

QIAamp® DNA Investigator プロトコールとトラブルシューティング

以下のサンプルからのトータル（ゲノムおよび
ミトコンドリア）DNA の精製

サンプル表面を拭き取ったスワブおよび口腔スワブ
FTA® Card（QIAcard FTA Spots）および Guthrie Card

体液の斑痕

チューインガム

タバコの吸殻

爪および毛髪

サンプルが付着した紙や類似した素材

微量の血液あるいは唾液

組織

LMD（レーザーマイクロダイセクション）で採取した切片

骨および歯

性犯罪検体



目次

プロトコール

サンプル表面を拭き取ったスワブおよび 口腔スワブからのトータル DNA 分離	3
FTA Card (QIAcard FTA Spots) および Guthrie Card からの トータル DNA 分離	7
体液の斑痕からのトータル DNA 分離	10
チューインガムからのトータル DNA 分離	13
タバコの吸殻からのトータル DNA 分離	16
爪および毛髪からのトータル DNA 分離	19
サンプルが付着した紙や類似した素材からのトータル DNA 分離	23
微量の血液あるいは唾液からのトータル DNA 分離	26
組織からのトータル DNA 分離	29
LMD (レーザーマイクロダイセクション) により採取した 切片からのトータル DNA 分離	32
骨および歯からのトータル DNA 分離	35
性犯罪検体からのトータル DNA 分離	38
トラブルシューティング	42

プロトコール：サンプル表面を拭き取ったスワブ および口腔スワブからのトータル DNA 分離

これは、サンプルの表面を拭き取ったスワブ、精液スワブ、血液スワブ、唾液スワブからトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA を分離するためのプロトコールです。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温（15 ~ 25°C）で行ないます。
- キャリア RNA が必要かどうかをチェックします（英語版 Handbook 11、13 ページ）。

実験開始前の準備事項

- 溶出用 Buffer ATE あるいは蒸留水を室温（15 ~ 25°C）に戻します。
- ステップ 3 およびステップ 15（オプション）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°C に、ステップ 6 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 70°C 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ウォーターバスを使用できます。
- 精液スワブを処理する際には 1 M DTT (dithiothreitol) ストック溶液を調製します。分注して -20°C で保管します。使用直前に速やかに解凍します。
- Buffer AL あるいは Buffer ATL が沈殿物を形成している場合には、70°C に温めて静かに攪拌し沈殿物を溶かします。
- 英語版 Handbook 12 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。
- オプション：スワブ中に残存するライセートを回収するためには QIAshredder Spin Column が必要です。

操作手順

- 1. 2 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）にスワブを入れる。**

Omni Swab は柄の末端をスワブの方に押しつけてスワブを取り外します。
綿棒あるいは DACRON® スワブを手またはハサミを用いて柄から外します。
- 2. 20 µl の Proteinase K と、600 µl の Buffer ATL (Omni Swab) あるいは 400 µl の Buffer ATL（綿棒か DACRON スワブ）をサンプルに添加し、蓋を閉めパルスボルテックスで 10 秒間混和する。**
- 3. 2 ml チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、56°C で 1 時間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。**

ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを 10 分毎に 10 秒間ボルテックスし混和します。

4. スピンドアウンして 2 ml チューブの蓋の内側に付いたサンプルを集める。
5. 600 μ l の Buffer AL (Omni Swab) あるいは 400 μ l の Buffer AL (綿棒あるいは DACRON スwab) を添加して蓋を閉めてパルスボルテックスにより 15 秒間混和する。

効率的な溶解を行なうために、サンプルと Buffer AL を十分に混和して完全に均一な溶液にします。

Buffer AL を Buffer ATL に添加した際に白い沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は QIAamp 調製法には影響しません。これはステップ 6 でのインキュベーションの間に溶解します。

注：キャリア RNA が必要な際は（英語版 Handbook 11 ページ）、溶解した 1 μ g のキャリア RNA を 600 μ l の Buffer AL (Omni Swab) あるいは 400 μ l の Buffer AL (綿棒あるいは DACRON swab) に添加します。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないので注意します。まず Buffer ATE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。

6. 2 ml チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし 70°C で 10 分間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。

ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを 3 分毎に 10 秒間ボルテックスし混和します。

7. スピンドアウンして 2 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。
8. 300 μ l のエタノール (96 ~ 100%) (Omni Swab) あるいは 200 μ l のエタノール (96 ~ 100%) (綿棒あるいは DACRON スwab) を添加し、蓋を閉めてパルスボルテックスで 15 秒間混和する。

ステップ 10 での結合を効率的に行なうためには、サンプルとエタノールが完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。

9. スピンドアウンして 2 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。
10. Omni Swab を使用している場合、ステップ 10a に続く。綿棒あるいは DACRON スwab を使用している場合、ステップ 10b に続く。

- 10a. ステップ 9 のライセート 700 μ l を QIAamp MinElute[®] Column (2 ml のコレクションチューブに入った) にカラムの縁を濡らさないように注意してアプライし、蓋を閉め、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。コレクションチューブのろ液を捨て、QIAamp MinElute Column をコレクションチューブに戻す。ステップ 9 のライセートの残りを QIAamp MinElute Column にカラムの縁を濡らさないように注意してアプライし、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、ろ液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。

注：最高 250 μ l のライセートがスワブに残存しています。この残ったライセートを回収するために、QIAshredder Spin Column（別途準備）にスワブを入れ、最高速度（20,000 \times g；14,000 rpm）で 2 分間遠心操作します。カラムの縁を濡らさないように注意して静かにろ液を QIAamp MinElute Column にアプライし、蓋を閉めて 6,000 \times g（8,000 rpm）で 1 分間遠心操作します。

- 10b. ステップ 9 の全ライセートを QIAamp MinElute Column（2 ml のコレクションチューブ中）にカラムの縁を濡らさないように注意してアプライし、蓋を閉め、6,000 \times 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、ろ液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。

注：最高 200 μ l のライセートがスワブに残存しています。この残ったライセートを回収するために、QIAshredder Spin Column（別途準備）にスワブを入れ、最高速度（20,000 \times g；14,000 rpm）で 2 分間遠心操作します。カラムの縁を濡らさないように注意して静かにろ液を QIAamp MinElute Column にアプライし、蓋を閉めて 6,000 \times g（8,000 rpm）で 1 分間遠心操作します。

11. 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 AW1 を添加する。蓋を閉めて 6,000 \times 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。
12. QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 700 μ l の Buffer AW2 を添加する。蓋を閉めて 6,000 \times 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

QIAamp MinElute Column とろ液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ろ液が 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、ろ液が QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。

13. 静かに QIAamp MinElute Column を開き、縁を濡らさないように 700 μ l のエタノール（96 ~ 100%）を添加する。蓋を閉め 6,000 \times 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。
14. 最高速度（20,000 \times 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で問題になることがあるので、このステップは必要です。

