

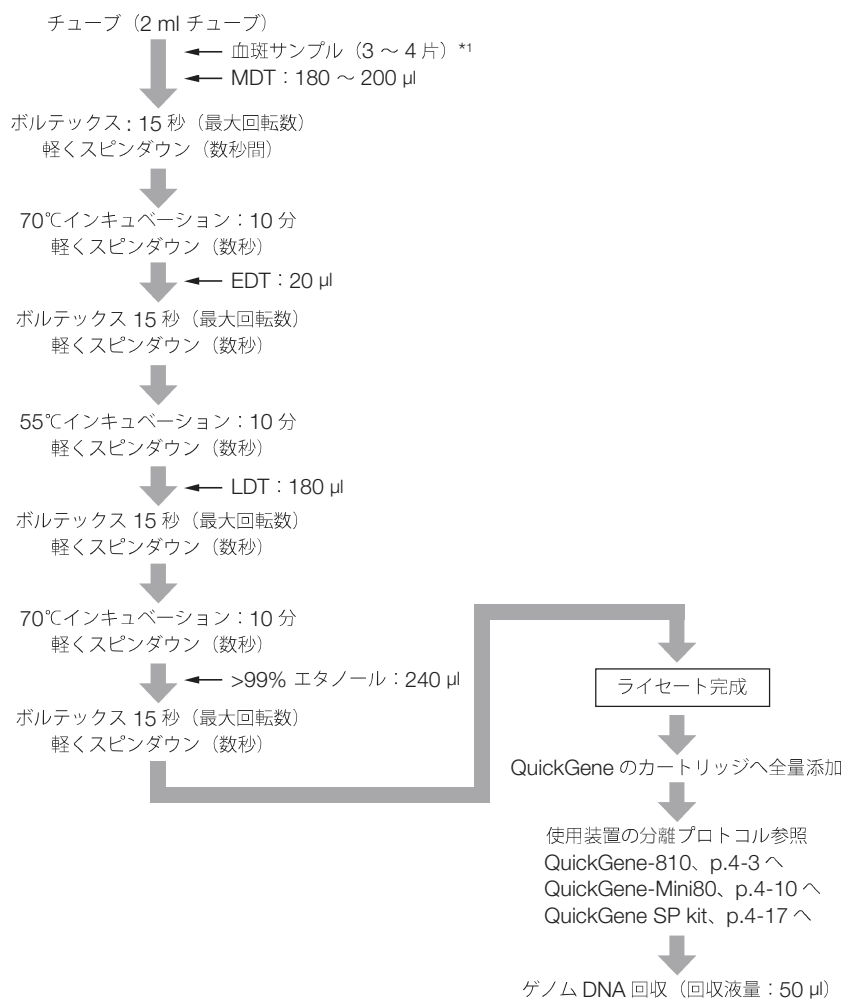
3-II-iii 章

他の動物サンプルからのゲノム DNA 分離

DA-c-1

血斑からのゲノムDNA分離

プロトコル



*1 ろ紙あるいはハンチ穴紙から。

結果

電気泳動図
データなし

ゲノム DNA の収量

収量 (µg)	1	2	3	平均
	0.31	0.33	0.26	0.30

タンパク質の混入 : A260/280
データなし

カオトロピック塩の混入 : A260/230
データなし

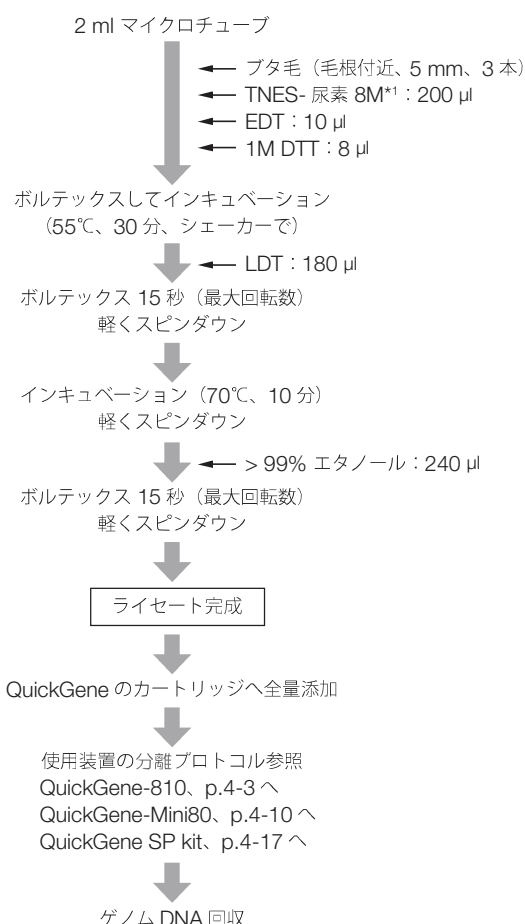
その他
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

ブタ毛からのゲノムDNA分離

プロトコル



*1 <TNES-尿素 8M>
10mM トリス塩酸 pH7.5
125mM 塩化ナトリウム (NaCl)
10mM エチレンジアミン四酢酸
(EDTA)
1% ドデシル硫酸ナトリウム
(SDS)
8M 尿素

