℃ および 65℃ に加熱します。
- 凍結血液検体は 37℃ のウォーターバスで軽く攪拌しながら急速に解凍し、使用直前まで氷上に保存してください。

操作手順

1. 50 ml 遠心チューブに 30 ml の RBC Lysis Solution を添加する。10 ml の全血あるいは骨髄液を添加して転倒混和する。
2. 室温 (15 ~ 25℃) で 5 分間インキュベートする。インキュベーション中に少なくとも一回はチューブを転倒させて混和する。
3. 2,000 x g で 5 分間遠心操作する。
4. 上清をピペットで注意深く除去し、チューブ内の茶色のペレットと約 3.5 ml の上清を残す。
5. チューブを激しくボルテックスし、ペレットを残液中で再懸濁する。
ボルテックスにより、次のステップの細胞溶解が容易に行なえます。
ボルテックスの後、ペレットが完全に溶解したことを確認します。
6. 10 ml の Cell Lysis Solution を添加し、10 秒間激しくボルテックスして、細胞を溶解する。
7. 37℃ で少なくとも 2 時間インキュベートする。
溶液が均質になるまで、室温で更に一晩インキュベートすることも可能です。
注：37℃ では一晩インキュベートしないでください。
8. オプション：RNA フリーの DNA が必要な場合は、50 µl の RNase A Solution を添加し、チューブを 25 回転倒して混和する。37℃ で 15 分間インキュベートし、その後、氷上で 5 分間インキュベートして、サンプルを急速に冷却する。
9. 4.5 ml の Protein Precipitation Solution を添加し、最高速度で 20 秒間激しくボルテックスする。
10. 2,000 x g で 10 分間遠心操作する。
沈殿したタンパク質は暗褐色の固いペレットになります。タンパク質ペレットがよく固まっていない場合は、5 分間氷冷した後、遠心操作を繰り返します。

11. 13.5 ml のイソプロパノールを新しい 50 ml 遠心チューブにピペットで入れる。135 μ l の **Glycogen Solution** (Cat. no. 158930) を添加する。前ステップの上清を静かに重層する。
添加中にタンパク質ペレットが剥がれないように注意します。
12. チューブを静かに 50 回転倒混和する。
13. 2,000 \times g で 3 分間遠心操作する。
DNA は白い小さなペレットとして確認できます。
ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。
14. 注意深く上清を除去し、清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。
15. 70%エタノール 10 ml を添加し、チューブを数回転倒させて DNA ペレットを洗浄する。
16. 2,000 \times g で 1 分間遠心操作する。
17. 上清を静かに取り除く。清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。5 ~ 10 分間風乾する。
ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。DNA の溶解が難しくなるので、DNA ペレットを過剰に乾燥させることは避けてください。
18. 500 μ l の **DNA Hydration Solution** を添加し、中程度の速度で 5 秒間ボルテックスして、混和する。
19. 65°C で 1 時間インキュベートして DNA を溶解する。
20. 静かに攪拌しながら室温 (15 ~ 25°C) で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。その後、サンプルをスピンドウンし、保存用チューブに移す。

プロトコール：バフィコートからの DNA 精製 (Gentra Puregene Blood Kit を使用)

本プロトコールは、Gentra Puregene Blood Kit を用いてバフィコート（3 ml の全血から調製）からゲノム DNA を精製します。

実験開始前の準備事項

- ステップ 19 で使用するためにウォーターバスを予め 65℃ に加熱します。
- バフィコートは全血の白血球濃縮分画です。全血からのバフィコート分画の調製は容易です。この分画からの DNA 収量は、等量の全血から得られる DNA 収量の 5 ～ 10 倍になります。全血を室温（15 ～ 25℃）、2,500 x g で 10 分間遠心操作して、バフィコートを調製します。遠心操作後、次の 3 層に分画されます：上層は血漿、中間層は高濃度の白血球を含むバフィコート、下層が高濃度の赤血球です。
- 凍結したバフィコートは 37℃ のウォーターバスで軽く攪拌しながら急速に解凍した後、操作を始めるまで氷上で保存してください。
- オプション：ステップ 8 で使用するためにウォーターバスを予め 37℃ に加熱します。

操作手順

1. 調製したバフィコートに赤血球が含まれている場合は、ステップ 2 に進む。あるいは 3 ml の Cell Lysis Solution を 15 ml の遠心チューブにピペットで入れ、150 ～ 250 μ l のサンプルを添加し、ステップ 8 に進む。
2. 15 ml の遠心チューブに 3 倍容量の RBC Lysis Solution を入れる（例；250 μ l のバフィコートを調製する場合には、750 μ l の RBC Lysis Solution を入れる）。150 ～ 250 μ l のバフィコート調製液を入れる。
3. 転倒混和し、室温で 10 分間インキュベートする。インキュベーション中に少なくとも一回はチューブを転倒させて混和する。
4. 2,000 x g で 5 分間遠心操作する。
5. ペレットと約 100 ～ 200 μ l の溶液を残して、上清をピペティングあるいは注意深く傾けて取り除く。
6. チューブを激しくボルテックスし、ペレットを残液中で再懸濁する。ボルテックスにより、次のステップの細胞溶解が容易に行なえます。ボルテックスの後、ペレットが完全に溶解したことを確認します。

7. **3 ml の Cell Lysis Solution** を加え、ピペットで吸排出あるいは激しくボルテックスして細胞を溶解する。

混和後に細胞塊が見える場合は、溶液が均質になるまで、37℃または室温でインキュベートする。

Cell Lysis Solution で溶解したサンプルは室温で少なくとも 2 年間は安定です。
8. オプション：RNA フリーの DNA が必要な場合は、**15 µl の RNase A Solution** を添加し、チューブを **25 回転倒**して混和する。**37℃**で **15 分間**インキュベートし、その後、氷上で **3 分間**インキュベートして、サンプルを急速に冷却する。
9. **1 ml の Protein Precipitation Solution** を添加し、最高速度で **20 秒間**激しくボルテックスする。
10. **2,000 x g**で **5 分間**遠心操作する。

沈殿したタンパク質は白あるいは茶色の固いペレットになります。タンパク質ペレットがよく固まっていない場合は、5 分間氷冷した後、遠心操作を繰り返します。
11. **3 ml の イソプロパノール**を新しい **15 ml 遠心チューブ**にピペットで入れて、前ステップからの上清を注意深く傾けて添加する。

添加中にタンパク質ペレットが剥がれないように注意します。
12. チューブを静かに **50 回転倒**混和する。
13. **2,000 x g**で **3 分間**遠心操作する。

DNA は白い小さなペレットとして確認できます。
14. 注意深く上清を除去し、清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。
15. **70%エタノール 3 ml**を添加し、チューブを数回転倒させて **DNA ペレット**を洗浄する。
16. **2,000 x g**で **1 分間**遠心操作する。
17. 上清を静かに取り除く。清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。**5 ~ 10 分間**風乾させる。

ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。DNA の溶解が難しくなるので、DNA ペレットを過剰に乾燥させることは避けてください。
18. **300 µl の DNA Hydration Solution**を入れて、中程度の速度で **5 秒間**ボルテックスして、混和する。
19. **65℃**で **1 時間**インキュベートして **DNA**を溶解する。
20. 静かに攪拌しながら室温 (**15 ~ 25℃**) で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。その後、サンプルをスピンドウンし、保存用チューブに移す。

プロトコール：口腔粘膜細胞採取ブラシからの DNA 精製 (Genra Puregene Buccal Cell Kit を使用)

本プロトコールは、Genra Puregene Buccal Cell Kit を用いて口腔粘膜細胞採取ブラシ 1 本からのゲノム DNA 精製が可能です。

実験開始前の準備事項

- ステップ 3b で使用するために 55°C、そしてステップ 3a および 17 で使用するために 65°C にウォーターバスを予め加熱します。
- オプション：ステップ 5 で使用するためにウォーターバスを予め 37°C に加熱します。

操作手順

1. **口腔粘膜細胞採取ブラシで口の内側を 10 回こすり、口腔細胞を採取する。**
最適な結果を得るために、飲食後 1 時間以上おいて口腔細胞を回収してください。
DNA 精製をすぐに行なうことも、また採取したブラシを室温 (15 ~ 25°C) で最高 1 ヶ月間保存することも可能です。
2. **1.5 ml マイクロ遠心チューブに 300 µl の Cell Lysis Solution を添加する。滅菌済みのハサミかカミソリの刃で採取ブラシ部分を柄から切り取り、切り取ったヘッド部分をチューブに浸す。**
Cell Lysis Solution で溶解したサンプルは室温で少なくとも 2 年間は安定です。
300 µl の Cell Lysis Solution ではヘッド部分が完全に浸潤しない場合は、プロトコールで使用する容量を適宜スケールアップします。詳細は弊社テクニカルサポートにお問い合わせになるか、www.qiagen.co.jp をご覧ください。
3. **ステップ 3a あるいは 3b に従って細胞を完全に溶解する。**
 - 3a. **65°C で最低 15 分間インキュベートする (収量を最大にしたい場合には 60 分まで延長)。**
 - 3b. **収量を最大にしたい場合は、1.5 µl の Puregene Proteinase K (Cat. no. 158918) を添加し、チューブを 25 回転倒混和し、55°C で少なくとも 1 時間インキュベートする (一晚インキュベートすると収量は最大になる)。**
4. **Cell Lysis Solution から採取ブラシのヘッド部分を取り出し、チューブの側面にこすりつけ、できるだけ大量の液体を回収する。**
5. **オプション：RNA フリーの DNA が必要な場合は、1.5 µl の RNase A Solution を添加し、チューブを 25 回転倒して混和する。37°C で 15 分間インキュベートし、その後、氷上で 1 分間インキュベートして、サンプルを急速に冷却する。サンプルは 37°C で最高 1 時間までインキュベート可能です。**
6. **100 µl の Protein Precipitation Solution を添加し、高速で 20 秒間激しくボルテックスする。**