15. 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、ろ液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、室温（15 ~ 25℃）で 10 分間あるいは 56℃で 3 分間インキュベートする。
16. 20 ~ 100 μ l の **Buffer ATE** あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。
重要：Buffer ATE あるいは蒸留水を室温（15 ~ 25℃）に戻したことを確認します。カラム結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。
QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。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容量を調節します。少量で溶出すると溶出液中の最終 DNA 濃度は増加しますが、DNA 収量は全体的に減少します。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。
17. 蓋を閉めて、室温（15 ~ 25℃）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 あるいは水をアプライした 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。

プロトコール：FTA Card (QIAcard FTA Spots) および Guthrie Card からのトータル DNA 分離

これは、FTA Card (QIAcard FTA Spots) および Guthrie Card、類似した採取紙上で乾燥あるいは吸着した全血、唾液、口腔細胞から、トータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA を分離するためのプロトコールです。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温（15 ~ 25°C）で行ないます。

実験開始前の準備事項

- 溶出用 Buffer ATE あるいは蒸留水を室温（15 ~ 25°C）に戻します。
- Buffer AL あるいは Buffer ATL が沈殿物を形成している場合には、70°C に温めて静かに攪拌し沈殿物を溶かします。
- ステップ 4 およびステップ 16（オプション）で使用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°C に、ステップ 7 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 70°C 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ウォーターバスを使用できます。
- 英語版 Handbook 12 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。
- オプション：微量のスタートサンプルを処理する場合には、英語版 Handbook 13 ページの説明に従って Buffer ATE で溶解調製したキャリア RNA を Buffer AL に添加します。

操作手順

1. 一穴式の紙パンチで直径 3 mm (1/8 インチ) の乾燥斑を切り抜く。切り抜いた card 3 枚を 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に入れる。
2. 280 µl の Buffer ATL を添加する。
3. 20 µl の Proteinase K を添加し、ボルテックスにより完全に混和する。
4. 1.5 ml チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、56°C で 1 時間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。
ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを 10 分毎に 10 秒間ボルテックスし混和します。
5. スピンドアウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。

6. **300 μ l の Buffer AL を添加後、蓋を閉めパルスボルテックスで 10 秒間混和する。**
効率的な溶解を行なうためには、サンプルと Buffer AL が完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。

Buffer AL を Buffer ATL に添加した際に白い沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は QIAamp 調製法には影響しません。これはステップ 7 での加熱インキュベーションの間に溶解します。

注：直径 3 mm あるいはそれ以下のパンチした blood card を 1 枚のみ処理する場合には、Buffer AL にキャリア RNA を添加することをお勧めします（英語版 Handbook 13 ページ参照）。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないので注意します。まず Buffer ATE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。

7. **1.5 ml チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし 70°C で 10 分間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。**

ヒートブロックまたはウォーターバスをインキュベーションに使用する場合には、チューブは 3 分毎に 10 秒間ボルテックスし混和します。

8. **スピンドウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。**
9. **150 μ l のエタノール (96 ~ 100%) をサンプルに添加し、蓋を閉め、15 秒間パルスボルテックスで静かに混和する。**

ステップ 11 での結合を効率的に行なうためには、サンプルとエタノールが完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。

10. **スピンドウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。**
11. **ステップ 10 の全ライセートを QIAamp MinElute Column (2 ml のコレクションチューブに入った) にカラムの縁を濡らさないように注意してアプライし、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、ろ液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。

12. **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 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。**

13. **QIAamp MinElute Column** を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように **700 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

QIAamp MinElute Column とろ液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ろ液が 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、ろ液が QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。

14. 静かに **QIAamp MinElute Column** を開き、縁を濡らさないように **700 μ l** のエタノール (**96 ~ 100%**) を添加する。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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。
15. 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で問題になることがあるので、このステップは必要です。

16. 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、ろ液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、室温 (**15 ~ 25°C**) で **10 分間** あるいは **56°C** で **3 分間** インキュベートする。

17. **20 ~ 100 μ l** の **Buffer ATE** あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。

重要 : Buffer ATE あるいは蒸留水を室温 (**15 ~ 25°C**) に戻したことを確認します。溶出を少量 (**<50 μ l**) で行なう際には、カラムに結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。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容量を調節します。少量で溶出すると溶出液中の最終 DNA 濃度は増加しますが、DNA 収量は全体的に減少します。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。

18. 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 あるいは水をアプライした 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。

プロトコール：体液の斑痕からのトータル DNA 分離

このプロトコールは血液や唾液、精液が付着した素材からトータル（ゲノムとミトコンドリア）DNA 分離用にデザインされています。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。
- キャリア RNA が必要かどうかをチェックします（英語版 Handbook 11、13 ページ）。

実験開始前の準備事項

- 溶出用 Buffer ATE あるいは蒸留水を室温（15～25℃）に戻します。
- ステップ 3 およびステップ 16（オプション）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、ステップ 6 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 70℃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ウォーターバスを使用できます。
- 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。
- 精液の斑痕を処理する際には 1 M DTT (dithiothreitol) ストック溶液を調製します。分注して -20℃で保管します。使用直前に速やかに解凍します。
- 英語版 Handbook 12 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。
- オプション：斑痕の付着した布を処理する際には、QIAshredder Spin Column が必要です。

操作手順

1. 体液の斑痕サンプルを切り取り（0.5 cm²）、さらに小さい切片にする。2 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）にこれを入れる。
2. 300 μ l の Buffer ATL、20 μ l の Proteinase K を入れる。精液の斑痕サンプルを処理する際には、20 μ l の 1M DTT を同様に添加する。蓋をして、10 秒間パルスボルテックスして混和する。
3. チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、56℃で少なくとも 1 時間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。
ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを 10 分毎に 10 秒間ボルテックスし混和します。
4. マイクロ遠心チューブをスピンドウンして蓋の内側に付着した溶液を回収する。

5. 300 µl の Buffer AL を添加後、蓋を閉めパルスボルテックスで 10 秒間混和する。

効率的な溶解を行なうためには、サンプルと Buffer AL が完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。

Buffer AL を Buffer ATL に添加した際に白い沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は QIAamp 調製法には影響しません。これはステップ 6 でのインキュベーションの間に溶解します。

注：キャリア RNA が必要な際は（英語版 Handbook 11 ページ）、溶解した 1 µg のキャリア RNA を 300 µl の Buffer AL に添加します。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないので注意します。まず Buffer ATE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。

6. チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、70°C で 10 分間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。

ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを 3 分毎に 10 秒間ボルテックスし混和します。

7. スピンドアウンして 2 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。

固形粒子が観察される場合は、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作を行ない、上清を 1.5 ml の新しいマイクロ遠心チューブ（別途準備）に静かに移します。固い生地（デニム地など）に残っているライセートは、サンプルを QIAshredder Spin Column（別途準備）に入れ、最高速度で 2 分間遠心操作して回収します。ろ液を 1.5 ml の新しいマイクロ遠心チューブ（別途準備）に静かに移します。