結果

電気泳動図

データなし

ゲノム DNA の収量

毛の数	収量 (μ g)
3 本	3.9

タンパク質の混入 : A260/280

毛の数	A260/280
3 本	1.91

カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

その他

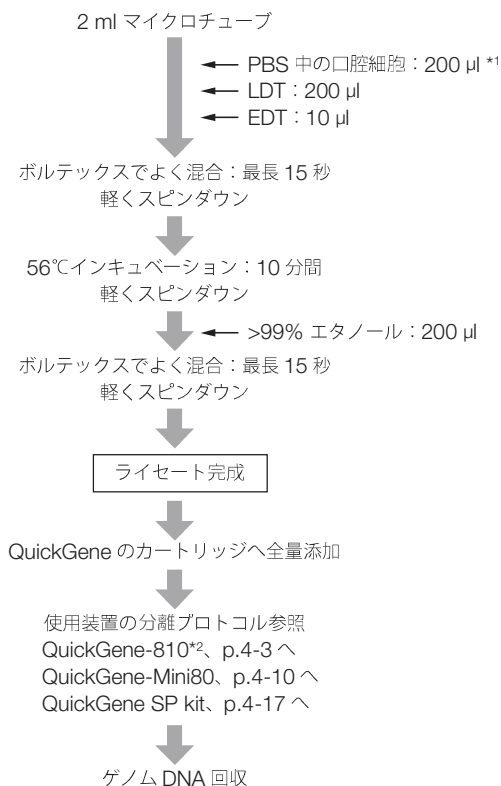
データなし

共通プロトコルサンプル

毛根

口腔スワブからのゲノムDNA分離

プロトコル



*1 綿球で、口腔細胞を 200 - 400 µl の PBS バッファーに懸濁してください。
1 サンプルに対して 200 µl の溶液を使用してください。

*2 "ELUT DIP TM" パラメーターを 90 に変更してください。

結果

■ 電気泳動図

データなし

■ ゲノム DNA の収量

データなし

■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

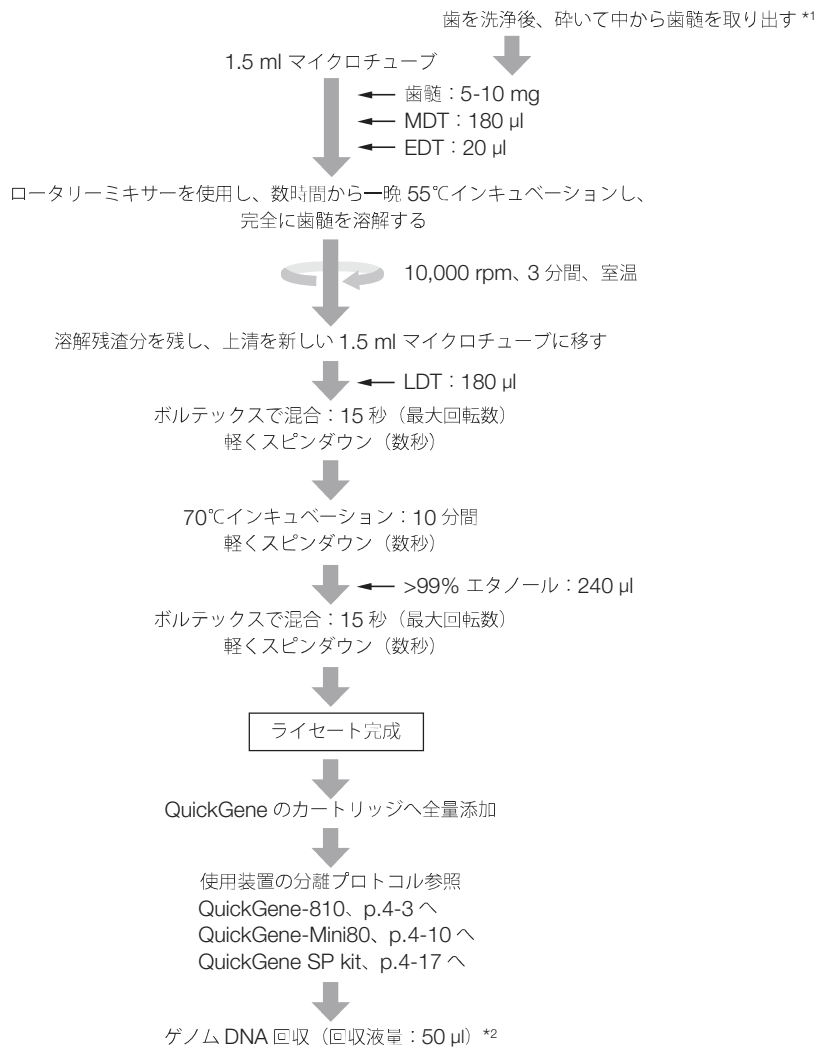
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

歯髄からのゲノムDNA分離

プロトコル



*1 歯が新しいサンプルでない場合、歯を砕いた後で歯髄腔から歯髄を掻き出す。

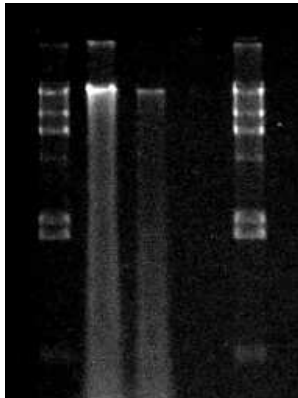
*2 分離 DNA の収量は、歯の状態によって異なる。

結果

- a：屋内で 5 年経過した歯（歯髄の量：10 mg）
b：屋内で 5 年経過した歯（歯髄の量：7 mg）
c：屋外で 3 ヶ月経過した歯（歯髄の量：5 mg）

電気泳動図

M a b c M



M：λ DNA/Hind III digest

- a：屋内で 5 年経過した歯（歯髄の量：10 mg）
b：屋内で 5 年経過した歯（歯髄の量：7 mg）
c：屋外で 3 ヶ月経過した歯（歯髄の量：5 mg）