7. 氷上で 5 分間インキュベートする。
8. **13,000 ~ 16,000 x g** で 3 分間遠心操作する。
沈殿したタンパク質は固いペレットとなります。タンパク質ペレットがよく固まっていない場合は、5 分間氷冷した後、遠心操作を繰り返します。
9. **300 μ l** のイソプロパノールと **0.5 μ l** の **Glycogen Solution (Cat. no. 158930)** を新しい **1.5 ml** マイクロ遠心チューブにピペットで入れて、前ステップからの上清を注意深く重層する。
添加中にタンパク質ペレットが剥がれないように注意します。
10. チューブを静かに **50** 回転倒混和する。
11. **13,000 ~ 16,000 x g** で 5 分間遠心操作する。
12. 注意深く上清を除去し、清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。
13. **300 μ l** の **70%** エタノールを添加し、チューブを数回転倒させて **DNA** ペレットを洗浄する。
14. **13,000 ~ 16,000 x g** で 1 分間遠心操作する。
15. 上清を静かに取り除く。清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。**5 分間** 風乾させる。
ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。DNA の溶解が難しくなるので、DNA ペレットを過剰に乾燥させることは避けてください。
16. **100 μ l** の **DNA Hydration Solution** を添加し、中程度の速度で **5 秒間** ボルテックスし混和する。
17. **65°C** で **1 時間** インキュベートして **DNA** を溶解する。
18. 静かに攪拌しながら室温 (**15 ~ 25°C**) で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。その後、サンプルをスピンドウンし、保存用チューブに移す。

プロトコール：口腔洗浄液中の口腔細胞からの DNA 精製 (Genra Puregene Buccal Cell Kit を使用)

本プロトコールは、Genra Puregene Buccal Cell Kit を用いて 10 ml の口腔洗浄液中の口腔細胞からゲノム DNA を精製できます。

実験開始前の準備事項

- ステップ 22 で使用するためにウォーターバスを予め 65℃ に加熱します。

操作手順

1. 10 ml の Original Mint Scope® Mouthwash (Procter & Gamble) あるいは Listerine® mouthwash (McNEIL-PPC, Inc) を 50 ml 遠心チューブに分注する。
2. 口腔洗浄液で口腔内を洗浄し、50 ml チューブに吐き出し、口腔細胞を回収する。最適な結果を得るために、飲食後 1 時間以上おいて口腔細胞を回収してください。
サンプルは室温 (15 ~ 25℃) で最高 7 日間まで保存可能です。
3. 2,000 x g で 5 分間遠心操作して、細胞をペレット化する。
細胞ペレットがよく固まっていない場合は、遠心操作を繰り返します。
4. ピペティングあるいは注意深く傾けて上清を除去し、ペレットを残す。
5. 1 ml の Cell Lysis Solution を添加し、チューブを 50 回転倒して混和する。
6. 室温で 15 分間インキュベートする。
7. 10 µl の Puregene Proteinase K (Cat. no. 158918) を添加し、3 回転倒混和する。
8. 高速で 20 秒間激しくボルテックスする。
9. 室温で 10 分間インキュベートする。
10. 340 µl の Protein Precipitation Solution を添加し、高速で 20 秒間激しくボルテックスする。
11. 氷上で 10 分間インキュベートする。
氷上でインキュベートすることにより、次のステップで固いペレットを得ることができます。
12. 2,000 x g で 10 分間遠心操作する。
沈殿したタンパク質は、固い緑色のペレットになります。タンパク質ペレットがよく固まっていない場合は、5 分間氷冷した後、遠心操作を繰り返します。
13. 1 ml のイソプロパノールと 2 µl の Glycogen Solution を新しい 15 ml または 50 ml の遠心チューブにピペットで入れる。

14. あらかじめイソプロパノールと **Glycogen Solution** を入れた遠心チューブに、沈殿したタンパク質ペレットが混入しないように **DNA** を含む上清を加える。上清を移す間ペレットがしっかりチューブ内に固定されるように、サンプルを氷上に置いておく。

添加中にタンパク質ペレットが剥がれないように注意します。

氷上でインキュベートすることにより、固いペレットを得ることができます。

15. チューブを静かに **50** 回転倒混和する。
16. **2,000 x g** で **5** 分間遠心操作する。
17. 注意深く上清を除去し、清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。
18. **70%**エタノール **1 ml** を添加し、チューブを数回転倒させて **DNA** ペレットを洗浄する。
19. **2,000 x g** で **1** 分間遠心操作する。
20. 上清を静かに取り除く。清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。**5 ~ 10** 分間風乾する。

ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。DNA の溶解が難しくなるので、DNA ペレットを過剰に乾燥させることは避けてください。
21. **400 μ l** の **DNA Hydration Solution** を入れて、中程度の速度で **5** 秒間ボルテックスし、混和する。
22. **65°C** で **1** 時間インキュベートして **DNA** を溶解する。
23. 静かに攪拌しながら室温 (**15 ~ 25°C**) で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。その後、サンプルをスピンドウンし、保存用チューブに移す。

プロトコール：体液からの DNA 精製 (Genra Puregene Blood Kit を使用)

本プロトコールは、Genra Puregene Blood Kit を用いて 50 μ l あるいは 1 ml の体液（例；CSF、血漿、唾液、血清、喀痰、滑液、尿、全血、乳）からゲノム DNA を精製します。

実験を始める前の重要事項

- 操作手順のいくつかのステップでは、次の 2 種類の値から検体量にあったものを選択してください；タンパク質含有量の低い体液検体 50 μ l あるいはタンパク質含有量の高い体液検体 25 μ l の場合は■を、タンパク質含有量の低い体液検体 1 ml あるいはタンパク質含有量の高い体液検体 0.5 ml の場合は▲。

実験開始前の準備事項

- ステップ 2b で使用するために 55°C、そしてステップ 2a および 17 で使用するために 65°C にウォーターバスを予め加熱します。
- 細胞数が少ない体液は、遠心によるサンプル濃縮が必要なことがあります。3 ~ 40 ml の体液を 2,000 x g で 10 分間遠心操作して、細胞を回収します。必要な量の上清だけを残し、上清を除去します。ピペットを用いてペレットを溶液中で 10 回吸排出し、完全に懸濁します。サンプルを氷上に置いてすぐ使用するか、-80°C で凍結保存します。
- 凍結した体液サンプルは 37°C のウォーターバスで軽く攪拌しながら急速に解凍した後、操作を始めるまで氷上で保存してください。
- オプション：ステップ 3 で使用するためにウォーターバスを予め 37°C に加熱します。

操作手順

1. 通常のタンパク質量を含有するサンプルではステップ 1a に進む。多量のタンパク質を含有するサンプルではステップ 1b に進む。
 - 1a. ■滅菌済みの 1.5 ml マイクロ遠心チューブに 250 μ l の Cell Lysis Solution / ▲ 15 ml の遠心チューブに 5 ml の Cell Lysis Solution を入れる。■ 50 μ l / ▲ 1 ml の体液を入れて、ピペットを用いて溶液を吸排出して混和する。
 - 1b. ■滅菌済みの 1.5 ml マイクロ遠心チューブに 275 μ l の Cell Lysis Solution / ▲ 15 ml の遠心チューブに 5.5 ml の Cell Lysis Solution を入れる。■ 25 μ l / ▲ 0.5 ml の体液を入れて、ピペットを用いて溶液を吸排出して混和する。
2. ステップ 2a あるいは 2b に従って細胞を完全に溶解する：
 - 2a. 65°C で 15 分間インキュベートする。
 - 2b. 収量を最大にするためには、■ 1.5 μ l / ▲ 30 μ l の Puregene Proteinase K (Cat. no. 158918) を加え、チューブを 25 回転倒混和し、55°C で 1 時間～一晩インキュベートする。

3. オプション：RNA フリーの DNA が必要な場合には、■ 1.5 μl / ▲ 30 μl の RNase A Solution を添加し、25 回転倒混和する。37°C で 15 分間インキュベートし、その後、氷上で■ 1 分間 / ▲ 3 分間インキュベートして、サンプルを急速に冷却する。

サンプルは 37°C で最高 1 時間までインキュベート可能です。

4. ■ 100 μl / ▲ 2 ml の Protein Precipitation Solution を入れて、最高速度で 20 秒間激しくボルテックスする。
5. 氷上で 5 分間インキュベートする。
6. ■ 13,000 ~ 16,000 $\times g$ で 3 分間 / ▲ 2,000 $\times g$ で 10 分間遠心操作する。
沈殿したタンパク質は固いペレットとなります。タンパク質ペレットがよく固まっていない場合は、5 分間氷冷した後、遠心操作を繰り返します。
7. ■ 300 μl のイソプロパノールを新しい 1.5 ml チューブ / ▲ 6 ml のイソプロパノールを新しい 15 ml チューブにピペットで入れ、前ステップの上清を静かに添加する。
添加中にタンパク質ペレットが剥がれないように注意します。
8. DNA の収量が少ないと予想される場合 (■ <1 μg / ▲ <10 μg) は、■ 0.5 μl / ▲ 10 μl の Glycogen Solution (Cat. no. 158930) を加える。
9. チューブを静かに 50 回転倒混和する。
10. 室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートする。
11. ■ 13,000 ~ 16,000 $\times g$ で 5 分間 / ▲ 2,000 $\times g$ で 10 分間遠心操作する。
12. 注意深く上清を除去し、清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。
13. ■ 300 μl / ▲ 6 ml の 70% エタノールを添加し、数回転倒させて DNA ペレットを洗浄する。
14. ■ 13,000 ~ 16,000 $\times g$ で 1 分間 / ▲ 2,000 $\times g$ で 1 分間遠心操作する。
15. 上清を静かに取り除く。清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。■ 5 分間 / ▲ 5 ~ 10 分間風乾させる。
ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。DNA の溶解が難しくなるので、DNA ペレットを過剰に乾燥させることは避けてください。
16. ■ 100 μl / ▲ 200 μl の DNA Hydration Solution を添加し、ミディアムスピードで 5 秒間ボルテックスして混和する。
17. 65°C で 1 時間インキュベートして DNA を溶解する。
18. 静かに攪拌しながら室温 (15 ~ 25°C) で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。その後、サンプルをスピンドウンし、保存用チューブに移す。