8. 150 µl のエタノール（96 ~ 100%）をサンプルに添加し、蓋を閉め、15 秒間パルスボルテックスで静かに混和する。

ステップ 10 での結合を効率的に行なうためには、サンプルとエタノールが完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。

9. マイクロ遠心チューブをスピンドアウンして蓋の内側に付着した溶液を回収する。

10. ステップ 9 の上清を QIAamp MinElute Column（2 ml コレクションチューブ中）にカラムの縁を濡らさないように注意してアプライする。

11. 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、ろ液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。

12. **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 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。
13. **QIAamp MinElute Column** を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように **700 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

QIAamp MinElute Column とろ液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ろ液が 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、ろ液が QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。

14. 静かに **QIAamp MinElute Column** を開き、縁を濡らさないように **700 μ l** のエタノール (**96 ~ 100%**) を添加する。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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

15. 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で問題になることがあるので、このステップは必要です。

16. 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、ろ液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、室温 (**15 ~ 25°C**) で **10 分間**あるいは **56°C** で **3 分間**インキュベートする。

17. **20 ~ 50 μ l** の **Buffer ATE** あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。

重要 : Buffer ATE あるいは蒸留水を室温 (**15 ~ 25°C**) に戻したことを確認します。カラム結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。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容量を調節します。少量で溶出すると溶出液中の最終 DNA 濃度は増加しますが、DNA 収量は全体的に減少します。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。

18. 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 あるいは水をアプライした 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。

プロトコール：チューインガムからのトータル DNA 分離

このプロトコールはチューインガムからのトータル（ゲノムとミトコンドリア）DNA 分離用にデザインされています。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。
- キャリア RNA が必要かどうかをチェックします（英語版 Handbook 11、13 ページ）。

実験開始前の準備事項

- 溶出用 Buffer ATE あるいは水を室温（15～25℃）に戻します。
- ステップ 3 およびステップ 15（オプション）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、ステップ 6 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 70℃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ウォーターバスを使用できます。
- 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 12 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。

操作手順

1. 30 mg 以下になるようにチューインガムを小さく切って、1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に入れる。
2. 300 μ l の Buffer ATL および 20 μ l の Proteinase K を添加し、10 秒間パルスボルテックスして混和する。
3. 1.5 ml チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、56℃で最低 3 時間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。
ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを 30 分毎に 10 秒間ボルテックスし混和します。
4. スピンドアウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。

5. **300 μ l の Buffer AL を添加後、蓋を閉めパルスボルテックスで 10 秒間混和する。**

効率的な溶解を行なうためには、サンプルと Buffer AL が完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。

Buffer AL を Buffer ATL に添加した際に白い沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は QIAamp 調製法には影響しません。これはステップ 6 でのインキュベーションの間に溶解します。

注：キャリア RNA が必要な際は（英語版 Handbook 11 ページ）、溶解した 1 μ g のキャリア RNA を 300 μ l の Buffer AL に添加します。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないので注意します。まず Buffer ATE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。
6. **1.5 ml チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし 70°C で 1 時間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。**

ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを 10 分毎に 10 秒間ボルテックスし混和します。
7. **スピンドウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。**

固形粒子が観察される場合は、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作を行ない、上清を新しい 1.5 ml マイクロ遠心チューブ（別途準備）に静かに移します。
8. **150 μ l のエタノール (96 ~ 100%) を添加し、蓋を閉め、10 秒間パルスボルテックスで完全に混和する。**

ステップ 10 での結合を効率的に行なうためには、サンプルとエタノールが完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。
9. **最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。**
10. **カラムの縁を濡らさないように注意して QIAamp MinElute Column (2 ml のコレクションチューブに入った) にステップ 9 の上清をアプライし、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、ろ液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。
11. **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 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。**

12. **QIAamp MinElute Column** を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように **700 μ l** の **Buffer AW2** を添加する。蓋を開けて **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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

QIAamp MinElute Column とろ液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ろ液が 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、ろ液が QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。

13. 静かに **QIAamp MinElute Column** を開き、縁を濡らさないように **700 μ l** のエタノール (**96 ~ 100%**) を添加する。蓋を開け **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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

14. 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で問題になることがあるので、このステップは必要です。

15. 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、ろ液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、室温 (**15 ~ 25°C**) で **10 分間** あるいは **56°C** で **3 分間** インキュベートする。

16. **20 ~ 50 μ l** の **Buffer ATE** あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。

重要 : Buffer ATE あるいは蒸留水を室温 (**15 ~ 25°C**) に戻したことを確認します。カラム結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。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容量を調節します。少量で溶出すると溶出液中の最終 DNA 濃度は増加しますが、DNA 収量は全体的に減少します。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。

17. 蓋を開けて、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 あるいは水をアプライした 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。

プロトコール：タバコの吸殻からのトータル DNA 分離

このプロトコールはタバコの吸殻からのトータル（ゲノムとミトコンドリア）DNA 精製用にデザインされています。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。
- キャリア RNA が必要かどうかをチェックします（英語版 Handbook 11、13 ページ）。

実験開始前の準備事項

- 溶出用 Buffer ATE あるいは蒸留水を室温（15～25℃）に戻します。
- ステップ 3 およびステップ 16（オプション）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、ステップ 6 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 70℃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ウォーターバスを使用できます。
- 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 12 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。

操作手順

1. タバコあるいはフィルターの外側の紙から 1 cm² 切り取る。これを 6 片に切り分ける。1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）にこれを入れる。
2. 300 μ l の Buffer ATL および 20 μ l の Proteinase K を添加し、蓋をして 10 秒間パルスボルテックスして混和する。
3. チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、56℃で少なくとも 1 時間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。
ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを 10 分毎に 10 秒間ボルテックスし混和します。
4. マイクロ遠心チューブをスピンドウンして蓋の内側に付着した溶液を回収する。

5. **300 μ l の Buffer AL を添加後、蓋を閉めパルスボルテックスで 10 秒間混和する。**

効率的な溶解を行なうためには、サンプルと Buffer AL が完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。

Buffer AL を Buffer ATL に添加した際に白い沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は QIAamp 調製法には影響しません。これはステップ 6 でのインキュベーションの間に溶解します。

注：キャリア RNA が必要な際は（英語版 Handbook 11 ページ）、溶解した 1 μ g のキャリア RNA を 300 μ l の Buffer AL に添加します。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないので注意します。まず Buffer ATE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。
6. **チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、70°C で 10 分間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。**

ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを 3 分毎に 10 秒間ボルテックスし混和します。
7. **スピンドウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。**

固形粒子が観察される場合は、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作を行ない、上清を 1.5 ml の新しいマイクロ遠心チューブ（別途準備）に静かに移します。
8. **150 μ l のエタノール（96 ~ 100%）をサンプルに添加し、蓋を閉め、15 秒間パルスボルテックスで静かに混和する。**

