

DNA 組織キット
QuickGene-AutoS DNA Tissue Kit
(AS-DT)

Ver.1.2

Contents

1. はじめに	4
2. キット内容物と保存条件	4
2 - 1. キット内容物	4
2 - 2. 保存条件	4
2 - 3. 試薬ストリップの内容物	5
3. キット以外にご準備いただくもの	5
4. 取扱上の安全注意事項	7
5. 使用上の注意事項	8
6. 品質管理	11
7. 製品説明	11
8. プロトコール	12
8 - 1. 試薬の準備	12
8 - 2. ライセート作製プロトコール	13
8 - 3. 試薬ストリップの準備	14
8 - 4. QG-Auto12S/24S 分離操作	15
9. トラブルシューティング	16
10. オーダーリング・インフォメーション	18

ご注意

本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。
診断および臨床用試薬として使用しないでください。

1. はじめに

本キットは、QuickGene-Auto12S(以下 QG-Auto12S)、あるいは QuickGene-Auto24S(以下 QG-Auto24S)の抽出工程で使用する試薬を処理サンプル個別に封入した試薬キットです。

本キットの特徴は以下のとおりです。

- 本キットと QG-Auto12S、あるいは QG-Auto24S をご使用いただくことにより、簡便・迅速に動物組織からゲノム DNA を抽出することができます。
- 抽出時間は以下のとおりです。
 - ・ QG-Auto12S:約 30 分 *12 サンプル同時に抽出操作を行うことができます。
 - ・ QG-Auto24S:約 30 分 *24 サンプル同時に抽出操作を行うことができます。
- タンパク質やカオトロピック塩を含まない、高純度のゲノム DNA が得られます。得られた高品質のゲノム DNA は PCR、制限酵素処理、NGS 解析などのアプリケーションに適しています。

2. キット内容物と保存条件

2 - 1. キット内容物

以下の内容物が入っていますので確認してください。

キットには 48 処理分のゲノム DNA 抽出試薬と消耗品が含まれています。

<input type="checkbox"/> Proteinase K EDT	1.25 ml
<input type="checkbox"/> Tissue Lysis Buffer MDT	12.5 ml
<input type="checkbox"/> 試薬ストリップ	48 個
<input type="checkbox"/> 1 ml Long Tips	48 個
<input type="checkbox"/> Waste Tubes	48 個

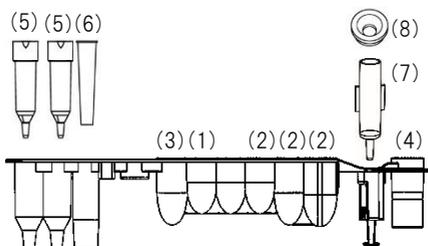
2 - 2. 保存条件

指定の温度(15℃～28℃)で保存してください。有効期限は外箱に表示しています。より安定に保つため EDT は開梱後、冷蔵(2～8℃)で保存することをお勧めします。

2 - 3. 試薬ストリップの内容物

試薬ストリップ 1 本あたり、以下の内容物が入っています。

<input type="checkbox"/>	Lysis Buffer	LDT	270 μ l		下図(1)
<input type="checkbox"/>	Wash Buffer	WDT	750 μ l	x 3 箇所	下図(2)
<input type="checkbox"/>	(>99%)Ethanol	EtOH	240 μ l		下図(3)
<input type="checkbox"/>	Elution Buffer	CDT	250 μ l		下図(4)
<input type="checkbox"/>	Short Tip		2 個		下図(5)
<input type="checkbox"/>	Tip pack		1 個		下図(6)
<input type="checkbox"/>	Cartridge		1 個		下図(7)
<input type="checkbox"/>	Pressure Adapter		1 個		下図(8)



3. キット以外にご準備いただくもの

① 試薬

※必要に応じて用意していただく試薬

- RNase A

[推奨品]

- Ribonuclease A : Sigma-Aldrich Cat. No. R5125^{*1, *2}
R5500^{*1, *2}
R6513^{*1}
R4642
- Ribonuclease A : MP Biomedicals Cat. No. 101076^{*1, *2}
- RNase A : AMRESCO Cat. No. 0675^{*1, *2}
- RNase A : QIAGEN Cat. No. 19101
- RNase A : Life Technologies Cat. No. 12091

