

# Investigator Lyse&Spin Basket Kit プロトコールとトラブルシューティング

法医学サンプルが付着した固形物質を除去するための  
サンプル溶解およびろ過

目次	ページ
プロトコール	
固形物質に付着した法医学サンプルの溶解およびろ過	2
トラブルシューティング	4
<b>Appendix A : QIAamp DNA Investigator Kit を用いて DNA を抽出</b>	5
<b>Appendix B : EZ1 Advanced XL での DNA 抽出</b>	7
<b>Appendix C : QIASymphony での DNA 抽出</b>	7



# プロトコール：固形物質に付着した法医学サンプルの溶解およびろ過

## 実験を始める前の重要事項

- DNA Investigator Kit に用いる適切なスタートサンプルに関する指針は、対応するキットのハンドブックを参照してください。
- Lyse&Spin Basket を取り扱う際には、コンタミを回避するために必ず手袋を着用してください。

## 実験開始前の準備事項

- 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。
- Buffer ATL が沈殿物を形成している場合には、70℃ に温めて静かに攪拌することにより沈殿物を溶解します。
- 精液斑痕を処理する際には 1 M DTT ストック溶液を調製し、分注して -20℃ で保管します。使用直前に速やかに解凍します。

## 操作手順

1. 斑痕サンプルを 2 ml のマイクロ遠心チューブ（添付）にセットされた QIAGEN Lyse&Spin Basket に入れる。
2. 475  $\mu$ l の Buffer ATL (QIAamp<sup>®</sup> あるいは QIASymphony<sup>™</sup> DNA Investigator Kit を使用する場合)、あるいは 475  $\mu$ l の Buffer G2 (EZ1 DNA Investigator Kit を使用する場合) を添加する。

注：精液斑痕を処理する場合にはバッファー量を 455  $\mu$ l にします。

3. Proteinase K 溶液 25  $\mu$ l を添加し、蓋を開けてボルテックスにより混和する。

注：精液斑痕を処理する際には、20  $\mu$ l の 1 M DTT を添加します。

4. チューブとバスケットをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、56℃ で 1 時間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。

注：インキュベーションを最高 16 時間まで延長しても、DNA の収量と品質への影響はありません。

5. 10,000 x g 以上で 1 分間遠心操作する。

注：遠心操作中は蓋を閉めたままにしてください。

注：遠心操作は 20,000 x g まで可能です。

注：遠心操作後にバスケット内に液体が残留していないことを確認します。必要に応じて、全ての液体がバスケットのメンブレンを通過するまで同様に遠心操作を繰り返します。大きな断片のチューインガムを処理する際は、チューインガムをバスケットの側面に押し付けることで、バスケットの詰まりを回避することができます。

6. 固形物質が入ったバスケットを捨てる。

注：バスケットを 2 ml サンプルチューブ（添付）に入れて保存も可能です。

7. フロースルー画分の抽出プロトコルを続ける（**Appendix A ~ C**を参照）。



# Appendix A : QIAamp DNA Investigator Kit を用いて DNA を抽出

このプロトコールは Investigator Lyse&Spin Basket で得たライセートからのトータル (ゲノムとミトコンドリア) DNA 分離用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室温 (15 ~ 25°C) で行ないます。

## 実験開始前の準備事項

- 2 ページに従ってサンプルを前処理します。
- 溶出用 Buffer ATE あるいは蒸留水を室温 (15 ~ 25°C) に戻します。
- ステップ3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70°Cにセットします。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。
- Buffer AL が沈殿物を形成している場合には、70°Cに温めて静かに攪拌することにより沈殿物を溶解します。
- QIAamp DNA Investigator Handbook の説明に従って、Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。

## 操作手順

**A1. スピンドウンして 2 ml サンプルチューブの蓋の内側に付着した液滴を回収する。**

**A2. 500 µl の Buffer AL を添加後、蓋を閉めボルテックスで 15 秒間混和する。効率的な溶解を行なうためには、サンプルと Buffer AL が完全に混和して均一な溶液になっていることが重要。**

注: Buffer AL を Buffer ATL に添加した際に白い沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は QIAamp 調製法には影響しません。これはステップ3での加熱インキュベーションの間に溶解します。

注: キャリア RNA が必要な際は、溶解した 1 µg のキャリア RNA を 500 µl の Buffer AL に添加します。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないので注意してください。まず Buffer ATE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。

**A3. 2 ml チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、70°Cで 10 分間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。**