プロトコール：培養細胞からの DNA 精製 (Gentra Puregene Cell Kit を使用)

本プロトコールは、Gentra Puregene Cell Kit を用いて $1 \sim 2 \times 10^6$ 個あるいは $1 \sim 2 \times 10^7$ 個の培養細胞からゲノム DNA を精製可能です。

実験を始める前の重要事項

操作手順のいくつかのステップでは、次の 2 種類の値から検体量にあったものを選択してください； $1 \sim 2 \times 10^6$ 個の細胞では■、 $1 \sim 2 \times 10^7$ 個の細胞では▲。

実験開始前の準備事項

- ステップ 18 で使用するためにウォーターバスを予め 65°C に加熱します。
- 新鮮あるいは凍結した培養細胞を使用できます。懸濁した培養細胞を回収し、使用直前まで氷上で保存します。血球計算版あるいは細胞計測器を用いて細胞数を決めます。最高 2×10^7 個の細胞が含まれるように調整した $200 \mu\text{l}$ の細胞懸濁液を本プロトコールで使用できます。
- 細胞数が少ない細胞培養液は、遠心操作によるサンプルの濃縮が必要になることがあります。 1.5 ml のマイクロ遠心チューブを用いて $13,000 \sim 16,000 \times g$ で 5 秒間遠心操作し、細胞をペレット化します。 $200 \mu\text{l}$ の溶液を残して上清を取り除きます。ピペットを用いてペレットを溶液中で 10 回吸排出し、完全に懸濁します。サンプルを氷上に置いてすぐ使用するか、 -80°C で凍結保存します。
- 凍結した細胞は 37°C のウォーターバスで軽く攪拌しながら急速に解凍した後、操作を始めるまで氷上で保存してください。
- オプション：ステップ 7 で使用するためにウォーターバスを予め 37°C に加熱します。

操作手順

1. ステップ 1a (浮遊細胞) あるいは 1b (単層培養細胞) に従って細胞を回収する。
 - 1a. 浮遊細胞 (細胞は 2×10^7 個以上使用しない)：細胞数を数え、使用量を決定する。適切な数の細胞をマイクロ遠心チューブ (1.5 ml) に採り、 $300 \times g$ で 5 分間遠心操作を行なう。 $200 \mu\text{l}$ の溶液を残して上清を取り除く。ピペットを用いてペレットを溶液中で吸排出し、細胞が再懸濁するまで完全に懸濁する。ステップ 2 に進む。
 - 1b. 単層培養細胞 (細胞は 2×10^7 個以上使用しない)：培養フラスコの単層培養細胞は、トリプシン処理を行なうかセルスクレイパーを用いて容器から剥離する。

細胞のトリプシン処理：

細胞数を数え、使用量を決定する。培養液を吸引除去し、平衡塩類溶液で細胞を洗浄する。平衡塩類溶液を吸引除去し、0.10～0.25%のトリプシン*を加える。

ディッシュあるいはフラスコから細胞を剥離後、培養液*中に細胞を回収し、適切な数の細胞（最高 2×10^7 個）を 1.5 ml のマイクロ遠心チューブに入れる。300 x g で 5 分間遠心操作する。200 μ l の溶液を残して上清を取り除く。ピペットを用いてペレットを溶液中で吸排出し、細胞が再懸濁するまで完全に懸濁する。ステップ 2 に進む。

セルスクレイパーを使用する方法：

ディッシュあるいはフラスコから細胞を剥離する。適切な数の細胞（最大 2×10^7 個）をマイクロ遠心チューブ（1.5 ml）に採り、300 x g で 5 分間遠心分離する。200 μ l の溶液を残して上清を取り除く。ピペットを用いてペレットを溶液中で吸排出し、細胞が再懸濁するまで完全に懸濁する。ステップ 2 に進む。

2. 平衡塩類溶液あるいは培養液中の細胞 ■ $1 \sim 2 \times 10^6$ 個 / ▲ $1 \sim 2 \times 10^7$ 個を ■ 1.5 ml マイクロ遠心チューブ / ▲ 15 ml 遠心チューブに入れる。
3. ■ 13,000 ~ 16,000 x g で 5 秒間 / ▲ 500 x g で 3 分間の遠心操作を行ない、細胞をペレット化する。
4. 約 ■ 20 μ l / ▲ 200 μ l の溶液を残して、上清をピペッティングあるいは注意深く傾けて取り除く。
5. チューブを激しくボルテックスし、残液中の細胞を再懸濁する。
ボルテックスにより、次のステップの細胞溶解が容易に行なえます。
6. ■ 300 μ l / ▲ 3 ml の Cell Lysis Solution を細胞懸濁液に添加し、ピペットで溶液を吸排出するか、あるいは高速で 10 秒間ボルテックスして細胞を溶解する。
通常インキュベーションは不要ですが、混和後に細胞塊が見える場合は、溶液が均一になるまで 37°C でインキュベートしてください。サンプルは Cell Lysis Solution 中で少なくとも 2 年間は室温（15 ~ 25°C）で安定です。
7. オプション：RNA フリーの DNA が必要な場合には、■ 1.5 μ l / ▲ 15 μ l の RNase A Solution を添加し、25 回転倒混和する。37°C で 5 分間インキュベートし、その後、氷上で ■ 1 分間 / ▲ 3 分間インキュベートして、サンプルを急速に冷却する。
サンプルは 37°C で最高 1 時間までインキュベート可能です。
8. ■ 100 μ l / ▲ 1 ml の Protein Precipitation Solution を添加し、最高速度で 20 秒間激しくボルテックスする。

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

9. ■ 13,000 ~ 16,000 x g で 1 分 / ▲ 2,000 x g で 10 分間遠心操作する。
沈殿したタンパク質は固いペレットとなります。タンパク質ペレットがよく固まっていない場合は、5 分間氷冷した後、遠心操作を繰り返します。
10. ■ 300 μ l のイソプロパノールを新しい 1.5 ml チューブ / ▲ 3 ml のイソプロパノールを新しい 15 ml チューブにピペットで入れ、前ステップの上清を静かに添加する。
添加中にタンパク質ペレットが剥がれないように注意します。
11. チューブを静かに 50 回転倒混和する。
12. ■ 13,000 ~ 16,000 x g で 1 分間 / ▲ 2,000 x g で 3 分間遠心操作する。
DNA は白い小さなペレットとして確認できます。
13. 注意深く上清を除去し、清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。
14. ■ 300 μ l / ▲ 3 ml の 70% エタノールを添加し、数回転倒させて DNA ペレットを洗淨する。
15. ■ 13,000 ~ 16,000 x g で 1 分間 / ▲ 2,000 x g で 1 分間遠心操作する。
16. 上清を静かに取り除く。清潔なる紙上にチューブを逆さに 5 秒間置き、残液を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。
■ 5 分間 / ▲ 5 ~ 10 分間風乾させる。
ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。DNA の溶解が難しくなるので、DNA ペレットを過剰に乾燥させることは避けてください。
17. ■ 100 μ l / ▲ 400 μ l の DNA Hydration Solution を入れ、中程度の速度で 5 秒間ボルテックスする。
18. 65°C で 1 時間インキュベートして DNA を溶解する。
19. 静かに攪拌しながら室温 (15 ~ 25°C) で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。その後、サンプルをスピンドウンし、保存用チューブに移す。

プロトコール：固定された $1 \sim 2 \times 10^6$ 個の細胞からの DNA 精製 (Genra Puregene Tissue Kit 使用)

本プロトコールは、Genra Puregene Tissue Kit を用いて、メタノールと酢酸、70% エタノール、95%エタノールのいずれかで固定された細胞 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個からゲノム DNA を精製します。

実験開始前の準備事項

- ステップ7用には 37℃、ステップ5b用には 55℃、ステップ5aとステップ20用には 65℃にウォーターバスを予め加熱します。

操作手順

1. メタノールと酢酸 (3 : 1)、70%エタノール、95%エタノールのいずれかで固定された細胞 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個を 1.5 ml のマイクロ遠心チューブに入れる。
2. $13,000 \sim 16,000 \times g$ で 5 秒間遠心分離し、細胞をペレット化する。
3. 上清をできるだけ取り除く。

注：PBS が細胞を溶解するために DNA 収量が顕著に低下することがあるので PBS で細胞を洗浄しないでください。

4. 300 μ l の Cell Lysis Solution を細胞ペレットに添加し、ピペットで溶液を吸排出するか、あるいは高速で 10 秒間ボルテックスして細胞を溶解する。
5. ステップ5aあるいは5bに従って細胞を完全に溶解する：
- 5a. 65℃で 15 ~ 60 分間加熱して、細胞を完全に溶解する。インキュベーション後に細胞塊が観察される場合は、マイクロ遠心チューブ用乳棒を用いて細胞をホモジナイズする。
- 5b. 収量を最大にするためには、1.5 μ l の Puregene Proteinase K (Cat. no. 158918) を細胞ライセートに加え、25 回転倒混和し、55℃で 1 時間あるいは細胞塊が溶解するまでインキュベートする。

サンプルは 55℃で一晩のインキュベートも可能です。

インキュベーション中に、定期的にチューブを転倒して混和します。

6. 1.5 μ l の RNase A Solution を添加し、サンプルを 25 回転倒混和する。
7. 37℃で 15 分間インキュベートする。
サンプルは 37℃で最高 1 時間までインキュベート可能です。
8. サンプルを氷上で 1 分間インキュベートして、急速に冷却する。
9. 100 μ l の Protein Precipitation Solution を添加し、高速で 20 秒間激しくボルテックスする。

