

DNA全血キット(スピン法)

**QuickGene SP kit DNA whole blood
(SP-DB)**

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
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	6
5. 使用上の注意事項	7
6. 品質管理	7
7. 製品説明	8
8. プロトコール	8
8-1 試薬の準備	8
8-2 分離フローおよびプロトコール詳細	9
9. トラブルシューティング	13
10. オーダリング・インフォメーション	16
付録1 QuickGene SP kit DNA whole blood (SP-DB) データ例 ..	17

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

薄さ80 μ mの多孔質フィルターを用い、加圧法による核酸分離システムを実現しました。

このキットの特徴は以下のとおりです。

- このキットをご使用いただくことにより、簡便・迅速に全血(200 μ l)からゲノムDNAを分離することができます。
- 約35分で分離操作が完了します(8サンプルを処理した場合)。
- 高純度(タンパク質やカオトロピック塩を含まない)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、サザンブロットティングなどのアプリケーションに適しています。

このキットをご使用になる際は、本ハンドブックをよくお読みください。

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96処理分のゲノムDNA分離用試薬が含まれています。

☐ Protease	EDB	1本
☐ Lysis Buffer	LDB	30ml
☐ Wash Buffer	WDB	125ml
☐ Elution Buffer	CDB	100ml
☐ Cartridges (カートリッジ)	CAS	96個
☐ Waste Tubes (廃液容器)	WTS	192個

2-2 保存条件

指定の温度(15 ~ 28℃)で保存してください。試薬は指定の温度で保存した場合、購入後1年間安定です。溶解したEDBは冷蔵(4℃)で保存する場合、2カ月間安定です。

溶解後のEDBを-20℃で保存することで、酵素の安定期間を長くすることが可能です。その場合は少量ずつ分注するなどして、凍結、解凍の繰り返しは避けてください。

3. キット以外にご準備いただくもの

①試薬

- 特級エタノール (>99%) (ライセート調製時およびWDBの調製に使用)
- ヌクレアーゼフリー水 (EDBの溶解に使用)

②器具・機材

- マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ
- 1.5mlマイクロチューブ (前処理およびDNA溶出時に使用)
- チューブスタンド
- チューブミキサー (2,500rpm程度の攪拌ができるもの)
- マイクロ遠心機 (6,000×g (8,000rpm) の遠心が可能なもの)*
 - * 遠心機によっては使用できないケースがありますので、遠心機の仕様をご確認の上、使用してください。
- ヒートブロックまたはウォーターバス (56℃で使用可能なもの)

4. 取扱上の安全注意事項

◆ Protease EDB

- 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は、水で十分に洗ってください。

◆ LDB (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。

◆ WDB (Wash 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は、水で十分に洗ってください。

◆ CDB (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は、水で十分に洗ってください。

◆ LDBは、温度の高い場所での使用、保存は避けてください。

◆ LDBを含む溶液やフロースルーは、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、使用後廃棄する場合

感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用後廃棄する場合は、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、熔融、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業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扱いに関する詳細情報は、MSDS（製品安全データシート）を参照してください。MSDSは弊社ホームページ（<http://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

- 白血球数が 2×10^6 個を超えた場合、DNA収量が低下することがあります。この場合はPBS (滅菌済み) 等で希釈して 2×10^6 個以下になるように調製してください。
また、白血球数が 5×10^6 個を超えた場合、カートリッジ (CAS) が詰まる可能性があります。PBS (滅菌済み) 等で希釈して分離を行うことをお勧めします。
- 検体の容量が $200 \mu\text{l}$ 以下の場合、PBS (滅菌済み) 等で希釈して $200 \mu\text{l}$ になるように調製してください。
- EDTA・2Na、EDTA・2Kまたはヘパリンで採血した全血を使用してください。
- 全血は、できる限り採血後3日以内のものを使用してください。長期間保存した後の血液を用いた場合、収量の低下や、DNAの分解を生じることがあります。

◆試薬に関する注意事項

- EDBにヌクレアーゼフリー水を添加後は時々攪拌しながら室温に30分以上置き、粉末が完全に溶解していることを確認してから使用してください。溶解が不十分の場合、目的の収量が得られないことやカートリッジ (CAS) が詰まる可能性があります。
- LDBは、温度の高い場所での使用、保存は避けてください。
- LDBやフロースルーは、絶対に漂白剤と混合しないでください。

