

prepIT®•L2P

0.5 mL サンプルの DNA 手動型精製用の試験プロトコル

採取キットシリーズOragene®および ORAcollect®によるゲノム DNA の精製について。

他の言語による説明、およびプロトコルは、当社のウェブサイト www.dnagenotek.com にてご覧ください。

下記の段階的なプロトコルは分量500 µLのサンプルからDNAを精製する方法を説明します。

同梱の試薬

- prepIT®•L2P (カタログ番号:PT-L2P)

機器・試薬

- 15,000 × g で運転可能のマイクロ遠心分離機
- 1.5 mL マイクロチューブ (例えばAxygen #MCT-150-C)
- エア式またはウォーター式インキュベーター セ氏50度用
- エタノール(95%~100%) 室温用
- エタノール (70%) 室温用
- DNA 保存用バッファー: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) または類似の溶液

手順

精製手順	備考
1. サンプルを反転させ、数秒間静かに振り混ぜることで DNA Genotek kit にサンプルを混合させます。	• 粘性のあるサンプルが十分混合されることを確保するためです。
2. サンプルをセ氏50度でウォーター式インキュベーターで最低1時間、またはエア式インキュベーターで最低2時間培養します。 注意:ウォーターバスの場合、サンプルチューブが水に浮いてしまう恐れのため、エア式インキュベーターの使用を推奨します。ウォーターバスの使用が回避できない場合は、チューブのサンプルを含んだ部分が常に水に浸かっていることを確認してください。	• この加熱処理は、DNA が適切に開放され、ヌクレアーゼが永続的に不活性化されていることを確保するために不可欠な手順です。 • この培養の手順は、サンプルを採取後、精製前に何時でも実行することができます。 • サンプルの均一性を確保するため、等分する前にサンプル全体を元封の容器の状態で培養してください。 • ご都合により、サンプルはセ氏50度で夜間に培養することも可能です。 • エア式インキュベーターの場合、温度平衡に時間が掛かるため、ウォーター式インキュベーターよりも長時間を要します。
3. 混合サンプル 500 µL を1.5 mL のマイクロチューブに移します。	• サンプルの残余は室温で、または冷凍(セ氏-15度~-20度)で保管できます。
4. サンプル 500 µL には PT-L2Pを 20 µL (容量:25分の1) マイクロチューブに加え、数秒間ボルテックスすることで混合させます。	• 不純物や阻害剤が沈殿する際にサンプルが混濁します。



精製手順	備考
5. 氷で冷却しながら10分間培養します。	<ul style="list-style-type: none"> 代わりに室温で培養することもできますが、不純物を除去する効果が少々下がってしまいます。
6. 室温で5分間、15,000 × g で遠心分離機にかけます。	<ul style="list-style-type: none"> 長く(15分まで)遠心分離機にかけると、最終的なDNA溶液の濁度(高 A₃₂₀)を減少させることに役立つ可能性があります。
7. ピペットの先で慎重に上澄みを新しいマイクロチューブに移します。不純物を含んだペレットを廃棄します。	<ul style="list-style-type: none"> ペレットは濁った不純物を含んでいます。誤って乱してしまった場合、チューブを再び遠心分離機にかけるとよいです。
8. 上澄み 500 μL に、95~100%エタノールを温室で600 μLを加えます。10回反転させ、静かに混合させます。	<ul style="list-style-type: none"> エタノールと混合している最中に、DNAが沈殿します。サンプルの中のDNAの量により、DNA繊維の塊、または細かい沈殿物として現れます。 たとえ塊が見えない場合においても、次の手順に慎重に従い、DNAを回収します。
9. サンプルは10分間室温で置いておき、DNAを完全に沈殿させます。	<ul style="list-style-type: none"> 不純物がDNAと共に沈殿してしまう恐れのため、セ氏-20度で培養することは推奨されません。
10. チューブを遠心分離機に、一定の方向で置きます。室温で、15,000 × g で2分間遠心分離機にかけます。	<ul style="list-style-type: none"> 例えば、各チューブを、キャップのヒンジ部がローターの中央から逆方向に指しているようにマイクロ遠心分離機に置きます。遠心分離機にかけた後、ペレットの位置は(小さ過ぎるため見えない場合も)ヒンジの下のチューブの先端にあります。
11. ピペットの先で慎重に上澄みを除去し、廃棄します。DNAペレットを乱さないよう注意を払ってください。	<ul style="list-style-type: none"> このペレットにはDNAが含まれています。ペレットが失われてしまうと、DNAも失われてしまいます。 ペレットが上板にあるようにチューブを回転させることで、ピペットの先端を上手に下板に沿って動かし、上澄みを取り除くことができます。 上澄みに不純物が含まれている可能性のため、できる限りに完全に除去してください。 ペレットを乾かし過ぎるとDNAの溶解がより困難になる恐れがあります。
12. エタノール洗浄: 慎重に70% エタノールを250 μL 加えます。室温で1分間置いておく。ペレットを乱さずに、エタノールを完全に除去します。	<ul style="list-style-type: none"> サンプルのエタノールを完全に除去してください。残留しているエタノールが、分析結果に影響を及ぼす恐れがあります。 DNA ペレットを乱さないよう注意を払ってください。 DNA ペレットは小さくても構いません。 ペレットを分離させる場合、サンプルを 15,000 × g で5分間、遠心分離機にかけます。 70% エタノールを除去後、チューブをパルススピンすることで、残留エタノールを除去することができます。