*1 : 10mM Tris HCl pH7.5, 15mM NaCl を用いて 100mg/ml 溶液を調製してください。

*2 : R5125, R5500, 101076, 0675 は 100°C, 15 分処理をして DNase を失活してから使用してください。

②器具・機材

- QuickGene-Auto12S/QuickGene-Auto24S
- マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ
- 2 ml マイクロチューブ(サンプル用)

推奨品：BM 機器 Cat. 4020、SARSTEDT Cat.72.695.700、Cat.72.695.500S

推奨品以外のチューブを使用する場合は、事前にストリップ及び装置ヒーター部分との適合性を確認してください。

- 1.5 ml or 2 ml マイクロチューブ(DNA 回収用に使用)

推奨品：BM 機器 Cat.BM4015、Cat.BM4020、SARSTEDT Cat.72.706.700

推奨品以外のチューブを使用する場合は、事前にコレクションホルダーとの適合性を確認してください。

- チューブスタンド
- マイクロ遠心機(8,000×g(10,000rpm)程度の遠心が可能なもの)
- シェーカー(55°Cでシェーキングできるもの)

4. 取扱上の安全注意事項

◆ EDT (Proteinase K)

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

● 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ MDT (Tissue Lysis Buffer)

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

● 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

● この薬品を扱う場合は、適切な保護手袋および保護めがねを着用してください。

◆ LDT (Lysis Buffer)

薬品の特性：● 飲むと有害の可能性があります。

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

● 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

● この薬品を扱う場合は適切な保護手袋および保護めがねを着用してください。

◆ WDT (Wash Buffer)

薬品の特性：● 引火性の液体を含むので、火気に十分注意してください。

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

● 火気に注意するとともに、吸入、皮膚への接触に十分注意してください。

● 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ CDT (Elution Buffer)

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

● 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ EtOH (Ethanol)

薬品の特性：● 引火性の高い液体なので、火気に十分注意してください。

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

● 火気に注意するとともに、吸入、皮膚への接触に十分注意してください。

● 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ 試薬ストリップは、指定の温度(15℃～28℃)以外での使用、保存は避けてください。

◆ LDT を含む溶液や廃液は、絶対に漂白剤と混合しないでください。

◆ 感染性のおそれのあるサンプルを使用する場合

感染性のおそれのあるサンプルを扱う場合は、適切な保護具を着用してください。

◆ 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、廃棄する場合

感染性産業廃棄物に該当しますので、関連する法に従い、焼却、溶解、滅菌、消毒などの処理をしてください。なお、処分業者に委託する場合は、特別管理産業廃棄物処分の許可を受けた業者へ、特別管理産業廃棄物管理票(マニフェスト)を添えて処理を委託してください。

◆参考情報

各試薬の性状および取り扱いに関する詳細情報は、SDS(安全データシート)をお読みください。SDSは弊社ホームページ(<https://www.kurabo.co.jp/bio/>)からダウンロードできます。