ステップ 10 での結合を効率的に行なうためには、サンプルとエタノールが完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。
9. **スピンドウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。**
10. **ステップ 9 の上清を QIAamp MinElute Column（2 ml コレクションチューブ中）にカラムの縁を濡らさないように注意してアプライする。**
11. **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、ろ液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。
12. **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 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。**

13. **QIAamp MinElute Column** を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように **700 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

QIAamp MinElute Column とろ液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ろ液が 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、ろ液が QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。

14. 静かに **QIAamp MinElute Column** を開き、縁を濡らさないように **700 μ l** のエタノール (**96 ~ 100%**) を添加する。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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。
15. 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で問題になることがあるので、このステップは必要です。

16. 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、ろ液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、室温 (**15 ~ 25°C**) で **10 分間**あるいは **56°C** で **3 分間**インキュベートする。
17. **20 ~ 50 μ l** の **Buffer ATE** あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。

重要 : Buffer ATE あるいは蒸留水を室温 (**15 ~ 25°C**) に戻したことを確認します。カラム結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。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容量を調節します。少量で溶出すると溶出液中の最終 DNA 濃度は増加しますが、DNA 収量は全体的に減少します。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。

18. 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 あるいは水をアプライした 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。

プロトコール：爪および毛髪からのトータル DNA 分離

このプロトコールは爪や毛根、毛幹部からのトータル（ゲノムとミトコンドリア）DNA 精製用にデザインされています。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。
- キャリア RNA が必要かどうかをチェックします（英語版 Handbook 11、13 ページ）。

実験開始前の準備事項

- 溶出用 Buffer ATE あるいは蒸留水を室温（15～25℃）に戻します。
- ステップ 2 およびステップ 15（オプション）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、ステップ 5 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 70℃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ウォーターバスを使用できます。
- 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。
- 1 M DTT (dithiothreitol) ストック溶液を調製します。分注して -20℃で保管します。使用直前に速やかに解凍します。
- 英語版 Handbook 12 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。

操作手順

1. 爪サンプルはステップ 1a、毛根は 1b、毛幹部（毛根がついてない）は 1c に従ってサンプルを溶解する。
 - 1a. 爪を 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に入れる。300 μ l の Buffer ATL、20 μ l の Proteinase K、20 μ l の 1 M DTT を入れる。蓋をして、10 秒間パルスボルテックスして混和する。ステップ 2 に続ける。
 - 1b. 300 μ l の Buffer ATL、20 μ l の Proteinase K、20 μ l の 1M DTT を 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に入れる。毛根から 0.5～1 cm を切り取り、1.5 ml のマイクロ遠心チューブに入れる。蓋をして、10 秒間パルスボルテックスして混和する。ステップ 2 に続ける。
 - 1c. 300 μ l の Buffer ATL、20 μ l の Proteinase K、20 μ l の 1M DTT を 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に入れる。毛を 0.5～1 cm に切り取り、1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に入れる。蓋をして、10 秒間パルスボルテックスして混和する。ステップ 2 に続ける。

- チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、56℃で少なくとも1時間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。

通常、毛髪は1時間で溶解されますが、必要に応じて完全に溶解を行なうためにインキュベーション時間を増やしてください。

ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを10分毎に10秒間ボルテックスし混和します。

爪のサンプル量が多い場合には、56℃で一晩インキュベートすることをお勧めします。このインキュベーションステップあるいはステップ5のインキュベーションステップで溶解されなかった物質はステップ6の遠心操作でペレット化されます。

- マイクロ遠心チューブをスピンドウンして蓋の内側に付着した溶液を回収する。

- 300 µl の Buffer AL を添加後、蓋を閉めパルスボルテックスで10秒間混和する。

効率的な溶解を行なうためには、サンプルと Buffer AL が完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。

Buffer AL を Buffer ATL に添加した際に白い沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は QIAamp 調製法には影響しません。これはステップ5でのインキュベーションの間に溶解します。

注：キャリア RNA が必要な際は（英語版 Handbook 11 ページ）、溶解した 1 µg のキャリア RNA を 300 µl の Buffer AL に添加します。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないので注意します。まず Buffer ATE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。

- チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、70℃で10分間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。

ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを3分毎に10秒間ボルテックスし混和します。

- スピンドウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。

- 150 µl のエタノール (96 ~ 100%) をサンプルに添加し、蓋を閉め、15秒間パルスボルテックスで静かに混和する。

ステップ9での結合を効率的に行なうためには、サンプルとエタノールが完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。

- スピンドウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。

- ステップ8の上清を QIAamp MinElute Column (2 ml コレクションチューブ中) にカラムの縁を濡らさないように注意してアプライする。

10. 蓋を閉め、 $6,000 \times g$ ($8,000 \text{ rpm}$) 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、ろ液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いません。

11. QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように500 μl のBuffer AW1 を添加する。蓋を閉めて $6,000 \times g$ ($8,000 \text{ rpm}$) 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。
12. QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように700 μl のBuffer AW2 を添加する。蓋を閉めて $6,000 \times g$ ($8,000 \text{ rpm}$) 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

QIAamp MinElute Column とろ液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ろ液が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、ろ液がQIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。

13. 静かにQIAamp MinElute Column を開き、縁を濡らさないように700 μl のエタノール (96 ~ 100%) を添加する。蓋を閉め $6,000 \times g$ ($8,000 \text{ rpm}$) 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。
14. 最高速度 ($20,000 \times g$; $14,000 \text{ rpm}$) 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で問題になることがあるので、このステップは必要です。

15. 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、ろ液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、室温 ($15 \sim 25^\circ\text{C}$) で10分間あるいは 56°C で3分間インキュベートする。

16. 20 ~ 50 μ l の Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。

重要： Buffer ATE あるいは蒸留水を室温（15 ~ 25°C）に戻したことを確認します。カラム結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。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容量を調節します。少量で溶出すると溶出液中の最終 DNA 濃度は増加しますが、DNA 収量は全体的に減少します。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ー量よりも 5 μ l (最高) 少なくなります。

17. 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 あるいは水をアプライした 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。

プロトコール：サンプルが付着した紙や類似した素材からのトータル DNA 分離

これは、封筒や切手に付着した唾液や書類に残った指紋など紙類の証拠品からトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA を分離するためのプロトコールです。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。
- キャリア RNA が必要かどうかをチェックします（英語版 Handbook 11、13 ページ）。

実験開始前の準備事項

- 溶出用 Buffer ATE あるいは蒸留水を室温（15～25℃）に戻します。
- ステップ 3 およびステップ 16（オプション）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、ステップ 6 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 70℃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ウォーターバスを使用できます。
- 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 12 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。