ゲノム DNA の収量

サンプル	a	b	c
収量 (μg)	1.9	1.2	0.1

タンパク質の混入：A260/280

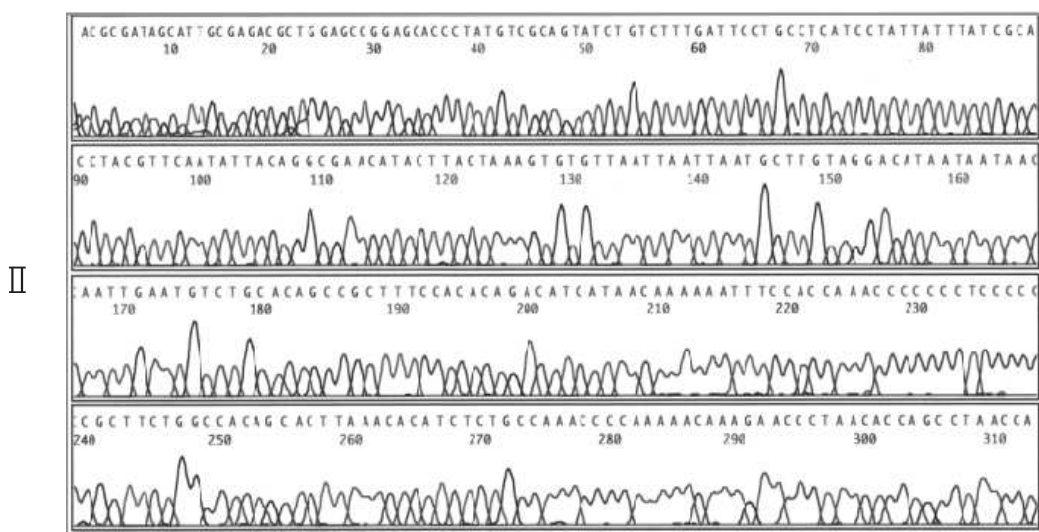
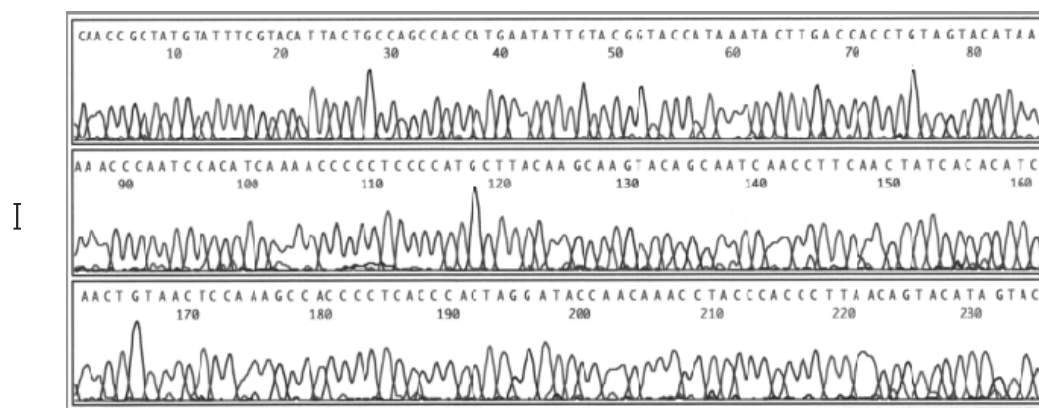
サンプル	a	b	c
QuickGene-810	1.87	1.65	1.05

カオトロピック塩の混入：A260/230

サンプル	a	b	c
QuickGene-810	1.58	1.41	0.63

その他

- QuickGene-810 を用いて分離したゲノム DNA で、*HVR I* および *HVR II* をターゲットに行ったシーケンス解析。



I : *HVR I* (塩基数：16079-16313)

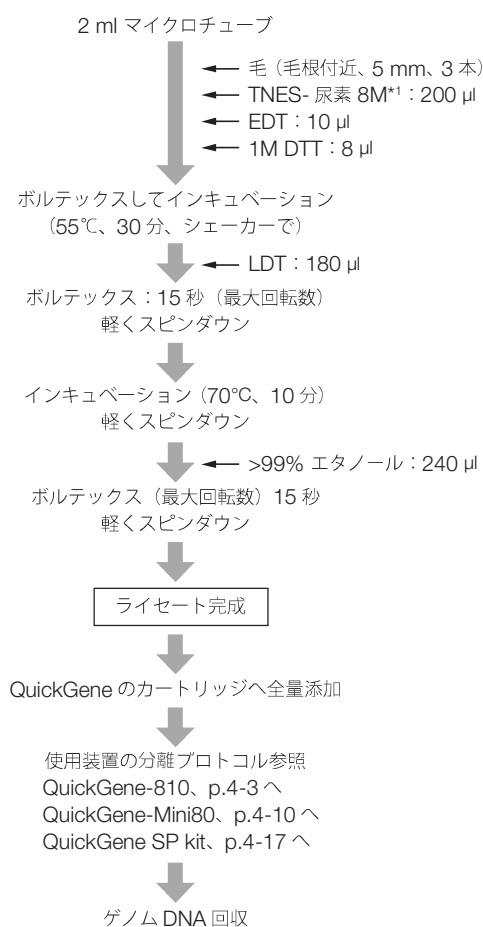
II : *HVR II* (塩基数：77-388)

共通プロトコルサンプル

データなし

毛根からのゲノムDNA分離

プロトコル



*1 <TNES-尿素 8M>
10mM トリス塩酸 pH7.5
125mM 塩化ナトリウム (NaCl)
10mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)
1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)
8M 尿素

結果

- 電気泳動図
データなし
- ゲノム DNA の収量
データなし
- タンパク質の混入 : A260/280
データなし
- カオトロピック塩の混入 : A260/230
データなし
- その他
データなし