10. **13,000 ~ 16,000 x g** で 3 分間遠心操作する。
沈殿したタンパク質は固いペレットとなります。タンパク質ペレットがよく固まっていない場合は、5分間氷冷した後、遠心操作を繰り返します。
11. **300 µl** のイソプロパノールを新しい **1.5 ml** マイクロ遠心チューブにピペットを入れて、前ステップからの上清を注意深く重層する。
添加中にタンパク質ペレットが剥がれないように注意します。
12. **DNA** の収量が少ないと予想される場合 (**2 µg** 以下) は、**0.5 µl** の **Glycogen Solution (Cat. no. 158930)** を添加する。
13. チューブを静かに **50** 回転倒混和する。
14. **13,000 ~ 16,000 x g** で 1 分間遠心操作する。
DNA は白い小さなペレットとして確認できます。
15. 注意深く上清を除去し、清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。
16. **300 µl** の **70%** エタノールを添加し、チューブを数回転倒させて **DNA** ペレットを洗浄する。
17. **13,000 ~ 16,000 x g** で 1 分間遠心操作する。
18. 上清を静かに取り除く。清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。**5** 分間風乾させる。
ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。DNA の溶解が難しくなるので、DNA ペレットを過剰に乾燥させることは避けてください。
19. **100 µl** の **DNA Hydration Solution** を入れて、最高速度で **5** 秒間激しくボルテックスする。
20. **65°C** で 1 時間インキュベートして **DNA** を溶解する。
21. 静かに攪拌しながら室温 (**15 ~ 25°C**) で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。その後、サンプルをスピンドウンし、保存用チューブに移す。

プロトコール：組織からの DNA 精製 (Genra Puregene Tissue Kit 使用)

本プロトコールは、Genra Puregene Tissue Kit を用いて、新鮮あるいは凍結組織 5 ~ 10 mg あるいは 50 ~ 100 mg からゲノム DNA を精製します。

実験を始める前の重要事項

- 操作手順のいくつかのステップでは、次の 2 種類の値から検体量にあったものを選択してください；5 ~ 10 mg の組織を処理する場合は■、50 ~ 100 mg の組織を処理する場合は▲。

実験開始前の準備事項

- ステップ 3 用には 37°C、ステップ 2b 用には 55°C、ステップ 2a とステップ 15 用には 65°C にウォーターバスを予め加熱します。

操作手順

1. 組織サンプルを迅速に摘出し、液体窒素中で凍結する。
 - 5 ~ 10 mg / ▲ 50 ~ 100 mg の凍結あるいは新鮮組織を乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で破碎する。全ての作業は迅速に行ない、重量の測定も含め、組織は常に氷中に置いておく。
2. 氷上に置いた破碎用チューブ■ 1.5 ml / ▲ 15 ml に■ 300 μ l / ▲ 3 ml の Cell Lysis Solution を分注し、前ステップで破碎した組織を入れる。ステップ 2a あるいは 2b に従って細胞を完全に溶解する：
 - 2a. 65°C で 15 分 ~ 1 時間加熱する。
 - 2b. 収量を最大にするためには、■ 1.5 μ l / ▲ 15 μ l の Puregene Proteinase K を添加し、25 回転倒混和した後、55°C で 3 時間あるいは組織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に、適宜、サンプルを転倒混和する。

最大の収量を得るためには、サンプルは 55°C で一晩インキュベート可能です。
3. ■ 1.5 μ l / ▲ 15 μ l の RNase A Solution を添加し、サンプルを 25 回転倒混和する。37°C で 15 ~ 60 分間インキュベートする。
4. 氷上で■ 1 分間 / ▲ 3 分間インキュベートして、サンプルを急速に冷却する。
5. ■ 100 μ l / ▲ 1 ml の Protein Precipitation Solution を添加し、最高速度で 20 秒間激しくボルテックスする。
6. ■ 13,000 ~ 16,000 \times g で 3 分間 / ▲ 2,000 \times g で 10 分間遠心操作する。

沈殿したタンパク質は固いペレットとなります。タンパク質ペレットがよく固まっていない場合は、5 分間氷冷した後、遠心操作を繰り返します。

7. ■ 300 μ l / ▲ 3 ml のイソプロパノールを新しい■ 1.5 ml マイクロ遠心チューブ / ▲ 15 ml 遠心チューブにピペットで入れて、前ステップからの上清を注意深く重層する。

添加中にタンパク質ペレットが剥がれないように注意します。

注：DNA の収量が少ないと予想される場合（1 μ g 以下）は、■ 0.5 μ l の Glycogen Solution (Cat. no. 158930) を添加する。

8. チューブを静かに 50 回転倒混和する。
9. ■ 13,000 ~ 16,000 x g で 1 分間 / ▲ 2,000 x g で 3 分間遠心操作する。
10. 注意深く上清を除去し、清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。
11. ■ 300 μ l / ▲ 3 ml の 70%エタノールを添加し、数回転倒させて DNA ペレットを洗浄する。
12. ■ 13,000 ~ 16,000 x g で 1 分間 / ▲ 2,000 x g で 1 分間遠心操作する。
13. 上清を静かに取り除く。清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。■ 5 分間 / ▲ 5 ~ 10 分間風乾させる。
ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。DNA の溶解が難しくなるので、DNA ペレットを過剰に乾燥させることは避けてください。
14. ■ 100 μ l / ▲ 400 μ l の DNA Hydration Solution を添加し、中程度の速度で 5 秒間ボルテックスする。
15. 65°C で 1 時間インキュベートして DNA を溶解する。
16. 静かに攪拌しながら室温（15 ~ 25°C）で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。その後、サンプルをスピンドウンし、保存用チューブに移す。

プロトコール：固定組織からの DNA 精製 (Genra Puregene Tissue Kit 使用)

本プロトコールは、Genra Puregene Tissue Kit を用いて、固定組織 5 ~ 10 mg からゲノム DNA を精製します。

実験開始前の準備事項

- ステップ 5 用には 37°C、ステップ 3a と 3b 用には 55°C、ステップ 1、4、18 用には 65°C にウォーターバスを予め加熱します。

操作手順

1. 固定組織の余分な固定液を清潔なる紙に吸収させる。300 μ l の Cell Lysis Solution をピペットで 1.5 ml マイクロ遠心チューブに入れ、5 ~ 10 mg の組織を添加する。65°C で 15 分間インキュベートして組織を柔らかくする。
2. マイクロチューブ用乳棒を 30 ~ 50 回上下させて、ホモジナイズする。
3. 収量を最大にするためにはステップ 3a および 3b を行なう。それ以外はステップ 4 に進む。
- 3a. 1.5 μ l の Puregene Proteinase K を添加し、25 回転倒混和し、55°C で 3 時間インキュベートする。ステップ 3b あるいはステップ 5 に進む。ステップ 4 は必要ない。
ホモジナイゼーションを十分に行なうには、サンプルを 55°C で一晩インキュベートします。
インキュベーション中に、適宜サンプルを転倒混和してください。
- 3b. 一晩インキュベートした後に組織が完全に溶解していない場合には、さらに 1.5 μ l の Puregene Proteinase K を添加し、55°C で 3 時間インキュベートを続ける。ステップ 5 に進む。
ホモジナイゼーションを十分に行なうには、サンプルを 55°C で一晩インキュベートします。
インキュベーション中に、適宜サンプルを転倒混和してください。
4. ライセートを 65°C で 15 ~ 60 分間インキュベートする。
5. 1.5 μ l の RNase A Solution を添加し、サンプルを 25 回転倒混和する。37°C で 15 分間インキュベートする。
6. サンプルを氷上で 1 分間インキュベートして、急速に冷却する。
7. 100 μ l の Protein Precipitation Solution を添加し、高速で 20 秒間激しくボルテックスする。
8. 13,000 ~ 16,000 \times g で 3 分間遠心操作する。
沈殿したタンパク質は固いペレットとなります。タンパク質ペレットがよく固まっていない場合は、5 分間氷冷した後、遠心操作を繰り返します。

9. 300 μ l のイソプロパノールを新しい 1.5 ml マイクロ遠心チューブにピペットで入れて、前ステップからの上清を注意深く重層する。
添加中にタンパク質ペレットが剥がれないように注意します。
10. DNA の収量が少ないと予想される場合 (10 μ g 以下) は、0.5 μ l の **Glycogen Solution (Cat. no. 158930)** を添加する。
11. チューブを静かに 50 回転倒混和する。
12. 13,000 ~ 16,000 \times g で 5 分間遠心操作する。
13. 注意深く上清を除去し、清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。
14. 300 μ l の 70%エタノールを添加し、チューブを数回転倒させて DNA ペレットを洗浄する。
15. 13,000 ~ 16,000 \times g で 1 分間遠心操作する。
16. 上清を静かに取り除く。清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。5 分間風乾させる。
ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。DNA の溶解が難しくなるので、DNA ペレットを過剰に乾燥させることは避けてください。
17. 100 μ l の **DNA Hydration Solution** を入れて、中程度の速度で 5 秒間ボルテックスして、混和する。
18. 65°C で 1 時間インキュベートして DNA を溶解する。
19. 静かに攪拌しながら室温 (15 ~ 25°C) で一晚インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。その後、サンプルをスピンドウンし、保存用チューブに移す。

プロトコール：FFPE 組織からの DNA 精製 (Genra Puregene Tissue Kit 使用)

本プロトコールは、Genra Puregene Tissue Kit を用いて 5 ~ 10 mg のホルマリン固定パラフィン包埋組織からゲノム DNA を精製します。