操作手順

1. 紙あるいは類似の素材から **0.5～2.5 cm²** 切り取り、これをさらに小さく切る。**1.5 ml** のマイクロ遠心チューブ（別途準備）にこれを入れる。
注：サンプルから切り出す前に、蒸留水で濡らしたスワブを用いて表面のコンタミを取り除くことが可能です。
2. **300 µl** の Buffer ATL および **20 µl** の Proteinase K を添加し、蓋をして **10 秒間** パルスボルテックスして混和する。
3. チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、**56℃** で少なくとも **1 時間**、**900 rpm** で振盪させながらインキュベートする。
ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを 10 分毎に 10 秒間ボルテックスし混和します。
4. マイクロ遠心チューブをスピンドウンして蓋の内側に付着した溶液を回収する。

5. **300 μ l の Buffer AL を添加後、蓋を閉めパルスボルテックスで 10 秒間混和する。**

効率的な溶解を行なうためには、サンプルと Buffer AL が完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。

Buffer AL を Buffer ATL に添加した際に白い沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は QIAamp 調製法には影響しません。これはステップ 6 でのインキュベーションの間に溶解します。

注：キャリア RNA が必要な際は（英語版 Handbook 11 ページ）、溶解した 1 μ g のキャリア RNA を 300 μ l の Buffer AL に添加します。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないので注意します。まず Buffer ATE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。
6. **チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、70°C で 10 分間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。**

ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを 3 分毎に 10 秒間ボルテックスし混和します。
7. **スピンドウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。**

固形粒子が観察される場合は、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心操作を行ない、上清を新しいマイクロ遠心チューブ（別途準備）に静かに移します。
8. **150 μ l のエタノール (96 ~ 100%) をサンプルに添加し、蓋を閉め、15 秒間パルスボルテックスで静かに混和する。**

ステップ 10 での結合を効率的に行なうためには、サンプルとエタノールが完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。
9. **スピンドウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。**
10. **ステップ 9 の上清を QIAamp MinElute Column (2 ml コレクションチューブ中) にカラムの縁を濡らさないように注意してアプライする。**
11. **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、ろ液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。
12. **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 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。**

13. **QIAamp MinElute Column** を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように **700 μ l** の **Buffer AW2** を添加する。蓋を開けて **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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

QIAamp MinElute Column とろ液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ろ液が 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、ろ液が QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。

14. 静かに **QIAamp MinElute Column** を開き、縁を濡らさないように **700 μ l** のエタノール (**96 ~ 100%**) を添加する。蓋を開け **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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。
15. 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で問題になることがあるので、このステップは必要です。

16. 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、ろ液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、室温 (**15 ~ 25°C**) で **10 分間** あるいは **56°C** で **3 分間** インキュベートする。
17. **20 ~ 50 μ l** の **Buffer ATE** あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。

重要 : Buffer ATE あるいは蒸留水を室温 (**15 ~ 25°C**) に戻したことを確認します。カラム結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。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容量を調節します。少量で溶出すると溶出液中の最終 DNA 濃度は増加しますが、DNA 収量は全体的に減少します。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。

18. 蓋を開けて、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 あるいは水をアプライした 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。

プロトコール：微量の血液あるいは唾液からのトータル DNA 分離

これは EDTA、クエン酸、ヘパリンなどの抗凝固剤で処理した 1 ~ 100 μ l の全血あるいは 1 ~ 100 μ l の唾液からトータル（ゲノムおよびミトコンドリア）DNA を分離するためのプロトコールです。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温（15 ~ 25°C）で行ないます。

実験開始前の準備事項

- サンプルを室温（15 ~ 25°C）に戻します。
- 溶出用 Buffer ATE あるいは蒸留水を室温に戻します。
- ステップ 5 およびステップ 14（オプション）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°C にセットします。
- 英語版 Handbook 12 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。
- Buffer AL あるいは Buffer ATL が沈殿物を形成している場合には、70°C に温めて静かに攪拌し沈殿物を溶かします。
- オプション：微量のサンプル (<10 μ l) を処理する場合には、英語版 Handbook 13 ページの説明に従って Buffer ATE で溶解調製したキャリア RNA を Buffer AL に添加します。

操作手順

1. 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に 1 ~ 100 μ l の全血または唾液をピペットで入れる。
2. Buffer ATL を加えて最終容量を 100 μ l にする。
3. 10 μ l の Proteinase K を添加する。
4. 100 μ l の Buffer AL を添加後、蓋を閉めパルスボルテックスで 15 秒間混和する。

効率的な溶解を行なうために、サンプル、Buffer ATL、Proteinase K、Buffer AL を完全に混和して均一な溶液にします。

注：血液量が 10 μ l より少ない場合には Buffer AL にキャリア RNA を添加することをお勧めします（英語版 Handbook 11 ページ参照）。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないので注意します。まず Buffer ATE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。

Buffer AL を Buffer ATL に添加した際に白い沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は QIAamp 調製法には影響しません。これはステップ 5 での加熱インキュベーションの間に溶解します。

5. 56℃で 10 分間インキュベートする。

注：インキュベーション中にサンプルを攪拌すると、DNA 収量が増加します。

6. スピンドアウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。

7. 50 μ l のエタノール (96 ~ 100%) をサンプルに添加し蓋を閉め、15 秒間パルスボルテックスで静かに混和する。室温 (15 ~ 25℃) で 3 分間インキュベートする。

注：室温が 25℃ を超える場合には、チューブに添加する前にエタノールを氷上で冷やしてください。

8. スピンドアウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。

9. ステップ 8 の全ライセートを QIAamp MinElute Column (2 ml のコレクションチューブ中) にカラムの縁を濡らさないように注意してアプライし、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、ろ液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。

10. 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 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

11. QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 700 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

QIAamp MinElute Column とろ液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ろ液が 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、ろ液が QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。

12. 静かに QIAamp MinElute Column を開き、縁を濡らさないように 700 μ l のエタノール (96 ~ 100%) を添加する。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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

13. 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で問題になることがあるので、このステップは必要です。

14. 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、ろ液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、室温（15 ~ 25℃）で 10 分間あるいは 56℃で 3 分間インキュベートする。

15. 20 ~ 100 μ l の **Buffer ATE** あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。

重要：Buffer ATE あるいは蒸留水を室温（15 ~ 25℃）に戻したことを確認します。溶出を少量（<50 μ l）で行なう際には、カラムに結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。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容量を調節します。少量で溶出すると溶出液中の最終 DNA 濃度は増加しますが、DNA 収量は全体的に減少します。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ース量よりも 5 μ l (最高) 少なくなります。

16. 蓋を閉めて、室温（15 ~ 25℃）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 あるいは水をアプライした 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。