5. 使用上の注意事項

◆サンプルに関する注意事項

- 本キットは基本的に動物組織 5mg からのゲノム DNA の分離に対応しています。

表1: 処理可能最大組織量

Balb/c マウス(メス、7週齢)正常組織での例です。

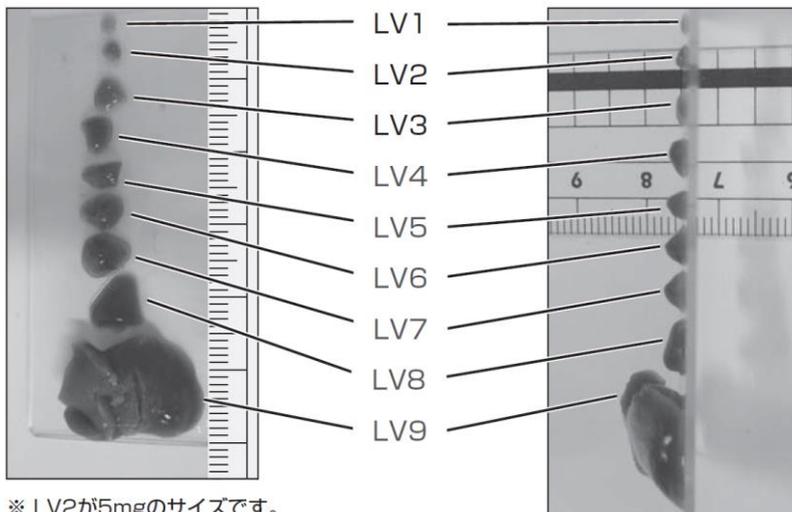
組織部位	処理可能最大組織量
肝臓	10 mg
肺	10 mg
腎臓	10 mg

- 処理可能最大組織量は組織の状態、部位などにより変動します。組織部位、状態、消化の状態によっては処理可能最大組織量が表1に示した量より少なくなることもあります。
- 本キットではじめて分離されるサンプルの場合は、組織量 5mg から分離をスタートし、予備実験を行ってください。
- 処理可能量を超えた組織量をオーバーロードしてしまうと、性能が顕著に低下し、最悪の場合カートリッジ(CA)が目詰まりを起こす可能性があります。
- ゲノム DNA と共に RNA が精製されます。RNA の混入が好ましくない場合は、RNase 処理を行ってください。
- サンプルを室温で放置したり、凍結、融解を繰り返した場合、ゲノム DNA が分解したり収量が低下することがあります。
- 図1にマウス正常組織(肝臓)の重量とサイズの対応例を実寸大で示します。組織重量の参考にしてください。

図1: マウス正常組織(肝臓)の重量とサイズの対応例

Balb/c マウス(メス、7週齢)正常組織での例です。

No.	実測値	長 軸	短 軸	高 さ	
LV1	2.3 mg	1.5 mm	1.5 mm	0.5 mm	処理可能範囲
LV2	5.0 mg	2.0 mm	2.0 mm	1.0 mm	
LV3	11.6 mg	4.0 mm	4.0 mm	1.0 mm	
LV4	16.2 mg	5.0 mm	4.0 mm	2.0 mm	適用外
LV5	21.7 mg	5.0 mm	3.5 mm	2.5 mm	
LV6	25.6 mg	6.0 mm	5.0 mm	2.5 mm	
LV7	30.7 mg	7.0 mm	5.0 mm	2.5 mm	
LV8	56.7 mg	8.0 mm	7.0 mm	2.5 mm	
LV9	850.2 mg	20.0 mm	14.0 mm	8.0 mm	



◆ 試薬に関する注意事項

- MDT は保存中に析出物を生じることがあります。析出物が生じた場合、55°Cで溶解後、室温に戻してから使用してください。

◆ 操作に関する注意事項

- 運転開始前に、以下の点を確認してください。
 - コレクションホルダーに Waste Tube、1.5 ml or 2 ml マイクロチューブ(回収用容器)がセットされていること

-
- 試薬ストリップに 1 ml Long Tip、2 ml マイクロチューブ(全血と EDB 入り)がセットされていること
 - 試薬ホルダーに試薬ストリップが正常にセットされていること
 - 試薬ホルダーのフタが完全に閉まっていること
 - 試薬ホルダー、コレクションホルダーがホルダーガイドに正しくセットされていること
 - すべての操作は室温(15~28°C)で行ってください。低温または高温での使用の場合、キットの性能が発揮されないことがあります。詳しい作業環境情報については、QG-Auto12 S/24S 本体取扱説明書をお読みください。
 - やむを得ない場合を除き、運転の途中で装置の電源を切らないでください。同じ工程からの運転再開はできません。
 - 詳しくは、QG-Auto12S/24S の本体取扱説明書をお読みください。

6. 品質管理

- 品質管理基準を設け、全てのロットで品質に問題のないことを確認しています。
- ゲノム DNA の収量や品質は 260 nm の吸光度、260 nm/280 nm の吸光度比によって確認しています。