実験開始前の準備事項

- ステップ 20 用には 37℃、ステップ 18、19 用には 55℃、ステップ 33 用には 65℃にウォーターバスを予め加熱します。

操作手順

1. 細かく組織をカットし、5 ~ 10 mg の組織を 1.5 ml のマイクロ遠心チューブに移す。
2. 300 μ l のキシレンを添加して、静かに攪拌しながら室温 (15 ~ 25℃) で 5 分間インキュベートする。
キシレンを取り扱う際は手袋、保護用眼鏡、実験着を着用してください。皮膚、眼、洋服への接触を避け、ドラフト中で作業してください。
3. 13,000 ~ 16,000 \times g で 1 ~ 3 分間遠心操作して組織をペレット化する。
4. 上清を静かに取り除く。
5. 300 μ l のキシレンを添加して、静かに攪拌しながら室温で 5 分間インキュベートする。
6. 13,000 ~ 16,000 \times g で 1 ~ 3 分間遠心操作して組織をペレット化する。
7. 上清を静かに取り除く。
8. 300 μ l のキシレンを添加して、静かに攪拌しながら室温で 5 分間インキュベートする。
9. 13,000 ~ 16,000 \times g で 1 ~ 3 分間遠心操作して組織をペレット化する。
10. 上清を静かに取り除く。
11. 300 μ l の 96 ~ 100%エタノールを添加して、静かに攪拌しながら室温で 5 分間インキュベートする。
12. 13,000 ~ 16,000 \times g で 1 ~ 3 分間遠心操作して組織をペレット化する。
13. 上清を静かに取り除く。
14. 300 μ l の 96 ~ 100%エタノールを添加して、静かに攪拌しながら室温で 5 分間インキュベートする。
15. 13,000 ~ 16,000 \times g で 1 ~ 3 分間遠心操作して組織をペレット化する。
16. 上清を静かに取り除く。

17. 300 μ l の Cell Lysis Solution を添加し、マイクロ遠心チューブ用乳棒を 30 ~ 50 回上下してホモジナイズする。
18. 1.5 μ l の Puregene Proteinase K を添加し、25 回転倒混和し、55°C で 3 時間インキュベートする。

ホモジナイゼーションを十分に行なうには、サンプルを 55°C で一晩インキュベートします。

インキュベーション中に、適宜サンプルを転倒混和してください。
19. 一晩インキュベート後、組織が完全に溶解していない場合には、さらに 1.5 μ l の Puregene Proteinase K を添加し、55°C で 3 時間インキュベートし続ける。

ホモジナイゼーションを十分に行なうには、サンプルを 55°C で一晩インキュベートします。

インキュベーション中に、適宜サンプルを転倒混和してください。
20. 1.5 μ l の RNase A Solution を添加し、サンプルを 25 回転倒混和する。37°C で 15 分間インキュベートする。
21. サンプルを氷上で 1 分間インキュベートして、急速に冷却する。
22. 100 μ l の Protein Precipitation Solution を添加し、高速で 20 秒間激しくボルテックスする。
23. 13,000 ~ 16,000 \times g で 3 分間遠心操作する。

沈殿したタンパク質は固いペレットとなります。タンパク質ペレットがよく固まっていない場合は、5 分間氷冷した後、遠心操作を繰り返します。
24. 300 μ l のイソプロパノールを新しい 1.5 ml マイクロ遠心チューブにピペットで入れて、前ステップからの上清を注意深く重層する。

添加中にタンパク質ペレットが剥がれないように注意します。
25. DNA の収量が少ないと予想される場合 (10 μ g 以下) は、0.5 μ l の Glycogen Solution (Cat. no. 158930) を添加する。
26. チューブを静かに 50 回転倒混和する。
27. 13,000 ~ 16,000 \times g で 5 分間遠心操作する。
28. 注意深く上清を除去し、清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。
29. 300 μ l の 70% エタノールを添加し、チューブを数回転倒させて DNA ペレットを洗浄する。
30. 13,000 ~ 16,000 \times g で 1 分間遠心操作する。

31. 上清を静かに取り除く。清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。5 分間風乾させる。

ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。DNA の溶解が難しくなるので、DNA ペレットを過剰に乾燥させることは避けてください。

32. 100 μ l の DNA Hydration Solution を入れて、中程度の速度で 5 秒間ボルテックスして、混和する。
33. 65°C で 1 時間インキュベートして DNA を溶解する。
34. 静かに攪拌しながら室温 (15 ~ 25°C) で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。その後、サンプルをスピンドウンし、保存用チューブに移す。

プロトコール：マウス尾組織からの DNA 精製 (Gentra Puregene Mouse Tail Kit 使用)

本プロトコールは、Gentra Puregene Mouse Tail Kit を用いて 5 mm のマウス尾からゲノム DNA を精製します。

実験開始前の準備事項

- ステップ 4 および 16 で使用するためにウォーターバスを予め 55℃ および 65℃ に加熱します。
- オプション：ステップ 5 で使用するためにウォーターバスを予め 37℃ に加熱します。

操作手順

1. 新鮮または凍結したマウス尾組織を 5 mm (5 ~ 10 mg) にカットする。
2. 300 μ l の Cell Lysis Solution をピペットで 1.5 ml マイクロ遠心チューブに入れ、前ステップでカットした組織を入れる。
3. 1.5 μ l の Puregene Proteinase K をライセートに添加し、25 回転倒混和する。
4. 55℃ で一晩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に、適宜サンプルを転倒混和してください。
注：インキュベート後、溶解しない骨や毛はチューブから取り除きます。
5. オプション：RNA フリーの DNA が必要な場合には、1.5 μ l の RNase A Solution (Cat. no. 158922) を添加し、25 回転倒混和する。37℃ で 15 ~ 60 分間インキュベートする。サンプルを氷上で 1 分間インキュベートして、急速に冷却する。
6. 100 μ l の Protein Precipitation Solution を添加し、高速で 20 秒間激しくボルテックスする。
7. 13,000 ~ 16,000 \times g で 3 分間遠心操作する。
沈殿したタンパク質は固いペレットとなります。タンパク質ペレットがよく固まっていない場合は、5 分間氷冷した後、遠心操作を繰り返します。
8. 300 μ l のイソプロパノールを新しい 1.5 ml マイクロ遠心チューブにピペットで入れて、前ステップからの上清を注意深く重層する。
添加中にタンパク質ペレットが剥がれないように注意します。
9. チューブを静かに 50 回転倒混和する。
10. 13,000 ~ 16,000 \times g で 1 分間遠心操作する。
DNA は白い小さなペレットとして観察されます。
11. 注意深く上清を除去し、清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。

12. 300 μ l の 70%エタノールを添加し、チューブを数回転倒させて DNA ペレットを洗淨する。
13. 13,000 ~ 16,000 x g で 1 分間遠心操作する。
14. 上清を静かに取り除く。清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。5 分間風乾させる。
ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。DNA の溶解が難しくなるので、DNA ペレットを過剰に乾燥させることは避けてください。
15. 100 μ l の DNA Hydration Solution を入れて、最高速度で 5 秒間激しくボルテックスする。
16. 65°C で 1 時間インキュベートして DNA を溶解する。
17. 静かに攪拌しながら室温 (15 ~ 25°C) で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。その後、サンプルをスピンドウンし、保存用チューブに移す。

プロトコール：酵母からの DNA 精製 (Genra Puregene Yeast/Bact. Kit 使用)

本プロトコールは、一晩培養した酵母培養液 1 ml (新鮮あるいは凍結したサンプル、 $1 \sim 2 \times 10^8$ 個の細胞) から Genra Puregene Yeast/Bact. Kit を用いてゲノム DNA を精製します。

実験開始前の準備事項

- ステップ 6、20 で使用するために 37℃、そしてステップ 21 で使用するために 65℃ にウォーターバスを予め加熱します。
- 凍結した酵母サンプルは、操作を始める前に解凍し、室温 (15 ~ 25℃) に戻してください。

操作手順

1. $1 \sim 2 \times 10^8$ 個の細胞を含む一晩培養液を調製する。
2. 氷上にセットした 1.5 ml のマイクロ遠心チューブに細胞懸濁液 1 ml を入れる。
3. 13,000 ~ 16,000 x g で 5 秒間遠心操作し、細胞をペレット化する。
4. ピペティングあるいは注意深く傾けて上清を除去する。
5. 300 μ l の Cell Suspension Solution を添加し、ピペットを用いて吸排出して混和する。
6. 1.5 μ l の Lytic Enzyme Solution を添加し、サンプルを 25 回転倒混和する。37℃ で 30 分間インキュベートする。
7. 13,000 ~ 16,000 x g で 1 分間遠心操作して、細胞をペレット化する。
8. ピペティングあるいは注意深く傾けて上清を除去する。
9. 300 μ l の Cell Lysis Solution を添加し、ピペットを用いて溶液を吸排出して細胞を溶解する。
10. 100 μ l の Protein Precipitation Solution を添加し、高速で 20 秒間激しくボルテックスする。
11. 13,000 ~ 16,000 x g で 3 分間遠心操作する。
沈殿したタンパク質は固いペレットとなります。タンパク質ペレットがよく固まっていない場合は、5 分間氷冷した後、遠心操作を繰り返します。
12. 300 μ l の イソプロパノールを新しい 1.5 ml マイクロ遠心チューブにピペットで入れて、前ステップからの上清を注意深く重層する。
添加中にタンパク質ペレットが剥がれないように注意します。
13. チューブを静かに 50 回転倒混和する。
14. 13,000 ~ 16,000 x g で 1 分間遠心操作する。
DNA は白い小さなペレットとして観察されます。