プロトコール：組織からのトータル DNA 分離

このプロトコールは 10 mg の組織からのトータル（ゲノムとミトコンドリア）DNA 精製用にデザインされています。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温（15 ~ 25°C）で行ないます。
- 微量の組織から DNA を分離する際には、キャリア RNA が必要です（英語版 Handbook 11、13 ページ参照）。
- 冷却した表面（例：ドライアイスの上に設置したガラス、スチール、アルミニウム板など）で組織サンプルを準備します。
- 凍結組織を使用する場合には、ステップ 2 で Buffer ATL を添加する前にサンプルが解凍しないように注意します。

実験開始前の準備事項

- 溶出用 Buffer ATE あるいは蒸留水を室温（15 ~ 25°C）に戻します。
- ステップ 4 およびステップ 13（オプション）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°C 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ウォーターバスを使用できます。
- Buffer AL あるいは Buffer ATL が沈殿物を形成している場合には、70°C に温めて静かに攪拌し沈殿物を溶かします。
- 英語版 Handbook 12 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。

操作手順

1. 10 mg 以下の組織サンプルを 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に入れる。
2. 室温（15 ~ 25°C）に戻した 180 μ l の Buffer ATL を迅速に添加する。
3. 20 μ l の Proteinase K を添加し、パルスボルテックスで 15 秒間、混和する。
4. サーモミキサーあるいはインキュベーターに 1.5 ml チューブをセットし、一晩あるいは完全にサンプルが溶解するまで 56°C でインキュベートする。

微量のサンプルを使用する際には、溶解は 4 ~ 6 時間で完了しますが、良好な結果は一晩溶解した後に得られます。

5. **200 μ l の Buffer AL を添加後、蓋を閉めパルスボルテックスで 15 秒間混和する。**
効率的な溶解を行なうためには、サンプルと Buffer AL が完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。
注：キャリア RNA が必要な際は（英語版 Handbook 11 ページ）、溶解した 1 μ g のキャリア RNA を 200 μ l の Buffer AL に添加します。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないので注意します。まず Buffer ATE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。
6. **200 μ l のエタノール (96 ~ 100%) をサンプルに添加し蓋を閉め、15 秒間ボルテックスで静かに混和する。室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートする。**
注：室温が 25°C を超える場合には、チューブに添加する前にエタノールを氷上で冷やしてください。
7. **スピンドウンして 1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。**
8. **ステップ 7 の全ライセートを QIAamp MinElute Column (2 ml のコレクションチューブ中) にカラムの縁を濡らさないように注意してアプライし、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、ろ液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。
9. **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 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。**
10. **QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 700 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。**
QIAamp MinElute Column とろ液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ろ液が 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、ろ液が QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。
11. **静かに QIAamp MinElute Column を開き、縁を濡らさないように 700 μ l のエタノール (96 ~ 100%) を添加する。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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。**

12. 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で問題になることがあるので、このステップは必要です。

13. 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、ろ液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、室温 (15 ~ 25°C) で 10 分間あるいは 56°C で 3 分間インキュベートする。

14. 20 ~ 100 µl の Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。

重要 : Buffer ATE あるいは蒸留水を室温 (15 ~ 25°C) に戻したことを確認します。溶出を少量 (<50 µl) で行なう際には、カラムに結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。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容量を調節します。少量で溶出すると溶出液中の最終 DNA 濃度は増加しますが、DNA 収量は全体的に減少します。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ー量よりも 5 µl (最高) 少なくなります。

15. 蓋を開けて、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 あるいは水をアプライした 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。

プロトコール:LMD (レーザーマイクロダイセクション) により採取した切片からのトータル DNA 分離

このプロトコールは LMD により採取した組織切片からのトータル (ゲノムとミトコンドリア) DNA 精製用にデザインされています。LMD により採取した組織切片からの核酸分離は、非常に微量のスタートサンプルから核酸を精製しなければならないために、研究者にとって大きな課題です。さらに固定や染色ステップにより DNA の品質が低下します。この問題を最低限に抑えるため、固定化プロトコールの改良あるいは瞬間凍結サンプルから凍結切片を用いる必要性が生じます。

サンプルからの切片作製、染色、マイクロダイセクション用機器および消耗品は Leica® にて入手可能です (www.leica-microsystems.co.jp)。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温 (15 ~ 25°C) で行ないます。
- 少数細胞から DNA を分離する際にはキャリア RNA が必要です (英語版 Handbook 11、13 ページ参照)。

実験開始前の準備事項

- サンプルを室温 (15 ~ 25°C) に戻します。
- 溶出用 Buffer ATE あるいは蒸留水を室温に戻します。
- ステップ 3 およびステップ 13 (オプション) 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°C 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ウォーターバスを使用できます。
- Buffer AL あるいは Buffer ATL が沈殿物を形成している場合には、70°C に温めて静かに攪拌し沈殿物を溶かします。
- 英語版 Handbook 12 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。

操作手順

1. 0.2 ml のマイクロ遠心チューブ (別途準備) 中の LMD サンプルに 15 µl の Buffer ATL を添加する。
2. 10 µl の Proteinase K を添加し、パルスボルテックスで 15 秒間混和する。
3. 0.2 ml のチューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、56°C で 3 時間 (ホルマリン固定組織では 16 時間)、時々攪拌しながらインキュベートする。
インキュベーション時間は採取した組織量により変動します。
4. 25 µl の Buffer ATL を添加する。

5. **50 μ l の Buffer AL を添加後、蓋を閉めパルスボルテックスで 15 秒間混和する。**
効率的な溶解を行なうためには、サンプルと Buffer AL が完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。
注：キャリア RNA が必要な際は（英語版 Handbook 11 ページ）、溶解した 1 μ g のキャリア RNA を 50 μ l の Buffer AL に添加します。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないので注意します。まず Buffer ATE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。
6. **50 μ l のエタノール (96 ~ 100%) をサンプルに添加し蓋を閉め、15 秒間ボルテックスで静かに混和する。室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートする。**
注：室温が 25°C を超える場合には、チューブに添加する前にエタノールを氷上で冷やしてください。
7. **スピンドウンして 0.2 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。**
8. **ステップ 7 の全ライセートを QIAamp MinElute Column (2 ml のコレクションチューブ中) にカラムの縁を濡らさないように注意してアプライし、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、ろ液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。
9. **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 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。**
10. **QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように 700 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。**
QIAamp MinElute Column とろ液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ろ液が 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、ろ液が QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。
11. **静かに QIAamp MinElute Column を開き、縁を濡らさないように 700 μ l のエタノール (96 ~ 100%) を添加する。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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。**

12. 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で問題になることがあるので、このステップは必要です。

13. 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、ろ液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、室温 (15 ~ 25°C) で 10 分間あるいは 56°C で 3 分間インキュベートする。

14. 20 ~ 30 µl の Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。

重要: Buffer ATE あるいは蒸留水を室温 (15 ~ 25°C) に戻したことを確認します。カラム結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。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容量を調節します。少量で溶出すると溶出液中の最終 DNA 濃度は増加しますが、DNA 収量は全体的に減少します。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ー量よりも 5 µl (最高) 少なくなります。