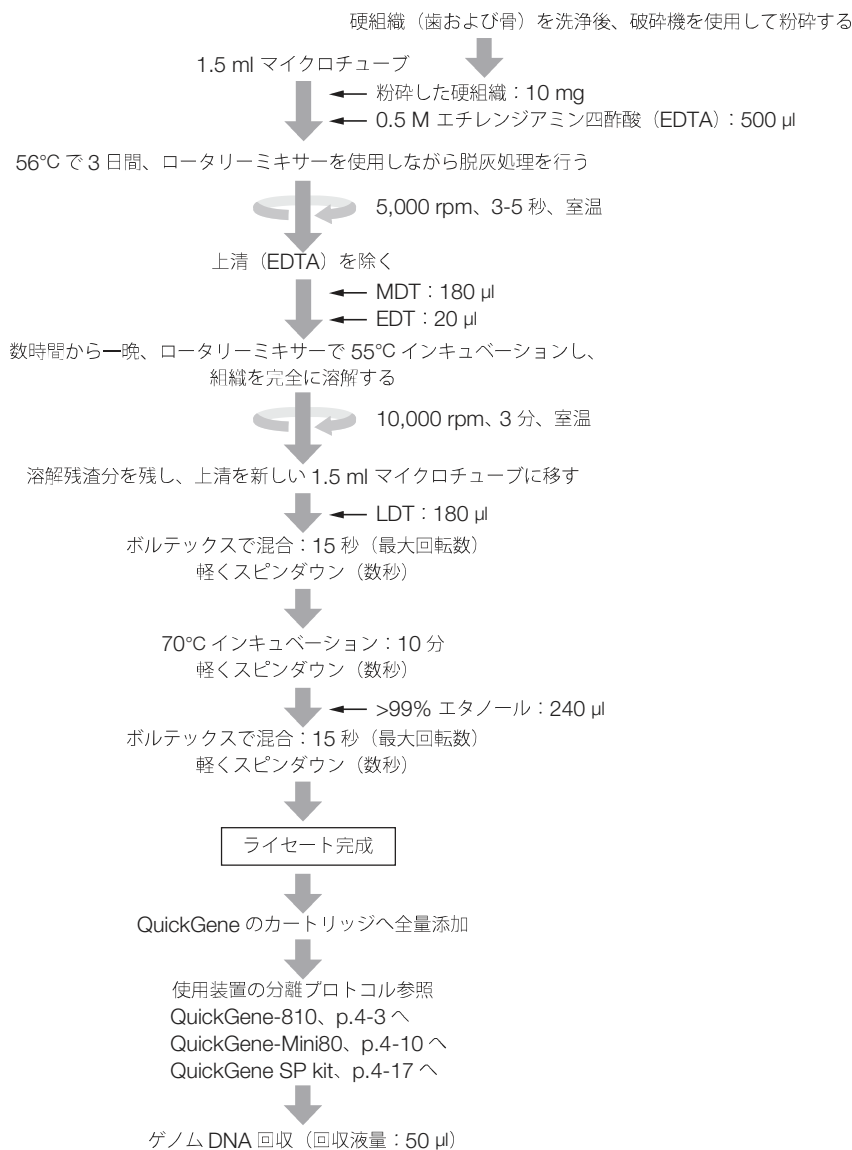
共通プロトコルサンプル

ブタ毛

DA-c-6

硬組織(歯および骨)からのゲノムDNA分離

プロトコル



結果

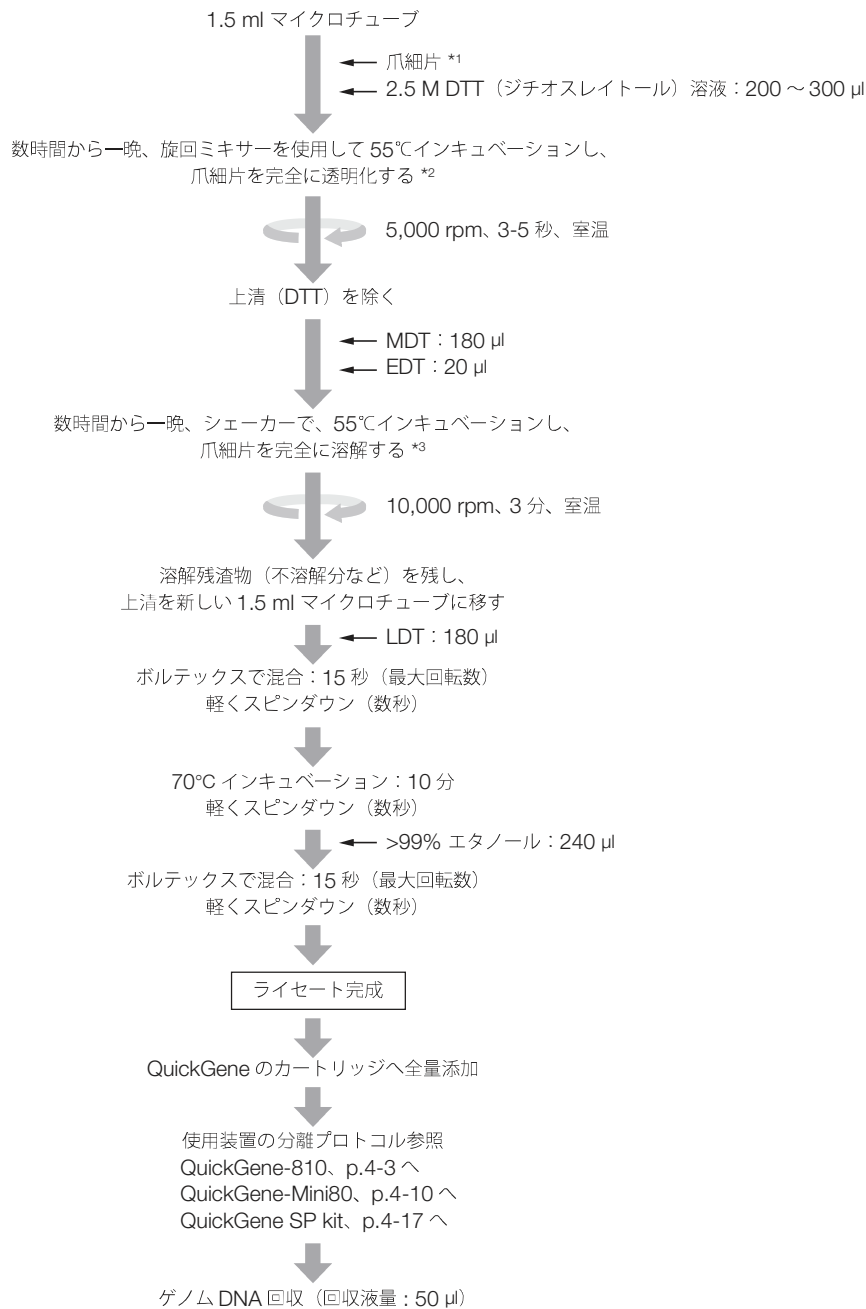
- 電気泳動図
データなし
- ゲノム DNA の収量
データなし
- タンパク質の混入：A260/280
データなし
- カオトロピック塩の混入：A260/230
データなし
- その他
データなし