15. 注意深く上清を除去し、清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。
16. 300 μ l の 70%エタノールを添加し、チューブを数回転倒させて DNA ペレットを洗浄する。
17. 13,000 ~ 16,000 \times g で 1 分間遠心操作する。
18. 上清を静かに取り除く。清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。5 分間風乾させる。
ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。DNA の溶解が難しくなるので、DNA ペレットを過剰に乾燥させることは避けてください。
19. 100 μ l の DNA Hydration Solution を入れて、中程度の速度で 5 秒間ボルテックスして、混和する。
20. 1.5 μ l の RNase A Solution を添加し、1 秒間のボルテックスにより混和する。スピンドウンして溶液を収集し、37°C で 15 ~ 60 分間インキュベートする。
21. 65°C で 1 時間インキュベートして DNA を溶解する。
22. 静かに攪拌しながら室温 (15 ~ 25°C) で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。その後、サンプルをスピンドウンし、保存用チューブに移す。

プロトコール：グラム陰性菌からの DNA 精製 (Genra Puregene Yeast/Bact. Kit 使用)

本プロトコールは、新鮮あるいは凍結したグラム陰性菌培養液 0.5 ml から Genra Puregene Yeast/Bact. Kit を用いてゲノム DNA を精製します。

実験開始前の準備事項

- ステップ 6 用には 37℃、ステップ 18 用には 65℃、ステップ 5 用には 80℃ にウォーターバスを予め加熱します。
- 新鮮あるいは凍結したグラム陰性菌を使用できます。通常、一晚培養液 1 ml あたり $1 \sim 3 \times 10^9$ 個の細胞が含まれています。グラム陰性菌のゲノムサイズが小さいため、 3×10^9 個までの細胞を本プロトコールで使用可能です。従って、培養液をそのまま使うこともできますが、必要に応じて遠心操作により濃縮することも可能です。濃縮には、1 ml の一晚培養液を $13,000 \sim 16,000 \times g$ で 1 分間遠心操作してペレット化します。200 μ l の溶液を残して上清を取り除きます。ピペットを用いてペレットを溶液中で 10 回吸排出し、完全に懸濁します。サンプルを氷上に置いてすぐ使用するか、-80℃で凍結保存します。
- 凍結した細菌サンプルは、操作を始める前に解凍し、室温 (15 ~ 25℃) に戻してください。

操作手順

1. 一晚培養液を調製する。
2. 500 μ l の培養液 (約 $0.5 \sim 1.5 \times 10^9$ 細胞を含む) を氷上にセットした 1.5 ml のマイクロ遠心チューブに入れる。
3. $13,000 \sim 16,000 \times g$ で 5 秒間遠心操作し、細胞をペレット化する。
4. ピペッティングあるいは注意深く傾けて上清を除去する。
5. 300 μ l の Cell Lysis Solution を添加し、ピペットを用いて吸排出して混和する。80℃で 5 分間インキュベートし、細胞を溶解する。
サンプルは Cell Lysis Solution 中で少なくとも 2 年間は室温 (15 ~ 25℃) で安定です。
6. 1.5 μ l の RNase A Solution を添加し、サンプルを 25 回転倒混和する。37℃で 15 ~ 60 分間インキュベートする。
7. サンプルを氷上で 1 分間インキュベートして、急速に冷却する。
8. 100 μ l の Protein Precipitation Solution を添加し、高速で 20 秒間激しくボルテックスする。
9. $13,000 \sim 16,000 \times g$ で 3 分間遠心操作する。
沈殿したタンパク質は固いペレットとなります。タンパク質ペレットがよく固まっていない場合は、5 分間氷冷した後、遠心操作を繰り返します。

10. 300 μl のイソプロパノールを新しい 1.5 ml マイクロ遠心チューブにピペットで入れて、前ステップからの上清を注意深く重層する。
添加中にタンパク質ペレットが剥がれないように注意します。
11. チューブを静かに 50 回転倒混和する。
12. 13,000 ~ 16,000 $\times g$ で 1 分間遠心操作する。
DNA は白い小さなペレットとして確認できます。
13. 注意深く上清を除去し、清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。
14. 300 μl の 70% エタノールを添加し、チューブを数回転倒させて DNA ペレットを洗浄する。
15. 13,000 ~ 16,000 $\times g$ で 1 分間遠心操作する。
16. 上清を静かに取り除く。清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。5 分間風乾させる。
ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。DNA の溶解が難しくなるので、DNA ペレットを過剰に乾燥させることは避けてください。
17. 100 μl の DNA Hydration Solution を入れて、中程度の速度で 5 秒間ボルテックスして、混和する。
18. 65°C で 1 時間インキュベートして DNA を溶解する。
19. 静かに攪拌しながら室温 (15 ~ 25°C) で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。その後、サンプルをスピンドウンし、保存用チューブに移す。

プロトコール：グラム陽性菌からの DNA 精製 (Genra Puregene Yeast/Bact. Kit 使用)

本プロトコールは、グラム陽性菌培養液（新鮮あるいは凍結したサンプル）0.5 ml から Genra Puregene Yeast/Bact. Kit を用いてゲノム DNA を精製します。

実験開始前の準備事項

- ステップ 6 と 10 用には 37°C、ステップ 22 用には 65°C、ステップ 9 用には 80°C にウォーターバスを予め加熱します。
- 凍結した細菌サンプルは、操作を始める前に解凍し、室温（15 ~ 25°C）に戻してください。

操作手順

1. 一晚培養液を調製する。
2. 500 μ l の培養液（約 $0.5 \sim 1.5 \times 10^9$ 細胞を含む）を氷上にセットした 1.5 ml のマイクロ遠心チューブに入れる。
3. 13,000 ~ 16,000 $\times g$ で 5 秒間遠心操作し、細胞をペレット化する。
固いペレットにするために遠心時間の延長が必要な菌種もあります。
4. ピペティングあるいは注意深く傾けて上清を除去する。
5. 300 μ l の Cell Suspension Solution を添加し、ピペットを用いて吸排出して混和する。
6. 1.5 μ l の Lytic Enzyme Solution を添加し、サンプルを 25 回転倒混和する。37°C で 30 分間インキュベートする。
7. 13,000 ~ 16,000 $\times g$ で 1 分間遠心操作して、細胞をペレット化する。
8. 上清を静かにピペットで除去する。
9. 300 μ l の Cell Lysis Solution を添加し、ピペットを用いて溶液を吸排出して細胞を溶解する。
菌種によっては、さらに 80°C で 5 分間のインキュベートが細胞溶解に必要なことがあります。
10. 1.5 μ l の RNase A Solution を添加し、サンプルを 25 回転倒混和する。37°C で 15 ~ 60 分間インキュベートする。
11. サンプルを氷上で 1 分間インキュベートして、急速に冷却する。
12. 100 μ l の Protein Precipitation Solution を添加し、高速で 20 秒間激しくボルテックスする。

注：多糖類を多量に含むサンプルの場合は、氷上で 15 ~ 60 分間インキュベートします。

13. 13,000 ~ 16,000 x g で 3 分間遠心操作する。

沈殿したタンパク質は固いペレットとなります。タンパク質ペレットがよく固まっていない場合は、5 分間氷冷した後、遠心操作を繰り返します。

14. 300 μ l のイソプロパノールを新しい 1.5 ml マイクロ遠心チューブにピペットで入れて、前ステップからの上清を注意深く重層する。

添加中にタンパク質ペレットが剥がれないように注意します。

15. チューブを静かに 50 回転倒混和する。

16. 13,000 ~ 16,000 x g で 1 分間遠心操作する。

DNA は白い小さなペレットとして確認できます。

17. 注意深く上清を除去し、清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。

18. 300 μ l の 70% エタノールを添加し、チューブを数回転倒させて DNA ペレットを洗浄する。

19. 13,000 ~ 16,000 x g で 1 分間遠心操作する。

20. 上清を静かに取り除く。清潔なる紙上にチューブを逆さに置き、上清を吸収させる。その際、ペレットがチューブから剥がれないように気をつける。5 分間風乾させる。

ペレットはルーズで剥がれやすいことがあります。DNA の溶解が難しくなるので、DNA ペレットを過剰に乾燥させることは避けてください。

21. 100 μ l の DNA Hydration Solution を入れて、最高速度で 5 秒間激しくボルテックスする。

22. 65°C で 1 時間インキュベートして DNA を溶解する。

23. 静かに攪拌しながら室温 (15 ~ 25°C) で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。その後、サンプルをスピンドウンし、保存用チューブに移す。

トラブルシューティング

コメント

すべてのプロトコール

細胞溶解が不完全

a) 細胞数が多すぎる

Cell Lysis Solution の量が細胞数に対して十分でない。使用した細胞数が多すぎる場合、細胞の溶解が不完全になる；Cell Lysis Solution の粘性が高くなり、細胞が固まりになる。細胞を完全に溶解するために、Cell Lysis Solution の量を増やす。不完全な細胞溶解を避けるために、Cell Lysis Solution を添加する前に、血球計算盤あるいはその他カウンターで細胞数を計測するか、組織サンプルの重量を測定する。

b) Cell Lysis Solution を添加後、細胞塊が存在する

Cell Lysis Solution を添加する前に細胞が完全に再懸濁されていないと、細胞塊が生じることがある。細胞塊を溶解するために、溶液が均一になるまで 37°C あるいは室温（15 ~ 25°C）でサンプルをインキュベートする。最終濃度 100 µg/ml になるように Puregene Proteinase K (Cat. no. 158918) を添加し、細胞が完全に溶解するまで 55°C でインキュベートする（1 時間～一晩）と、細胞塊が急速に溶解する。

c) Ficoll 密度勾配遠心法により精製した細胞の溶解が不完全

Ficoll が完全に除去されていない。Cell Lysis Solution を添加する前に PBS で細胞を一度洗浄して、Ficoll を取り除く。必要に応じて Cell Lysis Solution を添加後、ライセートを 65°C でインキュベートし、完全に溶解する。