◆操作に関する注意事項

- チューブミキサーは $2,500\text{rpm}$ 以上の攪拌ができるものを使用してください。ボルテックスが弱いと溶解が不十分となり、目的の収量が得られないことやカートリッジ (CAS) が詰まる可能性があります。
- カートリッジ (CAS) を廃液容器 (WTS) にセットする時はしっかりと押し込んでください。
- 遠心する際はカートリッジ (CAS) の蓋をしっかりと閉めてください。
- 分離の途中では時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- 収量はサンプルの状態により変動します。標準的なゲノムDNA収量は $4 \sim 8 \mu\text{g}$ です。
- すべての操作は室温 ($15 \sim 30^\circ\text{C}$) 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。
- 遠心機内の温度が上昇するのを防ぐため、遠心機の連続運転は避けてください。分離性能に悪影響を及ぼすことがあります。
- 遠心を行う際は、指定された条件 (回転数、時間など) を守って使用してください。

6. 品質管理

- キットロット間の性能差がないことを確認しています。
- ゲノムDNAの収量や品質は 260nm の吸光度、 $260\text{nm}/280\text{nm}$ の吸光度比によって確認しています。

7. 製品説明

本キットを使用した場合、DNAとRNAが溶出液中に回収されます。全血200 μ lから分離したDNAの収量および純度 (A260/280) を表1に示します。

収量はサンプルの状態により変動します。

表1

サンプル	DNA収量 (μ g)	A260/280
全血 (200 μ l)	4 ~ 8	1.97

8. プロトコール

8-1 試薬の準備

◆EDB (凍結乾燥品)

凍結乾燥品を含む瓶に3.3mlのヌクレアーゼフリー水を添加し、完全に溶解させてください。溶解したEDBは冷蔵 (4℃) で保存する場合、2カ月間安定です。溶解後のEDBを-20℃で保存することで、酵素の安定期間を長くすることが可能です。その場合は少量ずつ分注するなどして、凍結、解凍の繰り返しは避けてください。

ご注意

EDBは以下の方法で完全に溶解させてから使用してください。

3.3mlのヌクレアーゼフリー水を添加後、蓋をして転倒混和する。

時々攪拌しながら室温に30分以上置き、粉末が完全に溶解していることを確認してから使用してください。溶解が不十分の場合、目的の収量が得られないことやカートリッジ (CAS) が詰まる場合があります。

◆LDB (30ml)

使用前に十分に混和してください。

析出物が生じた場合は、37℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。

◆WDB (125ml)

濃縮状態でお届けします。

使用前に、ボトルに125mlの特級エタノール (>99%) を添加し、よく混和してください。エタノール添加後はボトル蓋ラベルの「ethanol added?」チェックボックスにチェックを入れてください。また、エタノール添加後は揮発を防ぐために、ボトルの蓋をしっかりと閉めてください。