共通プロトコルサンプル

データなし

爪からのゲノムDNA分離

■ プロトコル



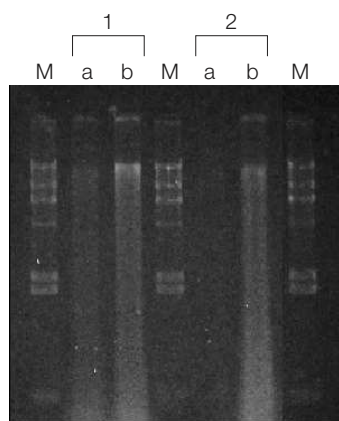
*1 爪 (5 ~ 15 mg) を 100% エタノールで洗浄。次に精製水で洗浄し、細かく切る。できるだけ細かく切った方が溶けやすくなります。

*2 透明化するまでの時間は爪の量と大きさにより異なります。(細切した爪 5 mg なら約 2 時間)

*3 爪 15 mg を使用した場合、細切の仕方により一部が溶け残ることがあります。

結果

電気泳動図



M : λ -Hind III digest
 1 : QuickGene (a: 爪 5 mg, b : 爪 10 mg)
 2 : A 社 (a : 爪 5 mg, b : 爪 10 mg)

ゲノム DNA の収量 (ng)

サンプル量	5 mg	10 mg	15 mg
QuickGene	235	655	835
スピнкаラム法 (A 社)	165	725	800

タンパク質の混入 : A260/280

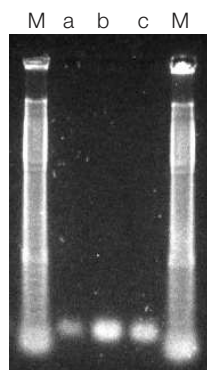
サンプル量	5 mg	10 mg	15 mg
QuickGene	1.81	1.93	1.76
スピнкаラム法 (A 社)	1.77	1.78	1.47

カオトロピック塩の混入 : A260/230

サンプル量	5 mg	10 mg	15 mg
QuickGene-800	1.57	1.62	0.95
スピнкаラム法 (A 社)	0.73	0.90	0.35

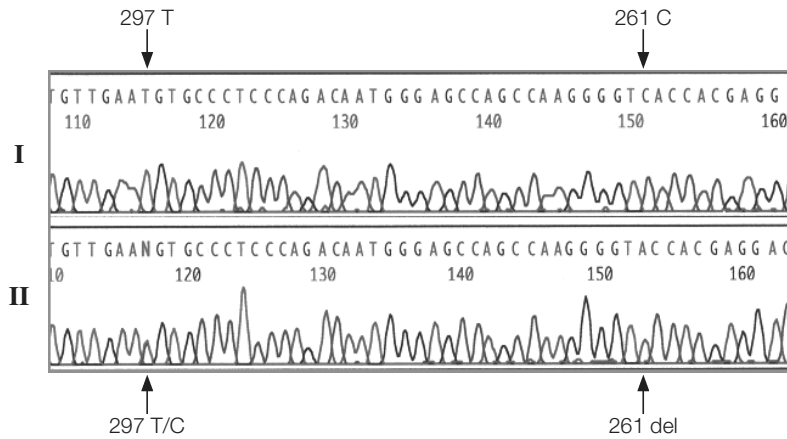
その他

• PCR

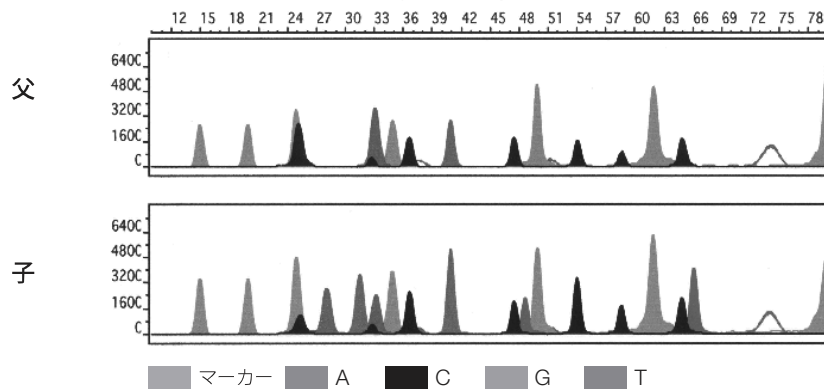


ターゲット : ABO 遺伝子 Exon 6
 M : 100 bp ladder
 a : ゲノム DNA 0.1 ng/ul
 b : ゲノム DNA 0.4 ng/ul
 c : ゲノム DNA 1.0 ng/ul

• シーケンス



• SNPs 解析



塩基数 (bp)	261	297	703	判定
父	C	A	G	A/A 型
子	A/C	A/G	G	A/O ^G 型

主な遺伝子型には、A、B、O^A、O^G の 4 遺伝子から成る 10 種類 (AA, AB, AO^A, AO^G, BB, BO^A, BO^G, O^AO^A, O^AO^G, O^GO^G) があります。QuickGene-810 システムを用いて分離したゲノム DNA で、SNPs 解析による親子鑑定を行うことができます。