注: ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを 3 分毎に 10 秒間ボルテックスします。

**A4. スピンドウンして 2 ml チューブの蓋の内側に付着した液滴を回収する。**

**A5.** 250  $\mu$ l のエタノール (96 ~ 100%) を添加し、蓋を閉め、15 秒間ボルテックスで完全に混和する。

注：効率的な結合を行なうためには、サンプルとエタノールが完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。

**A6.** スピンドアウンして 2 ml チューブの蓋の内側に付着した液滴を回収する。

**A7.** QIAamp MinElute<sup>®</sup> Column (2 ml コレクションチューブ中) のカラムの縁を濡らさないように注意して、ステップ 6 の全ライセート 700  $\mu$ l をアプライし、蓋を閉める。

**A8.** 6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。コレクションチューブのフロースルーを注意して捨て、QIAamp MinElute Column をコレクションチューブに戻す。

**A9.** ステップ 6 のライセートの残りを QIAamp MinElute Column にカラムの縁を濡らさないように注意してアプライし、蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。

**A10.** QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。遠心操作の後、ライセートが完全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う。

**A11.** QIAamp MinElute Column を注意深く開け、カラムの縁を濡らさないように 500  $\mu$ l の Buffer AW1 を添加する。蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。

**A12.** QIAamp MinElute Column を注意深く開け、カラムの縁を濡らさないように 700  $\mu$ l の Buffer AW2 700  $\mu$ l を添加する。

**A13.** 蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。

注：QIAamp MinElute Column とフロースルーが接触しないように注意します。遠心ローターによっては減速の際に振動し、エタノールを含んだフロースルーが QIAamp MinElute Column に接触することがあります。また QIAamp MinElute Column とコレクションチューブをローターから取り出す際、フロースルーが QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。

**A14.** 静かに QIAamp MinElute Column を開き、縁を濡らさないように 700  $\mu$ l のエタノール (96 ~ 100%) を添加する。蓋を閉め 6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。

**A15.** QIAamp MinElute Column を新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。

**A16. 最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で 3 分間遠心操作してメンブレンを完全に乾燥させる。**

注：溶出液へのエタノールのキャリーオーバーはダウンストリームのアプリケーションで問題になることがあるので、このステップは重要です。

**A17. 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ (別途準備) に QIAamp MinElute Column をセットし、フロースルーを含むコレクションチューブを捨てる。QIAamp MinElute Column の蓋を注意深く開け、室温 (15 ~ 25°C) で 10 分間あるいは 56°C で 3 分間インキュベートする。**

**A18. 20 ~ 100 µl の Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。**

重要：Buffer ATE あるいは蒸留水を室温に戻したことを確認します。カラムに結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。ダウンストリームのアプリケーションに応じて容量を調節します。少量で溶出すると溶出液中の最終 DNA 濃度は増加しますが、DNA 収量は全体的に減少します。回収される溶出液量は、カラムにアプライした溶出バッファ量よりも 5 µl (最大) 少なくなります。

**A19. 蓋を閉め、室温で 1 分間インキュベートする。最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。**

注：Buffer ATE あるいは水をアプライした QIAamp MinElute 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、DNA 収量は一般に増加します。

## Appendix B : EZ1 Advanced XL での DNA 抽出

EZ1 Advanced XL で Lyse&Spin Basket のコレクションチューブを使用するためには、フリップキャップチューブ・ラックと対応するプロトコルカードが必要になります。コレクションチューブは、ラックのスロットにセットし、“Large-Volume Protocol” を使用します。

Investigator Lyse&Spin コレクションチューブの蓋を切り離して、BioRobot® EZ1 および EZ1 Advanced 装置で処理できます。

BioRobot EZ1、EZ1 Advanced あるいは EZ1 Advanced XL での自動抽出には “Large-Volume Protocol” を使用します。

## Appendix C : QIAasymphony での DNA 抽出

QIAasymphony SP プラットフォームは、2 ml フリップキャップサンプルチューブとの互換性がまだありません。QIAasymphony SP に関しては、全ライセートを適切なサンプルチューブに移してください。あるいは Investigator Lyse&Spin コレクションチューブの蓋を切り離して使用できます。

QIAasymphony SP モジュールでの自動抽出には “Casework 500 µl Protocol” を使用します。

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube™, QIASymphony™, BioRobot®, MinElute® (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。

最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては [www.qiagen.co.jp](http://www.qiagen.co.jp) の “Trademarks and Disclaimers” をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は [www.qiagen.co.jp](http://www.qiagen.co.jp) から入手可能です。

© 2013 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)