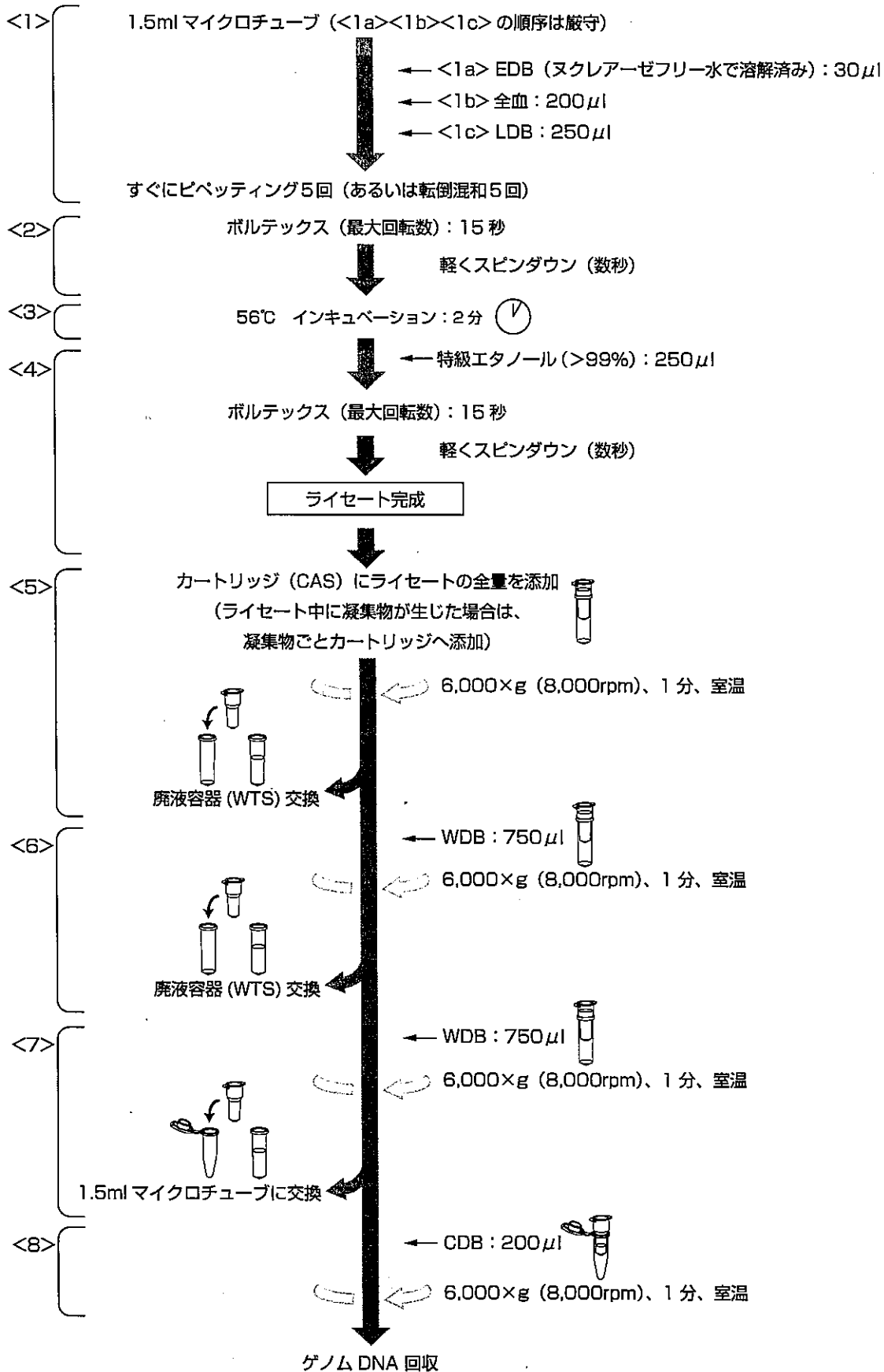
◆CDB (100ml)

ゲノムDNA溶出時には、必ずCDBを使用してください。

8-2 分離フローおよびプロトコール詳細

- 試薬類は室温に戻してから使用してください。
- ヒートブロックまたはウォーターバスを56℃に設定してください(ステップ<3>で使います)。
- WDBに125mlの特級エタノールが添加されていることを確認してください。
- キットは1処理あたり全血200 μ lに対応しています。EDTA・2Na、EDTA・2Kまたはヘパリンで採血した全血を使用してください。
- サンプルおよび試薬の液量は分離フロー (p.10)に記載された量を厳守してください。
- 検体間のコンタミネーションを防ぐために毎回ピペットチップを交換することをお勧めします。
- カートリッジ(CAS)内のフィルターにピペットチップが触れないよう注意してください。
- すべての操作は室温(15 ~ 30℃)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。
- 分離の途中では時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- 遠心機内の温度が上昇するのを防ぐため、遠心機の連続運転は避けてください。分離性能に悪影響を及ぼすことがあります。
- LDBを含む溶液やフロースルーは、絶対に漂白剤と混合しないでください。
- 遠心を行う際は、指定された条件(回転数、時間など)を守って使用してください。
- 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用後廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので適切な処理を行ってください。
- 遠心後、遠心機からカートリッジ(CAS)と廃液容器(WTS)を取り出す際は、フロースルーがカートリッジに付着しないよう注意深く取り出してください。付着した場合は、軽くスピンドウン(数秒)を行ってください。
- 6,000×g(8,000rpm)以上で遠心を行ってもDNAの収量や純度に変化はありませんが、8,000×g(10,000rpm)を超えないよう注意してください。