7. 製品説明

本キットは、動物組織からのゲノムDNAの分離に対応します。基本処理可能量は5mgです。マウス正常組織より本キットを用いて分離した際のゲノムDNA収量、純度例(A260/280)は表2のとおりです。

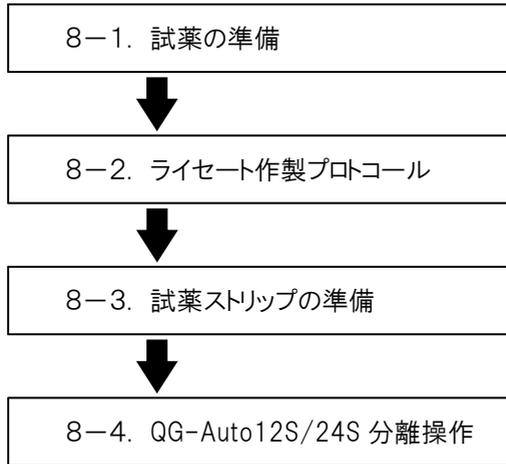
表2 ゲノムDNAの収量例(RNase 処理あり)

組織	5mg あたり収量例	A260/280
肝臓	5.5 μ g	2.05

- 収量はサンプルの状態により変動します。
- 凍結サンプルで、凍結、融解を繰り返した場合、ゲノムDNA収量や分子量が低下することがあります。
- ゲノムDNAと共にRNAが精製されます。RNAの混入が好ましくない場合は、RNase処理を行ってください。
- 肝臓などRNAを多く含む組織の処理量が多い場合、標準のRNAase処理をしてもRNAを十分分解できないことがありますので、RNaseの使用条件を検討してください。
- CDT量の初期値は 200 μ l です。最低回収量は 50 μ l まで設定可能ですが、溶出効率が低下する可能性があります。

8. プロトコール

〔Overview Flow Chart〕



8 - 1. 試薬の準備

◆MDT

使用前に十分混合してください。

析出物が生じた場合は、55°Cで溶解後、室温に戻してから使用してください。

◆RNase A (RNase処理をする場合)

RNase Aはキットには含まれていません。p.5の推奨RNase Aを準備してください。

8 - 2. ライセート作製プロトコール



ご注意

<1>から<5>の工程の順序は必ずお守りください。

順序を変えた場合、目的の収量が得られない可能性があります。

- 薬品による負傷、感染リスクを抑えるため、適切な保護具を着用してください。
- 試薬ストリップ、各チューブを使用する際はヌクレアーゼの混入を避けるため、手袋を着用してください。
- 詳しくは QG-Auto12S/24S の本体取扱説明書をお読みください。

<1>動物から切除した新鮮または凍結組織を準備してください。

組織サンプルは所定量(基本的には 5mg)を使用してください。

組織量が多すぎた場合、目詰まり、顕著な収量減少、精度低下の可能性があります。目詰まりした場合は、組織量を減らして検討してください。

室温で組織を放置しないでください。ゲノムDNAが分解してしまいます。

<2>組織をハサミ、ハンマーなどで 1.5~2mm角の小ブロックにして動物組織重量を測定し、2mlマイクロチューブに入れてください。MDTを 180 μ l、続いてEDTを 20 μ l 添加します。

凍結組織を使用する場合、組織を室温にしてから直ちにMDTを添加してください。

新鮮な組織を使用する場合は、所定量の組織へ直ちにMDTを添加してください。

<3>55°Cにて攪拌しながら、組織を完全に溶解させます。攪拌しなかった場合、所定量の組織でも完全に溶解しない場合があります。できれば加温できるシェーカーなどで攪拌してください。加温できるシェーカーをお持ちでない場合は、ヒートブロックなどを使用し、時々ボルテックスして組織をよく溶解してください。

溶解時間は組織の種類により変わります。例えば、脳・肺・腎臓の場合は16時間程度、肝臓の場合は3時間程度を目安としてください。溶解しにくい場合は、時間を延長してください。