15. 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 あるいは水をアプライした 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。

プロトコール：骨および歯からのトータル DNA 分離

このプロトコールは骨や歯からのトータル（ゲノムとミトコンドリア）DNA 精製用にデザインされています。

実験を始める前の重要事項

- 溶解時間は、スタートサンプルのサイズおよび密度により異なります。ここに記載されている溶解条件はガイドラインとしてご使用ください。
- すべての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。

実験開始前の準備事項

- 溶出用 Buffer ATE あるいは蒸留水を室温（15～25℃）に戻します。
- ステップ 2 およびステップ 15（オプション）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、ステップ 5 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 70℃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ウォーターバスを使用できます。
- 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 12 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。
- オプション：微量のスタートサンプルを処理する場合には、英語版 Handbook 13 ページの説明に従って Buffer ATE で溶解調製したキャリア RNA を Buffer AL に添加します。

操作手順

1. 骨を細かく砕く。液体窒素を半分充填した金属製ブレンダーを使って細かい粉末にする。あるいは TissueLyser および Grinding Jar Set, S. Steel を用いて細かい粉末にする。

TissueLyser を使用する際には、骨サンプルとボールを粉碎ジャーに入れます。破碎ジャーの中のボールと骨断片の上に液体窒素を注ぎます。温度が平衡になるまで待ちます（液体窒素の沸騰が停止する）。デカンテーションにより過剰な液体窒素を捨て、破碎ジャーの蓋を閉め、TissueLyser にセットします。骨を 30 Hz で 1 分間、あるいは骨が粉末になるまで粉碎します（粉碎時間は骨のタイプ、状態、大きさにより異なる）。

2. 粉末の骨 ≤100 mg を 1.5ml のマイクロ遠心チューブに入れる。360 μl の Buffer ATL、20 μl の Proteinase K を入れる。56℃で一晩インキュベートする。

インキュベーションの後、ステップ 5 のインキュベーションのために温度を 70℃に設定します。

3. マイクロ遠心チューブをスピンドウンして蓋の内側に付着した溶液を回収する。
4. **300 μ l** の **Buffer AL** を添加後、蓋を閉めパルスボルテックスで **10 秒間**混和する。
効率的な溶解を行なうためには、サンプルと Buffer AL が完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。
Buffer AL を Buffer ATL に添加した際に白い沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は QIAamp 調製法には影響しません。これはステップ 5 でのインキュベーションの間に溶解します。
注：キャリア RNA が必要な際は（英語版 Handbook 11 ページ）、溶解した 1 μ g のキャリア RNA を 300 μ l の Buffer AL に添加します。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないので注意します。まず Buffer ATE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。
5. チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、**70°C** で **10 分間**、**900 rpm** で振盪させながらインキュベートする。
ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを 3 分毎に 10 秒間ボルテックスし混和します。
6. 最高速度 (**20,000 x g ; 14,000 rpm**) で 1 分間チューブの遠心操作を行ない、上清を新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に静かに移す。
7. **150 μ l** のエタノール (**96 ~ 100%**) を加える。蓋をして、**15 秒間**パルスボルテックスして混和する。
ステップ 9 での結合を効率的に行なうためには、サンプルとエタノールが完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。
8. スピンドウンして **1.5 ml** チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。
9. **QIAamp MinElute Column (2 ml コレクションチューブ中)** のカラムの縁を濡らさないように注意して、ステップ 8 の全ライセートをアプライする。
10. 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、ろ液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。
11. **QIAamp MinElute Column** を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように **600 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

12. **QIAamp MinElute Column** を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように **700 μ l** の **Buffer AW2** を添加する。蓋を開けて **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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

QIAamp MinElute Column とろ液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ろ液が 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、ろ液が QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。

13. 静かに **QIAamp MinElute Column** を開き、縁を濡らさないように **700 μ l** のエタノール (**96 ~ 100%**) を添加する。蓋を開け **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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。
14. 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で問題になることがあるので、このステップは必要です。

15. 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、ろ液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、室温 (**15 ~ 25°C**) で **10 分間**あるいは **56°C** で **3 分間** インキュベートする。
16. **20 ~ 50 μ l** の **Buffer ATE** あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。

重要 : Buffer ATE あるいは蒸留水を室温 (**15 ~ 25°C**) に戻したことを確認します。カラム結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。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容量を調節します。少量で溶出すると溶出液中の最終 DNA 濃度は増加しますが、DNA 収量は全体的に減少します。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。

17. 蓋を開けて、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 あるいは水をアプライした 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。

プロトコール：性犯罪検体からのトータル DNA 分離

このプロトコールは、精子細胞の混ざった上皮細胞が付着している繊維あるいはスワブからのトータル（ゲノムとミトコンドリア）DNA の特異的な抽出用にデザインされています。

実験を始める前の重要事項

- すべての遠心操作は室温（15 ~ 25℃）で行ないます。
- Buffer ATL が別途必要です（英語版 Handbook 56 ページの ordering information 参照）。

実験開始前の準備事項

- 溶出用 Buffer ATE あるいは蒸留水を室温（15 ~ 25℃）に戻します。
- ステップ 3、10 および 23（オプション）で使用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、ステップ 13 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 70℃ 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ウォーターバスを使用できます。
- 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 12 ページの説明に従って Buffer AW1 および AW2 を調製したことを確認します。
- 1 M DTT (dithiothreitol) ストック溶液を調製します。分注して -20℃ で保管します。使用直前に速やかに解凍します。
- オプション：微量のスタートサンプルを処理する場合には、英語版 Handbook 13 ページの説明に従って Buffer ATE で溶解調製したキャリア RNA を Buffer AL に添加します。

操作手順

1. スワブあるいは一片の繊維（ $\leq 0.5 \text{ cm}^2$ ）を 2 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に入れる。
綿棒あるいは DACRON スワブを手またはハサミを用いて柄から外します。
2. 20 μl の Proteinase K、500 μl の Buffer ATL をサンプルに入れる。蓋を閉めて、パルスボルテックスで 10 秒間混和する。
3. 2 ml チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、56℃ で 1 時間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。
ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを 10 分毎に 10 秒間ボルテックスし混和します。
4. スピンドアウンして 2 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。

5. チューブから固形物質を取り除く。

注：最高 200 μl のライセートがスワブまたは繊維に残存しています。この残ったライセートを回収するために、QIAshredder Spin Column（別途準備）にスワブまたは繊維を入れます。この QIAshredder Spin Column をライセートの入った 2 ml チューブに入れ、最高速度（20,000 $\times g$ ；14,000 rpm）で 2 分間遠心操作します。スワブまたは繊維の入った QIAshredder Spin Column を取り出し廃棄します。