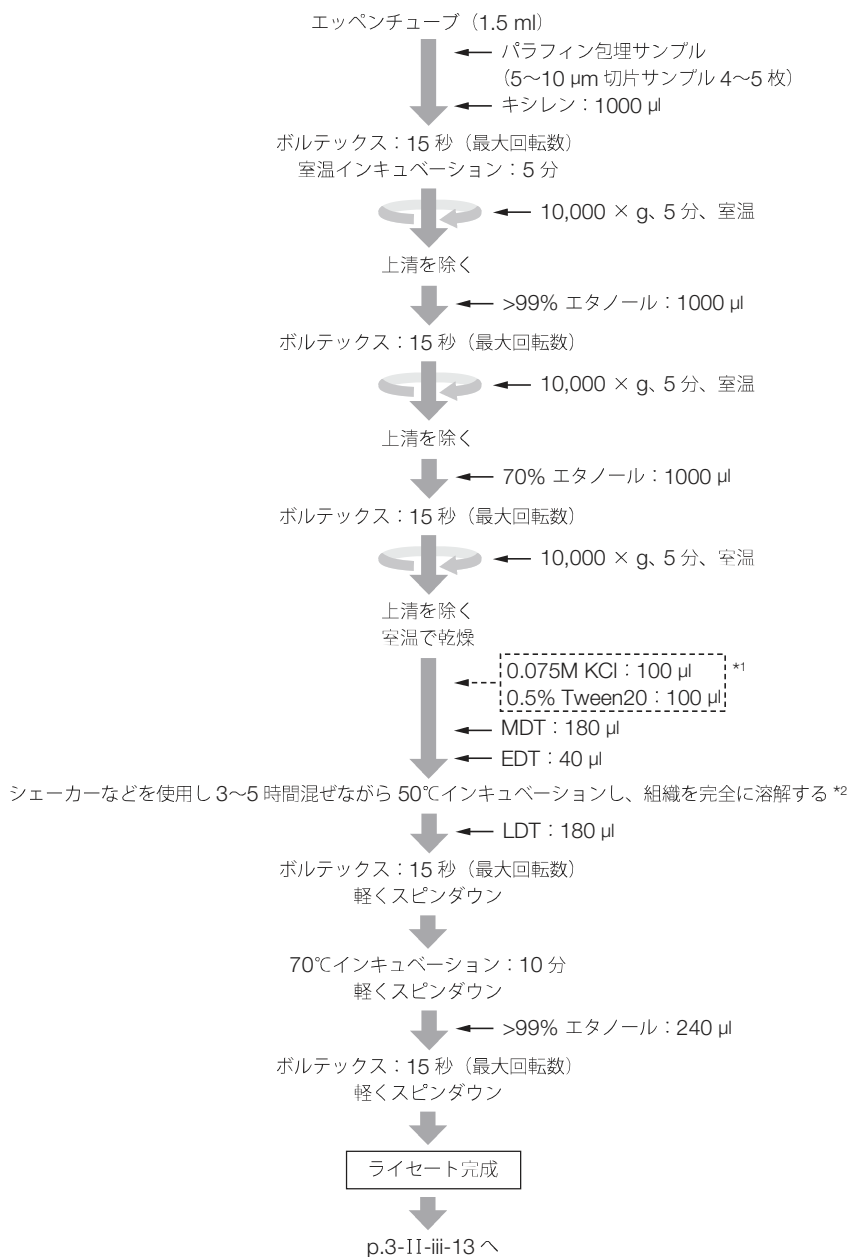
共通プロトコルサンプル

データなし

DA-c-8

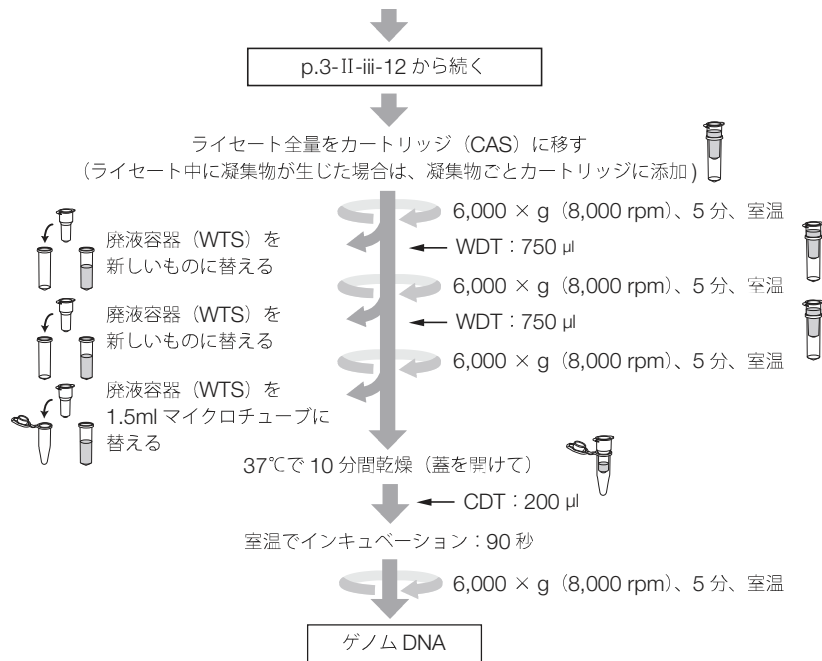
パラフィン包埋サンプルからのゲノムDNA分離

プロトコル



*1 組織によっては、これらの試薬の添加で収量が増します。

*2 硬組織の場合には、EDT の増加により収量が増します。一晩溶解操作をすると収量が減ることに注意してください。



結果

電気泳動図

データなし

ゲノム DNA の収量

サンプル	癌 1	癌 2
QuickGene	1.43 μg	0.58 μg
スピнкаラム法 (A 社)	1.36 μg	0.44 μg

タンパク質の混入 : A260/280

サンプル	癌 1	癌 2
QuickGene	1.99	1.90
スピнкаラム法 (A 社)	1.98	2.41

カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

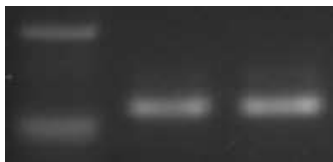
その他

• PCR

QuickGene SP kit DNA tissue および A 社キット (スピнкаラム法) を用いてパラフィン包埋癌サンプルから分離したゲノム DNA で、*β-actin* 遺伝子の検出を行った。