<4>不溶物を除くため、8,000 \times g(およそ10,000rpm)、3分、室温にて遠心します。

残渣分(溶け残り、ゼラチン状のもの)を吸い取らないように、新しい2mlマイクロチューブに上清を移してください。

2 ml マイクロチューブ推奨品: BM 機器 Cat.BM4020

SARUSTEDT Cat.72.695.700、Cat.72.695.500S

<5>RNase処理

ゲノムDNAと共にRNAが精製されます。RNAの混入が好ましくない場合は、RNase処理を行ってください。RNase処理をしない場合は、「8 - 3. 試薬ストリップの準備」へ進んでください。

RNase Aを20 μ l 添加してください(Cat. No. 12091(Life Technologiesの場合は60 μ l)。タッピングやピペッティング5回、またはボルテックスを5秒程度行うことでRNase Aをサンプル液とよく混ぜてください。数秒間スピンドウンして、マイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集します。室温にて2分間インキュベーションします。

RNase Aは3-①(p.5)を参照して推奨品を使用し、DNaseフリーでないRNase Aを使用する場合は、DNase不活化処理(100°Cにて15分インキュベーション)をしてください。
組織の種類によりRNA含有量が違います。含有量が低い組織の場合、使用するRNase A量を減量することができます。

8 - 3. 試薬ストリップの準備

- 試薬ストリップ、各チューブを使用する際はヌクレアーゼの混入を避けるため、手袋を着用してください。
- 詳しくは QG-Auto12S/24S の本体取扱説明書をお読みください。

<1>作業台にコレクションホルダーと試薬ホルダーを準備します。

<2>コレクションホルダーにウェイトチューブと、1.5 ml あるいは 2.0 ml マイクロチューブをセットします。

<3>試薬ストリップを箱から取り出して試薬ホルダーにセットし、ライセートの入った 2 ml マイクロチューブと 1 ml Long Tip を所定の位置に挿します。試薬ストリップの内容物が正しい位置にセットされていることを確認してください。

8 - 4. QG-Auto12S/24S 分離操作

- 運転開始前に QG-Auto12S/24S の取扱説明書をよくお読みください。
- 試薬ストリップ、各チューブを使用する際はスクレーパーの混入を避けるため、手袋を着用してください。

<1> コレクションホルダーと試薬ホルダーを装置にセットします。

<2> 装置本体の電源を入れます。

初期チェックと初期動作を行った後、ホームポジションに停止します。

<3> ホーム画面で「DNA TISSUE」を選択します。

<4> 「Elution Volume」欄でご希望の溶出液量を選択します。

<5> 「Check List」欄に記載のある消耗品が、試薬ホルダーとコレクションホルダー、あるいは試薬カートリッジに装填されていることを確認します。装填されていればチェックボックスをタッチしてチェックマークを入れます。

<6> 「Next」ボタンをタッチします。

<7> 「Protocol Information」の記載内容を確認して「Start」ボタンをタッチすると運転が開始されます。

- 抽出操作が始まると操作パネルに抽出工程が表示されます。

- 運転状況は工程名 (LYSIS, BINDING, WASH, ELUTE, FINISH) の点滅によって確認できます。

- 運転中は本体のフロントドアを開けないでください。万一フロントドアを開けた場合は、QG-Auto12S/24S の取扱説明書をお読みになって動作を再開してください。

- 一時停止をする場合は、操作パネルの「Pause」ボタンをタッチしてください。終了の確認画面が表示されますので、「Yes」を押して終了してください。

<8> 運転が終了するとビーブ音が鳴り、工程名が「FINISH」と表示され点滅します。

装置が完全に停止していることを確認した後、フロントドアを開け、試薬ホルダーとコレクションホルダーを取り出し、回収チューブを取り出します。

- マウス肝臓5mgからの標準的なゲノム DNA 回収量は 5.5 µg です。

- すぐに DNA を使用しない場合はチューブの蓋をしっかりと閉め、4°C または -20°C で保存してください。長期間ゲノム DNA を保存する場合は -20°C での保存をお勧めします。