分離フロー



プロトコル詳細

<1> <1a>から<1c>までの工程の順序は必ずお守りください。EDBを1.5mlマイクロチューブに添加した後、直接LDBを添加しないでください。順序を変えた場合、目的の収量が得られなくなります。

<1a> EDB (ヌクレアーゼフリー水で溶解済み) 30 μ lを1.5mlマイクロチューブの底に添加します。

<1b> 全血200 μ lを添加します。

全血添加後、直ちに<1c>にお進みください。

長時間放置した場合、目的の収量が得られないことがあります。

<1c> LDB 250 μ lを添加し、すぐにピペッティングを5回行います。

ピペッティングの代わりに転倒混和を5回行っても構いません。

確実に溶解を行うために、LDB添加後の液を十分に混合することは極めて重要です。

ピペッティング (あるいは転倒混和) を確実にを行い、EDB、全血、LDBが十分に混合するようにしてください。

<2> 最大回転数で15秒間ボルテックスします。数秒間スピンドアウンして、マイクロチューブのキャップや壁に付着した液を収集します。

ボルテックスは、回転数を最大にして15秒間確実に行ってください。推奨は、2,500rpm以上です。これ以下の回転数のボルテックスしかお持ちでないときは、<1c>でのピペッティング (あるいは転倒混和) を念入りに行ってください。

混合が不充分の場合、目的の収量が得られないことやカートリッジ (CAS) が詰まる場合があります。

<3> 56°Cで2分間インキュベートします。

インキュベーション時間の延長は、5分までは収量に影響しません。

<4> 特級エタノール (>99%) を250 μ l添加し、最大回転数で15秒間ボルテックスします。数秒間スピンドアウンして、マイクロチューブのキャップや壁に付着した液を収集します (ライセート完成)。

サンプルとエタノールが十分に混合するようにしてください。ボルテックスは、<2>と同様の回転数をお使いください。

<5> 〈ライセート添加〉<1>～<4>で調製したライセート全量を注意深くカートリッジ (CAS) へ添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、室温にて6,000×g (8,000rpm) で1分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器を注意深く取り出します。新しい廃液容器 (WTS、キット同梱) にカートリッジをセットし、フロースルー (ろ液) と廃液容器を捨てます。

ライセート中に凝集物が生じた場合は、ピペッティングにより凝集物を浮かせ、すべての凝集物ごとカートリッジに添加します。

ライセート完成後は、速やかに分離操作を行ってください。やむを得ず放置される場合は、ライセート完成後30分以内に分離してください。

遠心後、ライセートがカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

<6> <洗浄1回目> 注意深くカートリッジ (CAS) の蓋を開け、WDB 750 μ l を添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、室温にて6,000 $\times$ g (8,000rpm) で1分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器を注意深く取り出します。新しい廃液容器 (WTS、キット同梱) にカートリッジをセットし、フロースルーの入った廃液容器を捨てます。

1回の遠心でWDBがカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

<7> <洗浄2回目> 注意深くカートリッジ (CAS) の蓋を開け、WDB 750 μ l を添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、室温にて6,000 $\times$ g (8,000rpm) で1分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器 (WTS) を注意深く取り出します。1.5mlマイクロチューブ (非同梱) にカートリッジをセットし、フロースルーの入った廃液容器を捨てます。

1回の遠心でWDBがカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

<8> <回収> 注意深くカートリッジ (CAS) の蓋を開け、CDB 200 μ l を添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、室温にて6,000 $\times$ g (8,000rpm) で1分間遠心します。遠心機からカートリッジと1.5mlマイクロチューブを注意深く取り出し、カートリッジを捨てます。以上でゲノムDNA分離は完了です。

CDB液量は50 μ l まで減らすことができますが、その場合、溶出効率が2割ほど低下する可能性があります。

すぐにゲノムDNAを使用しない場合は、1.5mlマイクロチューブのキャップをしっかりと閉めた後、4℃または-20℃で保存してください。長期間ゲノムDNAを保存される場合、-20℃で保存することをお勧めします。

