

QIAamp® DNA FFPE Tissue 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、パラフィン包埋した（FFPE）組織
切片からのゲノム DNA 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 分離	2
トラブルシューティング	5



プロトコール：FFPE 組織切片からのゲノム DNA 分離

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温で行ないます（15～25℃）。
- 英語版 Handbook 11～13 ページの “Important Notes” をご覧ください。

実験を始める前の準備事項

- 全てのバッファを室温に戻します。
- ステップ 11 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。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水浴を使用できます。
- Buffer AL あるいは 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し沈殿物を溶かします。
- 英語版 Handbook 13 ページの説明に従って Buffer AW1 および Buffer AW2 を調製したことを確認します。

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. 5～10 μm の厚さの切片を 8 枚カットする（英語版 Handbook 11 ページの “Starting material” を参照）。
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. 組織切片を即座に 1.5 あるいは 2 ml マイクロ遠心チューブ（別途準備）に入れ、サンプルにキシレン 1 ml を添加する。蓋を閉めて 10 秒間ボルテックスで激しく混和する。
4. 室温（15～25℃）で最高速度、2 分間遠心分離する。
5. 上清をピペットで除去する。ペレットが剥がれないように注意する。
6. ペレットにエタノール（96～100%）1 ml を添加し、ボルテックスで混和する。
残留しているキシレンをサンプルからエタノールで抽出します。
7. 室温（15～25℃）で最高速度、2 分間遠心分離する。
8. 上清をピペットで除去する。ペレットが剥がれないように注意する。
細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きます。
9. チューブの蓋を開け、室温（15～25℃）あるいは最高 37℃ まででインキュベートする。10 分間あるいはエタノールが蒸発するまでインキュベートする。
10. 180 μl の Buffer ATL でペレットを再懸濁する。Proteinase K 溶液 20 μl を添加し、ボルテックスにより混和する。
11. 56℃ で 1 時間（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。

12. 90℃で1時間インキュベートする。

Buffer ATL 中で 90℃のインキュベーションにより、核酸のホルムアルテヒド修飾が部分的に元に戻ります。記載以上のインキュベーション時間あるいは高温度のインキュベーションにより、フラグメント化した 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、56℃でのインキュベーション後、ヒートブロックが 90℃になるまでサンプルを室温に静置しておきます。

13. 1.5 ml チューブを数秒間遠心操作し、蓋の内側に付いたサンプルを回収する。

RNA フリーのゲノム DNA が必要な場合は、RNase A (100 mg/ml) 2 μ l を添加し、室温で 2 分間インキュベートしてからステップ 14 に進みます。RNase A の添加前にサンプルを室温まで冷やしてください。

14. Buffer AL 200 μ l をサンプルに添加し、ボルテックスで十分に混和する。エタノール (96 ~ 100%) 200 μ l をサンプルに添加し、再びボルテックスで十分に混和する。

サンプル、Buffer AL および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、完全に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 QIAamp 調製法に影響しません。

15. 1.5 ml チューブをスピンドウンし、蓋の内側に付いたサンプルを回収する。

16. カラムの縁を濡らさないように注意してライセート全量を QIAamp MinElute® Column (2 ml のコレクションチューブにセット済み) に慎重にアブライシ、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。

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います。

17. QIAamp MinElute Column を注意して開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l の Buffer AW1 を添加する。蓋を閉めて 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。

18. **QIAamp MinElute Column** を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように **500 μ l** の **Buffer AW2** を添加する。蓋を閉めて **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。

QIAamp MinElute Column とフロースルーが接触しないように注意します。ある種の遠心ローターで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。

19. 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。

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に影響を及ぼすことがあるので、このステップは必要です。

20. 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** の蓋を静かに開き、**20 ~ 100 μ l** の **Buffer ATE** をメンブレンの中央にアプライする。

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 μ l) で溶出を行なう際には、カラム結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer ATE をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column では溶出バッファの量は、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調節可能です。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 μ l (最高) 少なくなります。

21. 蓋を閉めて、室温 (**15 ~ 25°C**) で 1 分間インキュベートする。最高速度 (**20,000 x g ; 14,000 rpm**) で 1 分間遠心操作する。

Buffer ATE 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。

トラブルシューティング

コメント

溶出液中の DNA が少ないか皆無

- a) サンプルの溶解が不十分 Proteinase K を高温で長期保存した。新しいサンプルと新しく調製した 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。
- b) 96 ~ 100%エタノールではなく低濃度のものを使用した 新しいサンプルと 96 ~ 100%エタノー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。
- c) Buffer AW1 あるいは Buffer AW2 の調製が不正確 英語版 Handbook 13 ページの記載に従って、Buffer AW1 および AW2 濃縮液を 96 ~ 100%エタノールで正確に希釈したことを確認する。

DNA を用いたダウンストリームの酵素反応で良好な実験結果が得られない

- a) ホルムアルデヒド修飾により、DNA が切断あるいはブロック化 QIAamp DNA FFPE Tissue 操作での 90℃ におけるインキュベーションでほとんどのホルムアルデヒド修飾を除去できるが、FFPE 組織切片から精製した DNA は、新鮮あるいは凍結組織から精製した DNA を用いた酵素反応と同じ性能が得られないことがある。PCR の増幅産物はできるだけ短く設定することを推奨する (<500 nt)。
- b) 感度が低下 増幅反応に適した溶出液の最大量を定める。増幅反応液に添加する溶出液量を調節する。溶出バッファの量はこれに比例して調節する。
- c) 長期保存した洗浄バッファを使用前に十分に混和していない 洗浄バッファである Buffers AW1 および AW2 の塩とエタノール成分が長期間保存した後分離した。使用前に常にバッファを完全に混和する。
- d) エタノールのキャリーオーバー DNA を溶出する前にメンブレンを完全に乾燥させるため、新しいコレクションチューブを用いて最高速度で必ず遠心操作する。

一般的な操作

- QIAamp MinElute Column の目詰まり 溶解が不完全なためにメンブレンが目詰まりした。サンプルを完全に溶解するために溶解時間を延長する。

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, 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 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

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