癌 1

M スピнкаラム法 (A 社) QuickGene



いずれのゲノム DNA からでも *β-actin* 遺伝子を検出できた。

技術協力：日本医科大学 外科学講座 原田 明希様

共通プロトコルサンプル

データなし

DA-c-9

唾液からのゲノムDNA分離

プロトコル

Oragene®・DNA キット (DNA Genotek Inc.) *1 で採取し、
インキュベーション (50℃、2 時間) した唾液サンプル：4 ml

↓
2 ml の Oragene/ 唾液サンプルを新しいチューブに移す

← 2-ME : 2 ml

↓
ボルテックス：15 秒 (最大回転数)
軽くスピンドウン

↓
室温インキュベーション：30 分

← LDT : 2 ml

↓
ボルテックス：15 秒 (最大回転数)
軽くスピンドウン

↓
70℃インキュベーション：10 分

← > 99% エタノール : 2.4 ml

↓
ボルテックス：15 秒 (最大回転数)
軽くスピンドウン

ライセート完成

↓
QuickGene のカートリッジへ全量添加

↓
QG-610L のマニュアルおよび DNA whole blood kitL のハンドブックを参照して
分離操作を行ってください。

↓
ゲノム DNA 回収 (回収液量：500 μl)

*1 このキットは登録製品ではありませんので御注意ください。
詳細に就いてはライフサイエンス
事業部にお問い合わせください。

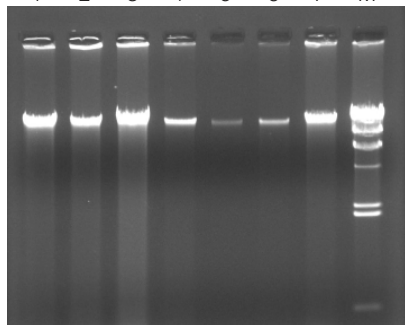
結果

Oragene/ 唾液サンプル No.1：女 1 No.2：女 2 No.3：女 3 No.4：男 1
 No.5：男 2 No.6：男 3 No.7：男 4

電気泳動図

QuickGene-610L を用いて唾液サンプルから分離されたゲノム DNA で電気泳動を行った。

1 2 3 4 5 6 7 M



電気泳動条件：1% アガロース / 1 x TAE

1：No.1 女 1
2：No.2 女 2
3：No.3 女 3
4：No.4 男 1
5：No.5 男 2
6：No.6 男 3
7：No.7 男 4
M：λ-Hind III

検出機：LAS-3000 (富士フイルム)

分離したゲノム DNA に分解は認められなかった。

ゲノム DNA の収量

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7
収量 (μg)	37.0	43.5	61.6	18.5	2.9	5.7	27.1

■ タンパク質の混入：A260/280

サンプル	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7
純度 (A260/280)	1.80	1.70	1.86	1.85	1.52	1.71	1.74

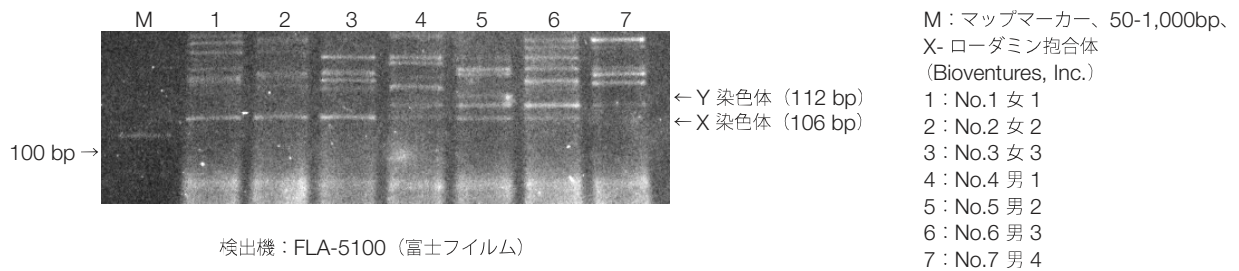
■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

■ その他

● 性別の判定解析

PowerPlex® 16 システムを用いて、縦列型反復配列 (STR、Short Tandem Repeat) に対するマルチプレックス PCR と分離 DNA の性差解析を行った。アメロゲニン遺伝子は X 染色体と Y 染色体に存在する。この断片差長はドナーの性識別に用いることができる。PowerPlex キットによるマルチプレックス PCR を用いると、性別の判定が 100% 精度で可能である。この事は、Oragene・DNA で採取され QuickGene-610L システムで精製された唾液 DNA が、STR 断片解析において良い成果を表すことを示す。