9. トラブルシューティング

トラブルが生じた場合には、以下の対策をご参照ください。

(1) DNAの収量が低い、DNAが得られない

原因	対策
全血の保存方法が不適切	全血は、できる限り採血後3日以内のものを使用してください。長期間保存した後の血液を用いた場合、収量の低下や、DNAの分解が生じることがあります。
EDBの溶解が不十分	ヌクレアーゼフリー水を添加後、時々攪拌しながら室温に30分以上置き、粉末が完全に溶解していることを確認してから使用してください。
EDBの酵素活性が不十分	溶解したEDBは冷蔵(4℃)で保存する場合、2カ月間安定です。2カ月以上保存されたEDBは使用しないでください。溶解後のEDBを-20℃に保存することで、酵素の安定期間を長くすることが可能です。その場合は少量ずつ分注するなどして、凍結、解凍の繰り返しは避けてください。
試薬、全血の添加順序が不適切	ライセート調製時、1.5mlマイクロチューブには、EDB(ヌクレアーゼフリー水3.3mlで溶解済み)→全血→LDBの順で添加してください。
全血量が不適切	全血量が多すぎる場合は、所定量(200μl)まで減らしてください。全血量が所定量(200μl)以下の場合には、PBS等で希釈して200μlになるように調製してください。
白血球数が多すぎる	白血球数が 2×10^6 個を超えた場合、DNA収量が低下することがあります。その場合は、PBS等で希釈して 2×10^6 個以下になるように調製してください。
LDB添加後のホモジナイズが不十分	LDB添加直後に、ピペティング(あるいは転倒混和)を行い、その後十分にボルテックス(15秒)してください。ボルテックスは最大回転数(2,500rpm以上推奨)で行ってください。
前処理時、エタノールを所定量添加していない	特級エタノール(>99%)を所定量添加してください。
エタノール添加後のホモジナイズが不十分	エタノール添加後十分にボルテックス(15秒)してください。ボルテックスは最大回転数(2,500rpm以上推奨)で行ってください。
WDBに所定量のエタノールを加えていない	WDB使用前には、必ず所定量の特級エタノール(>99%)を加えたことを確認してください。(8-1 p.8参照)
カートリッジ(CAS)へライセート全量を添加しきれていない	ライセートに凝集物が見られた場合は、凝集物も含めて全量をカートリッジに添加してください。
フィルターが破れてしまった	カートリッジ(CAS)内のフィルターにピペットチップが触れないように注意してください。
ゲノムDNAの溶出にCDB以外の試薬を使った	ゲノムDNA溶出時にはCDBを使用してください。
DNAの分解	(3)「DNAが分解した」参照
遠心機内の温度が高い	遠心機内の温度が上昇するのを防ぐため、遠心機の連続運転は避けてください。分離性能に悪影響を及ぼすことがあります。

(2) カートリッジ (CAS) が詰まった

原 因	対 策
全血量が多すぎる	所定量 (200 μ l) まで全血量を減らしてください。
白血球数が多すぎる	白血球数が 5×10^6 個を超えた場合、カートリッジ (CAS) が目詰まりを起こす可能性があります。PBS 等で希釈して 2×10^6 個以下になるように調製して分離を行うことをお勧めします。
LDB 添加後のホモジナイズが不十分	LDB 添加直後に、ピペッティング (あるいは転倒混和) を行い、その後十分にボルテックス (15 秒) してください。ボルテックスは最大回転数 (2,500rpm 以上推奨) で行ってください。
エタノール添加後のホモジナイズが不十分	エタノール添加後十分にボルテックス (15 秒) してください。ボルテックスは最大回転数 (2,500rpm 以上推奨) で行ってください。

(3) DNA が分解した

原 因	対 策
全血の保存方法が不適切	全血は、できる限り採血後 3 日以内のものをご使用ください。長期間保存した血液を用いた場合、収量の低下や、DNA の分解が生じることがあります。