精製手順	備考
13. TE バッファーを100 µL 加え、DNAペレットを溶解します(ページ1を参照)。少なくとも5秒間渦動させます。	<ul style="list-style-type: none"> • より高濃度なDNAが望まれる場合、TE を50 µL使用してください。 • 注意: 大量の高分子量DNAの場合、完全に水和させる(溶解させる)ために長時間かかることをご了承ください。 • DNAが完全に水和されなかった場合、DNA濃度の測定が不正確になる原因となり、PCR等の下流アプリケーションのエラーにつながる恐れがあります。
14. DNA (ペレットおよびスミア)を完全に再水和させるために、室温で一晩培養し、ボルテックスしてください。あるいは、時折ボルテックスしながらセ氏 50 度で一時間培養してください。	<ul style="list-style-type: none"> • DNA の不完全な再水和は、DNA 濃度の評価が不正確となり、また、PCR 等の下流アプリケーションにおけるエラーの原因になる可能性があります。
15. 完全に再水和したDNAの保管方法: a) TE(推奨)にセ氏-20度で、一定分量を長期保管、または b) TEにセ氏4度で2ヶ月まで保管。	<ul style="list-style-type: none"> • 精製DNAをTEに冷凍すると、DNAが沈殿する原因となります。冷凍した精製DNAサンプルを解凍する際は、手順14にある再水和に十分注意を払ってください。

DNAの定量化

蛍光法

DNA サンプル中の二本鎖DNA (dsDNA) の定量化において、蛍光色素を用いた試験は260ナノメートルでの吸収度よりも正確です。二本鎖DNAの定量化の際、RNA汚染による妨害が起きにくい蛍光色素 PicoGreen®、または SYBR® Green I を使用されることをお勧めします。SYBR Green I を使用した、安価なプロトコルはPD-PR-075, *DNA quantification using SYBR Green I Dye and a micro-plate reader*¹にて記述されています。その他、市販のキットではInvitrogen's Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit (Cat. No. Q-33130) 等をご使用いただけます。いずれのプロトコルにおいても、精製DNAを 1:50 TEで希釈し、定量化試験には 5 µL 使用されることをお勧めします。

吸収度法

DNAを定量化するために吸収度法を選択された場合、最初に精製サンプルをRNA分解酵素で処理し、RNA汚染を消化させてから、DNAのエタノール沈殿によりRNA断片を除去されることをお勧めします。詳細なプロトコルはPD-PR-040, *RNA removal by double-RNase digestion*²に記述されています。口腔サンプルからのDNAは一般的に血液サンプルよりもRNAの量が遥かに多く得られることをご了承ください。アルコール沈殿によるDNAが完全に溶解したことを確認してから、吸収度を読み取るよう心がけてください。

変換係数: 260ナノメートルでの吸収度1.0は純粋な二本鎖DNAの濃度 of 50 ng/µL (50 µg/mL) に相当します。

吸収度値が分光光度計の線形範囲であることを確保してください。線形範囲から外れたサンプルは再び希釈し、再測定してください。詳細な情報については機器の参照資料をご参照ください。

方法:

1. 分量10 μL の精製された、RNA分解酵素で処理されたDNAを90 μL の TEで希釈します (希釈1/10)。上下に静かにピペット操作を行なうことで混合させます。泡がなくなるまで待ちます。
2. TE を参照 (空白) セルに使用します。
3. 320, 280 および 260 ナノメートルで吸収度を測定します。
4. 320 ナノメートル (A_{320}) での吸収率を A_{280} および A_{260} の値から減算することで補正值 A_{280} および A_{260} を算出します。
5. DNA 濃度 ($\text{ng}/\mu\text{L}$) = 補正值 $A_{260} \times 10$ (希釈係数) $\times 50$ (変換係数)。
6. A_{260}/A_{280} 率:補正值 A_{260} を補正值 A_{280} で割ります。

例

1. 仮定:測定が $A_{320}= 0.025$, $A_{280}= 0.175$ および $A_{260}= 0.295$ だったとします。
2. 希釈されていないサンプルのDNA濃度は次のとおりです:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [希釈係数] $\times 50$ [変換係数]
 $= (0.295 - 0.025) \times 10 \times 50$
 $= 0.270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng}/\mu\text{L}$ または $135 \mu\text{g}/\text{mL}$
3. 補正值 A_{260}/A_{280} 率は次のとおりです:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0.296 - 0.025) \div (0.175 - 0.025)$
 $= 0.270 \div 0.150$
 $= 1.80$

参考文献

- 1 DNA quantification using the Fluorescence/DNase (F/D) assay. Replaced by DNA quantification using SYBR Green I dye and a micro-plate reader. DNA Genotek. PD-PR-075.
- 2 RNA removal by double-RNase digestion. DNA Genotek. PD-PR-040.

月曜日から金曜日の午前 9 時から午後 17 時まで (EST)、技術的サポートをご利用いただけます:

- フリーダイヤル (北米): 1.866.813.6354 オプション 6
- その他の国: 613.723.5757 オプション 6
- メール: support@dnagenotek.com

Oragene®-DNA および ORAcollect®-DNA はアメリカで販売されていません。

Oragene®-DISCOVER は研究目的でのみの使用で、診断目的での使用はできません。

DNA Genotek 製品の中には全ての各地域で販売されていない製品もあります。

*Oragene, prepiT、およびORAcollectはDNA Genotek Inc. の登録商標です。記載されているその他のブランド名および名称は全て各所有者の所有財産です。

DNA Genotek のプロトコル、ホワイトペーパー、および使用説明書は全て、当社のウェブサイト (www.dnagenotek.com) のサポートセクションをご覧ください。