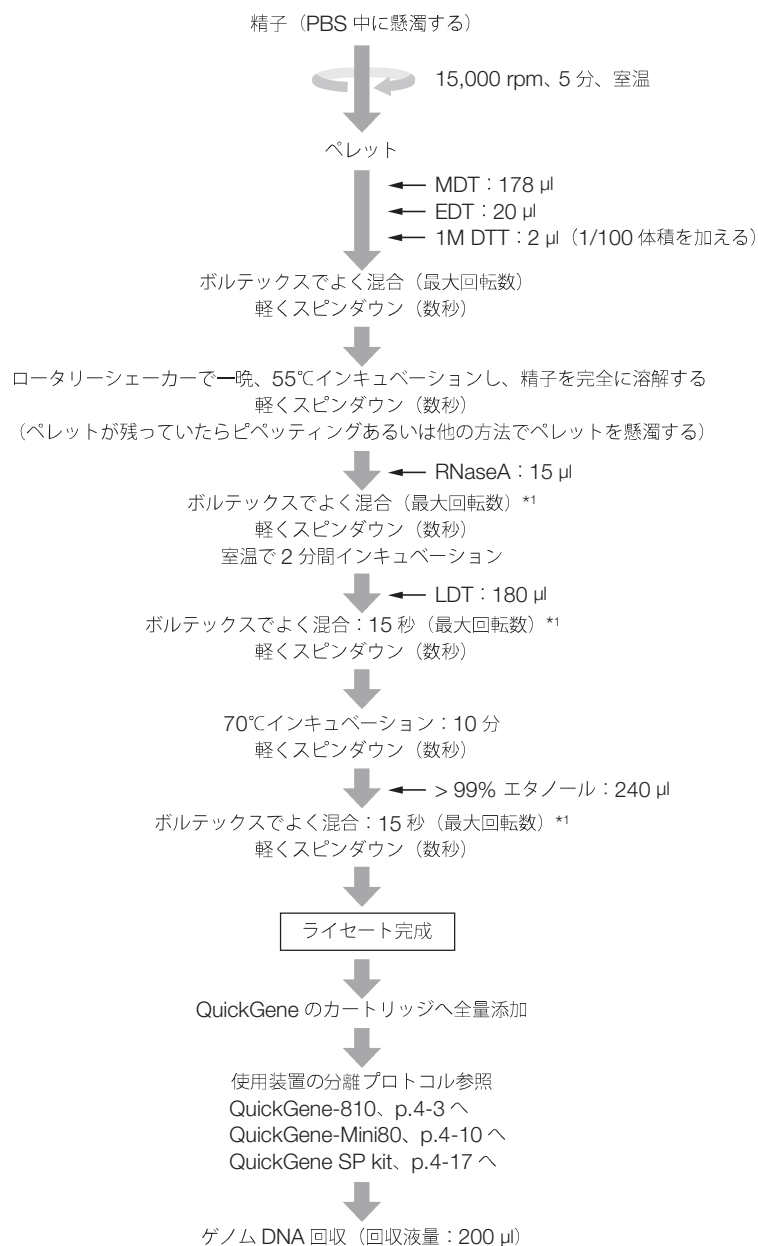
■ 共通プロトコルサンプル

データなし

DA-c-10

マウス精子からのゲノムDNA分離

プロトコル



*1 ボルテックス (最大回転数) で完全に混合してください。ボルテックスで混合不十分ならば、タッピング、ピペッティングまたは転倒混和を使用してください。

結果

電気泳動図

データなし

ゲノム DNA の収量 (µg)

精子数	2.3×10^6	1.1×10^6
QuickGene-810	3.99	3.99
フェノール/クロロホルム法	5.48	2.20

タンパク質の混入：A260/280

精子数	2.3×10^6	1.1×10^6
QuickGene-810	1.75	1.73
フェノール/クロロホルム法	1.6	1.93

カオトロピック塩の混入：A260/230

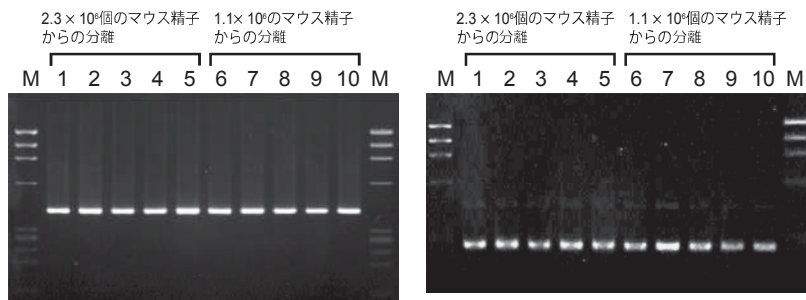
データなし

その他

• バイサルファイト処理と PCR

QuickGene-810システムあるいはフェノール/クロロホルム法を用いて分離されたマウス精子ゲノムDNA 1 μ g をバイサルファイト処理を施し PCR テンプレートに使用した。

バイサルファイト処理した DNA 250 ng を用いて、H19、Igf2r の DMR (Differentially methylated regions) をターゲットに PCR を効果的に行った。



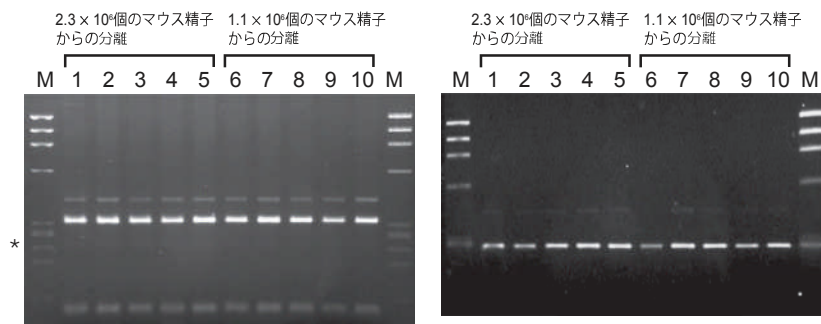
M : ϕ x 174/*Hae* III マーカー
1-4, 6-9 : QuickGene-810
5, 10 : フェノール/クロロホルム

H19 バイサルファイト PCR 電気泳動図

Igf2r バイサルファイト PCR 電気泳動図

• COBRA (combined bisulfite restriction assay) による DNA メチル化解析

3) で得られた、H19 DMR、Igf2r DMR の PCR 生成物を、それぞれ制限酵素 HpyCH4IV、Csp45I により切断した。



M : ϕ x 174/*Hae* III マーカー
1-4, 6-9 : QuickGene-810
5, 10 : フェノール/クロロホルム

H19 COBRA 電気泳動図

Igf2r COBRA 電気泳動図

H19 DMR は、ほとんど完全にメチル化されており、Igf2r DMR は脱メチル化されている。

* バンドは非メチル化バンドを示す。

したがって QuickGene-810 で分離した精子 DNA はフェノール/クロロホルム分離法と同様に、メチル化部分を保持したまま分離できることが確認された。

共通プロトコルサンプル

データなし