(4) DNA の純度が低い

原 因	対 策
全血の保存方法が不適切	全血は、できる限り採血後 3 日以内のものをご使用ください。長期間保存した血液を用いた場合、収量の低下や、DNA の分解が生じることがあります。
EDB の酵素活性が不十分	溶解した EDB は冷蔵 (4℃) で保存する場合、2 カ月間安定です。2 カ月以上保存された EDB は使用しないでください。溶解後の EDB を -20℃ に保存することで、酵素の安定期間を長くすることが可能です。その場合は少量ずつ分注するなどして、凍結、解凍の繰り返しは避けてください。
試薬、全血の添加順序が不適切	ライセート調製時、マイクロチューブには、EDB (ヌクレアーゼフリー水 3.3ml で溶解済み) → 全血 → LDB の順で添加してください。
LDB 添加後のホモジナイズが不十分	LDB 添加直後に、ピペッティング (あるいは転倒混和) を行い、その後十分にボルテックス (15 秒) してください。ボルテックスは最大回転数 (2,500rpm 以上推奨) で行ってください。
前処理時、エタノールを所定量添加していない	特級エタノール (>99%) を所定量添加してください。
エタノール添加後のホモジナイズが不十分	エタノール添加後十分にボルテックス (15 秒) してください。ボルテックスは最大回転数 (2,500rpm 以上推奨) で行ってください。
WDB に所定量のエタノールを加えていない	WDB 使用前には、必ず所定量の特級エタノール (>99%) を加えたことを確認してください。(8-1. p.8 参照)
所定の洗浄条件で行っていない	洗浄は WDB 750 μ l で 2 回行ってください。
遠心機の回転数が不適切	カートリッジ (CAS) 遠心の際は、6,000 $\times$ g (8,000rpm) で遠心してください。

原 因	対 策
遠心後のフロースルーがカートリッジ(CAS)に付着した	遠心後、遠心機からカートリッジと廃液容器 (WTS) を取り出す際は、フロースルーがカートリッジに付着しないよう注意深く取り出してください。付着した場合は軽くスピンドウン (数秒) を行って取り除いてください。
ゲノムDNAの溶出にCDB以外の試薬を使った	ゲノムDNA溶出時にはCDBを使用してください。

(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、37℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。

(7) 廃液容器 (WTS) が破損した

原 因	対 策
指 定 の 条 件 (6,000×g (8,000rpm)) 以上で遠心機を使用した	指定の条件 (6,000×g (8,000rpm)) で遠心機を使用してください。

10. オーダリング・インフォメーション

製 品	Cat #
QuickGene SP kit DNA tissue	SP-DT
DNA組織キット(スピン法)	
QuickGene SP kit DNA whole blood	SP-DB
DNA全血キット(スピン法)	

付録1 QuickGene SP kit DNA whole blood (SP-DB) データ例

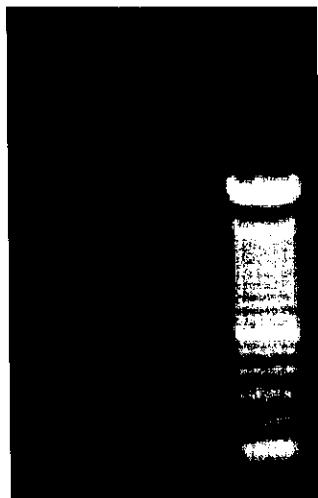
● PCR

本キットを用いて分離したゲノムDNAでPCRを行った例

本キットを用いて全血200 μ lから分離したゲノムDNA 0.1ngでG3PDHをターゲットにPCRを行った。

1 2 M

図1



2% Agarose gel/1 $\times$ TAE

レーン	サンプル
1	全血200 μ l
2	Negative control
M	100bp Ladder (Invitrogen)

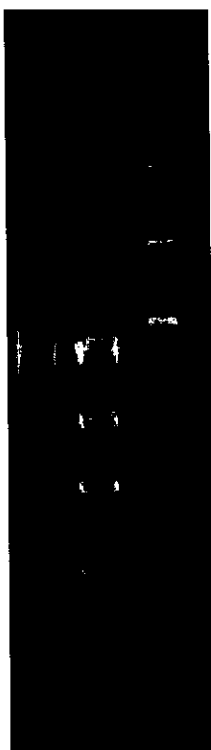
このPCRの結果では、ゲノムDNAテンプレート量0.1ngのPCRで、増幅産物の電気泳動バンドが検出された。

● パルスフィールド電気泳動の結果

本キットを用いて分離したゲノムDNAの長さ

1 M1 M2

図2



1% Agarose gel/0.5 $\times$ TBE

レーン	サンプル
1	本キットを用いて全血200 μ lから分離したゲノムDNA
M1	λ Hind III digest
M2	Midrange PFG Marker II (NEB)

この結果から、本キットを用いて分離したゲノムDNAは約140kbまでの長さがあることが分かる。

***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障されています。



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/>