タンパク質ペレットが柔らかい、ルーズ、あるいは存在しない

a) Protein Precipitation Solution を添加する前にサンプルを十分に冷却していない

固いタンパク質ペレットを得るためには、室温あるいは、それ以下（ $\leq 20 \sim 22^{\circ}\text{C}$ ）にサンプルを冷却してから、Protein Precipitation Solution を添加する。固いタンパク質ペレットを得るためには：

- Protein Precipitation Solution と細胞ライセートが均質に混和するように、サンプルを 20 秒間再びボルテックスする。
- サンプルを氷上で 5 ~ 15 分間インキュベートすると、固いペレットが形成されやすくなる。
- プロトコールに従って遠心操作を行ない、沈殿したタンパク質をペレット化する。

コメント

- b) Protein Precipitation Solution と細胞ライセートが均一に混和していない
- c) 遠心速度が正しくセットされていない
- プロトコールに記載されているように 20 秒間激しくボルテックスしたことを確認する。
- プロトコールに記載されている遠心力 (g) になるように遠心速度をセットする。マイクロ遠心チューブを使用する際は、遠心機を最高にセットする。卓上型遠心機などでは、速度を通常 2,000 x g にセットする。遠心力が 2,000 x g に達成しない場合は、遠心時間を延長してトータルで同じ遠心力になるようにする。例えば、2,000 x g で 10 分間の遠心操作は、トータルで 20,000 x g x 時間 (min) に相当する。遠心力が 1,600 x g しか得られない遠心機では、1,600 x g で 12.5 分間遠心操作する [(1,600 x g) (12.5 minutes) = 20,000 x g x min]。
- 注：2,000 x g と 2,000 rpm は同等ではない。次の式を用いて正確に rpm をセットしたことを確認する：
 $g \text{ (rcf)} = 1.12 * r * (\text{rpm}/1,000)^2$ ここで r はローターの半径 (mm)。

サンプルの溶解が遅い

- a) 溶解ステップでサンプルが混和されていない
- b) DNA Hydration Solution 添加前に DNA ペレットを乾燥させすぎた
- c) 溶解した DNA サンプルにタンパク質が混入している
- 静かに攪拌しながらインキュベートすると DNA の溶解が促進される。
- 乾燥させすぎた DNA ペレットでは、完全に溶解するまで長い時間かかる。DNA 溶液を 65°C で 1 時間、更に室温で一晩インキュベートして、DNA を溶解する。DNA Hydration Solution 中の DNA は室温で最高 1 年間まで保存可能である。
- 加熱や吸引による DNA ペレットの乾燥は推奨しない。
- 注：DNA の長さが短くなるので、65°C で一晩のインキュベートは推奨しない
- 推奨するスタートサンプル量を超えたときに、タンパク質の混入が生じる。46 ページの “Appendix C : DNA サンプルの再精製” に従い DNA サンプルを再度精製する。

A_{260}/A_{280} が高い

RNA がコンタミ

A_{260}/A_{280} 値が 2.0 より高いと RNA の存在している可能性がある。RNA は次の方法のうちどれか一つを用いて除去可能：

- 細胞ライセートでの RNase インキュベーション時間を 15 分から 30 ～ 60 分に延長する。
- 48 ページの “Appendix D：精製した DNA からの RNA 除去” のプロトコルを用いて混入している RNA を除去する。

精製した DNA サイズが 50 kb より短い

a) DNA が分解

サンプル採取やスタートサンプルの保存が不適切なために DNA 分解を起こす。水で溶解したサンプルは不安定で、DNA 分解が起きる。

DNA の分解が生じない方法でサンプルの採取と保存を行なう。サンプルを長期保存 (5 日以上) する場合は、 -80°C で凍結するか、あるいは Cell Lysis Solution 中で室温保存する。サンプルを短期保存 (5 日未満) する場合は、 4°C で保存するか、Cell Lysis Solution 中で室温保存する。

b) DNA が切断

Cell Lysis Solution あるいは DNA Hydration Solution での不適切な取り扱い (例：組織サンプルを長時間ホモジナイズした) により DNA が切断する。組織サンプルを取り扱う際は、新鮮な組織を直接 Cell Lysis Solution に入れて即座にホモジナイズするか、あるいは採取後すぐに組織を凍結する。

これにより、DNase 活性は最低限に抑えられ、その結果 DNA サイズが短くならない。

注：有機溶媒法等の DNA 抽出法に比べて、Puregene 法は非常に緩和な方法なので、DNA の切断を最小限に抑えられる。タンパク質沈殿ステップでの 20 秒間のボルテックスは、精製した DNA のサイズや品質に影響しない。

DNA 収量が低い

- a) スタートサンプルの細胞数が少ない
- 細胞溶解ステップを始める前に、細胞数を数えるか組織重量を測定する。プロトコールに記載されているスタートサンプル量を使用したことを確認する。細胞数が少ないと DNA 沈殿ステップ中の DNA 濃度が低くなり、DNA 沈殿効率が低下する。その結果 DNA 収量が低下する。グリコーゲンのようなキャリアを添加により DNA 収量を最大化できる。300 μ l のイソプロパノールあたり 0.5 μ l の Glycogen Solution (Cat. no. 158930) を添加することを推奨。
- b) 細胞溶解が不完全
- Cell Lysis Solution 中の細胞や組織が多すぎると、細胞溶解が完全に行なわれない。細胞溶解ステップを始める前に、細胞数を数えるか組織重量を測定する。試薬に対して細胞が多すぎると、細胞溶解が妨害され、その結果 DNA 収量が低下する。
- c) Cell Lysis Solution を添加後、細胞塊が存在する
- Cell Lysis Solution を添加する前に細胞が完全に再懸濁されていないと、細胞塊が生じることがある。細胞塊を溶解するために、溶液が均一になるまで、定期的に混合しながら 37°C あるいは室温 (15 ~ 25°C) でサンプルをインキュベートする。最終濃度が 100 μ g/ml になるように Puregene Proteinase K (Cat. no. 158918) を添加し、細胞が完全に溶解するまで 55°C でインキュベートする (1 時間 ~ 一晚) と、細胞塊がより速く溶解する。
- d) 細胞数が少ない
- DNA 精製に使用した細胞数が Cell Lysis Solution 300 μ l あたり 200,000 個未満の場合、あるいは DNA の予想収量が 1 μ g 未満の場合は、グリコーゲンのような DNA キャリアをイソプロパノールに加える。300 μ l のイソプロパノールあたり 0.5 μ l の Glycogen Solution (Cat. no. 158930) を添加することを推奨。
- e) サンプルが完全に溶解していない
- 室温で一晩あるいは 65°C で 1 時間、静かに攪拌しながらサンプルをインキュベートして溶解する (65°C でトータル 2 時間未満のインキュベーションは DNA 品質に影響しない)。

コメント

DNA 濃度が低い

DNA 収量が低い

DNA 溶液を沈殿し、少量の DNA Hydration Solution で溶解する（49 ページ、“Appendix E : DNA の濃縮”を参照）。

血液プロトコール

サンプル中の赤血球細胞が完全に溶解されていない

サンプル中の赤血球細胞数が平均より多い

RBC Lysis Solution とのインキュベーションを繰り返して、残存している赤血球細胞を溶解する。各サンプル容量の 3 倍容量の RBC Lysis Solution を添加し、室温で 10 分間インキュベートして、オリジナルのプロトコールに従って遠心操作する。

全血サンプル中に血塊が存在する

採血中に、サンプルを適切に混和・保存していない

次のようにサンプルを取り扱う : Clotspin® プロトコールを用いると最適な結果が得られる。最新の情報に関しては、弊社テクニカルサポートにお問い合わせください (Tel : 03-6890-7300)。

サンプル中の凝固していない部分を取り出して DNA 精製する ; 血液を採血管から取り出す際に、血塊を残し、凝固していない部分から DNA を精製する。

白血球細胞ペレットから大きな血塊を取り除く。血塊を取り易くするために、細胞を PBS に再懸濁し、ピンセットあるいはピペット・チップで血塊を取り除く。血塊を取り除いた後、白血球細胞をペレット化するために遠心操作して、上清を注意深く除去し、精製プロトコールを続ける。

Puregene Proteinase K (Cat. no. 158918) で小さい血塊を分解して取り除く。最終濃度が 100 µg/ml になるように Puregene Proteinase K を Cell Lysis Solution に添加し、時々攪拌しながら血塊が完全に溶解するまで 55°C でインキュベートする。

注 : タンパク質沈殿ステップを始める前に血塊を完全に溶解する。これによりタンパク質の混入は最小限に抑えられ、DNA 収量は最大になる。

遠心操作後に白血球細胞ペレットがルーズ

遠心条件が適切に
設定されていない

大量プロトコール (15 ml または 50 ml チューブ) に従う場合は、遠心時間を 2 分から 5 分に延長して遠心操作の設定を最適化する必要がある。

プロトコールに記載されている遠心力 (g) になるように遠心速度をセットする。マイクロ遠心チューブを使用する際は、遠心機を速度を最高にセットする。卓上型遠心機などでは、速度を通常 $2,000 \times g$ にセットする。遠心力が $2,000 \times g$ に達成しない場合は、遠心時間を延長してトータルで同じ遠心力になるようにする。例えば、 $2,000 \times g$ で 10 分間の遠心操作は、トータルで $20,000 \times g \times \text{時間 (min)}$ に相当する。遠心力が $1,600 \times g$ しか得られない遠心機では、 $1,600 \times g$ で 12.5 分間遠心操作する [$(1,600 \times g)(12.5 \text{ min}) = 20,000 \times g \times \text{min}$]。

注： $2,000 \times g$ と $2,000 \text{ rpm}$ は同等ではない。次の式を用いて正確に rpm をセットしたことを確認する：
 $g \text{ (rcf)} = 1.12 * r * (\text{rpm}/1,000)^2$ ここで r はローターの半径 (mm)。