6. 最高スピードで 5 分間遠心操作を行なう。ペレットを乱さないように注意して 30 μl の上清を残して他を新しいチューブに移す。

注：上皮細胞からの DNA 分離には、300 μl の上清を 2 ml のマイクロ遠心チューブに入れてステップ 12 に続けます。

7. 500 μl の Buffer ATL でペレットを再懸濁する。蓋をして、10 秒間パルスボルテックスして混和する。最高スピードで 5 分間遠心操作を行なう。ペレットを乱さないように注意して 30 μl の上清を残して他を吸引し廃棄する。

8. ステップ 7 を 3 回繰り返す。

注：上皮細胞と精子細胞の比率は、精子核の精製ステップを繰り返す回数により異なります。

9. 280 μl の Buffer ATL、10 μl の Proteinase K、10 μl の 1 M DTT をペレットに入れる。蓋をして、10 秒間パルスボルテックスして混和する。

10. 2 ml チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし 56°C で最低 1 時間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。

ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを 10 分毎に 10 秒間ボルテックスし混和します。

11. マイクロ遠心チューブをスピンドウンして蓋の内側に付着した溶液を回収する。

12. 300 μl の Buffer AL を添加後、蓋を閉めパルスボルテックスで 10 秒間混和する。
効率的な溶解を行なうためには、サンプルと Buffer AL が完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。

Buffer AL を Buffer ATL に添加した際に白い沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は QIAamp 調製法には影響しません。これはステップ 13 でのインキュベーションの間に溶解します。

注：キャリア RNA が必要な際は（英語版 Handbook 11 ページ）、溶解した 1 μg のキャリア RNA を 300 μl の Buffer AL に添加します。キャリア RNA は Buffer AL に溶解しないので注意します。まず Buffer ATE に溶かしてから Buffer AL に添加してください。

13. チューブをサーモミキサーあるいはインキュベーターにセットし、70℃で10分間、900 rpm で振盪させながらインキュベートする。

ヒートブロックまたはウォーターバスを用いる際には、溶解を増進させるためにチューブを3分毎に10秒間ボルテックスし混和します。
14. 最高速度 (20,000 x g ; 14,000 rpm) で1分間チューブの遠心操作を行ない、上清を新しい1.5 mlのマイクロ遠心チューブ (別途準備) に静かに移す。
15. 150 µl のエタノール (96 ~ 100%) を加える。蓋をして、15秒間パルスボルテックスして混和する。

ステップ17での結合を効率的に行なうためには、サンプルとエタノールが完全に混和して均一な溶液になっていることが重要です。
16. スピンドアウンして1.5 ml チューブの蓋の内側に付着したサンプルを集める。
17. QIAamp MinElute Column (2 ml コレクションチューブ中) のカラムの縁を濡らさないように注意して、ステップ16の全ライセートをアプライする。
18. 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、ろ液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。
19. QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように500 µl 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。
20. QIAamp MinElute Column を静かに開き、カラムの縁を濡らさないように700 µl 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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

QIAamp MinElute Column とろ液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ろ液が 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、ろ液が QIAamp MinElute Column と接触することがあるので注意が必要です。
21. 静かに QIAamp MinElute Column を開き、縁を濡らさないように700 µl のエタノール (96 ~ 100%) を添加する。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、ろ液を含むコレクションチューブを捨てる。

- 22. 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で問題になることがあるので、このステップは必要です。

- 23. 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、ろ液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、室温 (15 ~ 25°C) で 10 分間あるいは 56°C で 3 分間インキュベートする。**

- 24. 20 ~ 50 µl の Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライする。**

重要 : Buffer ATE あるいは蒸留水を室温 (15 ~ 25°C) に戻したことを確認します。カラム結合した DNA を完全に溶出するために、Buffer ATE あるいは蒸留水をメンブレンの中央にアプライします。

QIAamp MinElute Column は溶出量の調節が可能です。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容量を調節します。少量で溶出すると溶出液中の最終 DNA 濃度は増加しますが、DNA 収量は全体的に減少します。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ー量よりも 5 µl (最高) 少なくなります。

- 25. 蓋を開けて、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 あるいは水をアプライした 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) キャリア RNA を BufferAL に添加していない | Buffer ATE で溶解したキャリア RNA を Buffer AL と混和する（英語版 Handbook 13 ページ）。新しいサンプルで再度調製を行なう。 |
| b) サンプルの凍結と解凍を 2 回以上行なわない | サンプルを繰り返して凍結・解凍することを避ける。常に新鮮なサンプルあるいは一回のみ解凍したサンプルを使用する。 |
| c) サンプルを室温で長期間放置した | 室温での長期保存はサンプルの DNA を分解することがある。常に新鮮なサンプルを使用するか、2～8℃（液状の血液）あるいは -20℃（組織サンプル）でサンプルを保存する。乾燥血液斑、血痕、血液スワブは遮光して室温で保存すると、顕著な DNA 分解は見られない。 |
| d) Buffer AL 中でのサンプル溶解が不十分 | Proteinase K がより高温で長期間保存されていた。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。 |
| e) Buffer AL とキャリア RNA の混和が不十分 | Buffer AL とキャリア RNA の入ったチューブを少なくとも 10 回静かに転倒させることにより混和させる。 |
| f) 96～100%エタノールの代わりに低いパーセントのエタノールを使用した | 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。 |
| g) Buffer AW1 あるいは AW2 の調製が不正確 | Buffer AW1 および AW2 濃縮液を 96～100% の正確な量のエタノールで希釈したことを確認する。新しいサンプルで精製操作をやり直す。 |
| h) 溶出に使用した水の pH 値が低すぎる | DNA は酸性溶液で溶解しにくい。溶出に使用した水の pH 値が 7 以上であることを確認する。 |

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) 溶出液中の DNA が少ないか皆無 | “溶出液中の DNA が少ないか皆無” (42 ページ) を参照にして原因究明する。可能なら、反応液に添加する溶出液量を増やす。 |
| b) 溶出液中のキャリア RNA が多すぎるか少なすぎる | 増幅反応に最適なキャリア RNA の最大量を決める。それに応じて Buffer AL に添加するキャリア RNA の濃度を調節する。 |
| c) 感度が低下 | 増幅反応に適した溶出液の最大量を決める。それに応じて増幅反応液に添加する溶出液量を増減する。溶出バッファーの量はこれに比例して調節する。 |
| d) ダウンストリームのアッセイで精製 DNA のパフォーマンスが洗浄バッファーの調製日により変動 | 洗浄バッファーである Buffer AW1 および AW2 の塩とエタノール成分が長期間放置した後分離した。使用前に常にバッファーを完全に混和する。 |

一般的な操作

- | | |
|---------------------------------|--|
| a) 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。 |
| b) 溶出液量が変動する | 異なるサンプルタイプを調製した。 |

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, MinElute® (QIAGEN Group);
DACRON® (E. I. du Pont de Nemours and Company); FTA® (Whatman Group); Leica® (Leica IR GmbH).

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。

© 2007–2010 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