9.トラブルシューティング

トラブルが生じた場合には、以下の対策を参照してください。

(1)DNAの収量が低い、DNAが得られない

原因	対策
組織の保存方法が不適切	組織の種類、大きさ、量、保管期間、保存条件でゲノムDNA収量は変わります。不適切な保存条件では収量が低下します。適切な条件でサンプルを保存してください。動物から組織を取り出したら、所定量を直ちにMDTへ浸すか、直ちに液体窒素で凍らせ、凍結（-20℃または-80℃）保存してください。
組織溶解が不完全	EDTを含むMDTに、組織を完全に浸して溶解してください。 溶解するときに、組織を細かく切ってください。 加温できるシェーカーを用いてシェーキングを行い、よく攪拌してください。 シェーカーを使用しない場合は、55℃にて加温しながら時々ボルテックスで混和してください。必要に応じて溶解インキュベーション時間を延長してください。 組織量が5mg以上の場合で、本キットで初めて分離する組織の場合は、組織5mgあたりのEDT:MDT比が20 μl:180 μlになるように比例計算で調整してください。組織溶解後の遠心上清を混合するときは、遠心上清のうち200 μlを採取してください。
組織量が多すぎた	所定量まで組織量を減らしてください(表1 p.8参照)。
DNAの分解	(3)「DNAが分解した」参照

(2)カートリッジ(CA)が詰まった

原因	対策
組織量が多すぎた	所定量まで組織量を減らしてください(表1 p.8参照)。
組織溶解が不完全	EDTを含むMDTに、組織を完全に浸して溶解してください。 溶解するときに、組織を細かく切ってください。 加温できるシェーカーを用いてシェーキングを行い、よく攪拌してください。 シェーカーを使用しない場合は、55℃にて加温しながら時々ボルテックスで混和してください。必要に応じて溶解インキュベーション時間を延長してください。
組織の不溶解物が詰まった	MDTとEDTで溶け残った残渣を、遠心(8,000×g(10,000rpm)、3分)して取り除いてからLDTを添加してください。

(3)DNAが分解した

原因	対策
組織の保存方法が不適切	組織の種類、大きさ、量、保管期間、保存条件でゲノムDNA収量は変わります。不適切な保存条件では収量が低下します。適切な条件でサンプルを保存してください。動物から組織を取り出したら、所定量を直ちにMDTへ浸すか、直ちに液地窒素で凍らせ、凍結（-20℃または-80℃）保存してください。

(4)DNAの純度が低い

原因	対策
組織溶解が不完全	EDTを含むMDTに、組織を完全に浸して溶解してください。 溶解するときに、組織を細かく切ってください。 加温できるシェーカーを用いてシェーキングを行い、よく攪拌してください。 シェーカーを使用しない場合は、55℃にて加温しながら時々ボルテックスで混和してください。必要に応じて溶解インキュベーション時間を延長してください。

(5)PCRなど、続けて行う実験がうまくいかない

原因	対策
使用したDNA量が不適切	260nm 吸光度から濃度を確認してください。
DNAの純度が低い	(4)「DNAの純度が低い」参照
DNAの分解	(3)「DNAが分解した」参照

(6)試薬に析出物が生じた

原因	対策
低温で保存している	指定の温度(15~28℃)で保存してください。 析出物が生じた場合は、MDTは 55℃、試薬ストリップは 37℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。

10. オーダーリング・インフォメーション

製 品	内 容	Cat #
QuickGene-AutoS DNA Blood Kit	48 回入	AS-DB
QuickGene-AutoS DNA Tissue Kit	48 回入	AS-DT
QuickGene-AutoS Plasmid Kit	48 回入	AS-PL
QuickGene-AutoS RNA Blood Kit	48 回入	AS-RB
QuickGene-AutoS RNA Tissue Kit	48 回入	AS-RT
QuickGene-AutoS RNA Cultured Cell Kit	48 回入	AS-RC

＊トレードマークと免責事項

本取扱説明書に記載されている登録名などは、特に表示がない場合でも法律によってその権利が保証されています。



●製造元

倉敷紡績株式会社

環境メカトロニクス事業部 バイオメディカル部

〒572-0823 大阪府寝屋川市下木田町14-30

TEL (072) 820-3079 FAX (072) 820-3095

URL; <http://www.kurabo.co.jp/bio/>