固定細胞用プロトコール

メタノール、酢酸、エタノールで固定された細胞の溶解が不完全

- a) Cell Lysis Solution を添加する前に、固定剤を完全に除去していない
- 細胞をペレット化する遠心操作後に固定剤を完全に除去する；収量が大幅に低下するので PBS で細胞を洗浄しないこと。
- b) サンプルに Cell Lysis Solution を添加後、細胞塊が存在する
- 細胞が完全に溶解するまで (細胞塊が分散) 65°C でインキュベートする。加熱処理が効果的でない場合は、細胞を乳棒でホモジナイズすることも可能。最終濃度が $100 \mu\text{g/ml}$ になるように Puregene Proteinase K (Cat. no. 158918) を添加し、細胞が完全に溶解するまで 55°C でインキュベートする (1 時間～一晚) と、細胞塊がより速く溶解する。

Appendix A : ウイルス DNA 精製用プロトコール

Puregene による精製方法はウイルス DNA の精製に使用できます。

全血およびバフィコート用プロトコール (3 ~ 11 ページ)、培養細胞用プロトコール (18 ページ) は、白血球細胞由来あるいは細胞由来のウイルス DNA を精製するために使用してください。

体液用プロトコール (16 ページ) は、細胞由来ではないウイルス核酸の精製に使用してください。

Appendix B : DNA の濃度・収量・純度・長さの測定

濃度、収量、純度の測定

260 nm の吸光度で溶出液の DNA 濃度を測定して、DNA 収量を計算します。純度は、260 nm での吸光度と 280 nm での吸光度の比率から計算します。高純度な DNA では A_{260}/A_{280} の比が 1.7 ~ 1.9 になります。

正確に測定するために、260 nm での吸光度の読み取り値が 0.1 ~ 1.0 になるようにします。サンプルは適宜希釈します。サンプルの希釈および分光光度計の較正には溶出バッファーあるいは水（必要に応じて）を使用してください。260 および 280 nm で吸光度を測定するか、あるいは 220 ~ 320 nm でスキャンします（スキャンにより、260 nm での吸光度に影響する他の要因が存在するかどうかわかります）。分光光度計では DNA も RNA も測定されます。DNA のみを測定するためには、蛍光計で測定しなければなりません。

DNA の長さを測定

アガロースゲルを用いたパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）によりゲノム DNA の長さを決めることができます。DNA をアルコール * 沈殿により濃縮し、約 30 μ l の TE buffer (pH 8.0*) を添加後、60°C で 30 分以上ゆつくりと攪拌することにより再溶解します。ゲノム DNA を長く乾燥すると再溶解が非常に難しくなるので、DNA ペレットを室温で 10 分以上乾燥しないでください。ウェルあたり 3 ~ 5 μ g の DNA をアプライします。スタンダード PFGE の条件を以下に記載します：

- 1%アガロースゲル / 0.5x TBE 電気泳動用バッファー *
- パルスタイム：5 ~ 40 秒
- 泳動時間：17 時間
- 電圧：170 V

* 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。

Appendix C : DNA サンプルの再精製

精製した DNA サンプルが高濃度のタンパク質を含んでいる場合は、以下のプロトコールで再度精製できます。

表 6 で推奨されている試薬容量を使用してください。

表 6. DNA サンプルの再精製に使用する試薬容量

Reagent	Relative volume	Volume (µl)			
Cell Lysis Solution	5 volumes	500	1,000	2,500	5,000
Puregene Proteinase K	100 µg/ml final concentration	3	6	15	30
Protein Precipitation Solution	2 volumes	200	400	1,000	2,000
Isopropanol	6 volumes	600	1,200	3,000	6,000
Glycogen Solution	33.3 µg/ml final concentration	1	2	5	10
70% ethanol	6 volumes	600	1,200	3,000	6,000
DNA Hydration Solution	1 volume	100	200	500	1,000

1. 精製した DNA サンプル溶液に 5 倍容量の **Cell Lysis Solution** を添加する。ピペットで溶液を吸排出して混和する。
2. タンパク質粒子が溶解するまで、**65°C** でサンプルをインキュベートする。
収量を最大にするためには、操作を始める前に粒子が完全に溶解していることが重要です。
3. タンパク質ペレットの溶解が困難な場合は、**Puregene Proteinase K (Cat. no. 158918)** を添加する。粒子が溶解するまで **55°C** でインキュベートする（1 時間～一晩）。
4. 2 倍容量の **Protein Precipitation Solution** を添加し、高速で 20 秒間激しくボルテックスする。
5. **13,000 ~ 16,000 x g** で 3 分間（マイクロ遠心チューブ）あるいは **2,000 x g** で 10 分間（15 ml または 50 ml 遠心チューブ）遠心操作して、タンパク質をペレット化する。
6. 6 倍容量のイソプロパノールを新しいチューブに入れる。前ステップの上清を静かに添加する。
7. DNA の収量が少ないと予想される場合（**1 µg** 以下）は、**Glycogen Solution (Cat. no. 158930)** を添加する。

8. チューブを静かに 50 回転倒混和する。
9. 13,000 ~ 16,000 x g で 1 分間（マイクロ遠心チューブ）あるいは 2,000 x g で 5 分間（15 ml または 50 ml 遠心チューブ）遠心操作して、DNA をペレット化する。
10. 慎重に上清を取り除き、DNA を 6 倍容量の 70% エタノールで洗浄する。
11. 13,000 ~ 16,000 x g で 1 分間（マイクロ遠心チューブ）あるいは 2,000 x g で 1 分間（15 ml または 50 ml 遠心チューブ）遠心操作する。エタノールを慎重に捨てる（ペレットはよく固まっていないことがあるので、剥離しないように注意しながらゆっくり捨てる）。
12. DNA を最高 15 分間風乾する。
13. 等量の DNA Hydration Solution（あるいは適切な量）を添加し、中程度の速度で 5 秒間ボルテックスして混和する。
14. 65°C で 1 時間インキュベートして DNA を溶解する。
15. 静かに攪拌しながら室温（15 ~ 25°C）で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。

Appendix D : 精製した DNA からの RNA 除去

精製した DNA に RNA が混入している場合には、260 nm および 280 nm での吸光度の測定値から計算した収量および濃度は不正確です。

精製 DNA サンプルに混入した RNA を除去する場合は、下のプロトコールを使用します。

表 7 で推奨されている試薬容量を使用してください。

表 7. 精製した DNA からの RNA 除去に使用する試薬容量

Reagent	Relative volume	Volume to add for a 100 μ l sample (μ l)
Protein Precipitation Solution	0.5 volumes	50
96 ~ 100% ethanol	2 volumes	200
Glycogen Solution	33.3 μ g/ml final concentration	0.5
70% ethanol	3 volumes	300

1. DNA 精製プロトコールに記載されている量の **RNase A Solution** を添加する。37°C で 15 ~ 60 分間インキュベートする。
2. **Protein Precipitation Solution** と 96 ~ 100% エタノールを DNA サンプルに加える。
3. DNA の収量が少ないと予想される場合は、**Glycogen Solution (Cat. no. 158930)** を添加する。
4. 50 回静かに転倒混和し、室温 (15 ~ 25°C) で 15 分間インキュベートする。
5. 13,000 ~ 16,000 x g で 5 分間 (マイクロ遠心チューブ) あるいは 2,000 x g で 10 分間 (15 ml または 50 ml 遠心チューブ) 遠心操作する。
6. 遠心上清を注意して除去する。
7. 70% エタノールを添加する。静かに転倒させて DNA を洗浄する。
8. 13,000 ~ 16,000 x g で 1 分間 (マイクロ遠心チューブ) あるいは 2,000 x g で 2 分間 (15 ml または 50 ml 遠心チューブ) 遠心操作する。
9. 遠心上清を注意して除去する。清潔なる紙上に残液を吸収させ、15 分間風乾する。
10. 等量の **DNA Hydration Solution** (あるいは適切な量) を添加し、中程度の速度で 5 秒間ボルテックスして混和する。
11. 65°C で 1 時間インキュベートして DNA を溶解する。
12. 静かに攪拌しながら室温で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れないことを確認する。

Appendix E : DNA の濃縮

本プロトコールは、低濃度の DNA を沈殿して濃縮するため使用します。

48 ページの表 7 に推奨されている試薬容量を使用してください。

1. **Protein Precipitation Solution** と 96 ~ 100%エタノールを DNA サンプルに添加する。
2. DNA の収量が少ないと予想される場合は、**Glycogen Solution (Cat. no. 158930)** を添加する。
3. 50 回穏やかに転倒混和し、室温 (15 ~ 25°C) で 15 分間インキュベートする。
4. 13,000 ~ 16,000 x g で 5 分間 (マイクロ遠心チューブ) あるいは 2,000 x g で 10 分間 (15 ml または 50 ml 遠心チューブ) 遠心操作する。
5. 上清を慎重に取り除く。
6. 70%エタノールを添加する。静かに転倒させて DNA を洗浄する。
7. 13,000 ~ 16,000 x g で 1 分間 (マイクロ遠心チューブ) あるいは 2,000 x g で 2 分間 (15 ml または 50 ml 遠心チューブ) 遠心操作する。
8. 上清を慎重に取り除く。清潔なる紙上に残液を吸収させ、DNA を 15 分間風乾する。
9. **DNA Hydration Solution** を添加し、中程度の速度で 5 秒間ボルテックスして混和する。
注 : DNA Hydration Solution は前回用いた量よりも少ない量を添加すると、DNA 濃度が増加します。
10. 65°C で 1 時間インキュベートして DNA を溶解する。
11. 静かに攪拌しながら室温で一晩インキュベートする。チューブを固く閉じて、漏れがないことを確認する。

Trademarks: QIAGEN®, Genra®, Puregene®, Clotspin® (QIAGEN Group); Scope® (Procter & Gamble Co.); Listerine® (McNEIL-PPC, Inc).

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。

© 2007–2010 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

