

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

下記のサンプルからの DNA 精製：

全血

血漿

血清

バフィコート

リンパ球

乾燥血液班 (QIAamp DNA Mini Kit のみ)

体液

培養細胞

スワブ

組織 (QIAamp DNA Mini Kit のみ)



目次

プロトコール

血液あるいは体液からの DNA 精製 (スピンプロトコール)	3
血液あるいは体液からの DNA 精製 (吸引プロトコール)	6
組織からの DNA 精製 (QIAamp DNA Mini Kit)	9
口腔スワブからの DNA 精製 (スピンプロトコール)	13
口腔スワブからの DNA 精製 (吸引プロトコール)	16
乾燥血液斑からの DNA 精製 (QIAamp DNA Mini Kit)	19
トラブルシューティング	21

プロトコール：血液あるいは体液からの DNA 精製 (スピンプロトコール)

本プロトコールはマイクロ遠心機を用いた全血、血漿、血清、パフィコート、リンパ球、体液からのトータル (ゲノム、ミトコンドリア、ウイルス) DNA 精製用です。吸引装置を用いたトータル DNA 精製に関しては 6 ページの “プロトコール：血液あるいは体液からの DNA 精製 (吸引プロトコール)” を参照してください。

実験を始める前の重要事項

- 全ての遠心操作は室温 (15 ~ 25°C) で行ないます。
- サンプル中の DNA 量が少ない場合 (10,000 コピー以下) はキャリア DNA を使用してください (英語版 Handbook 18 ページ参照)。
- 全血 200 μ l からの DNA 収量は 3 ~ 12 μ g です。さらに高い収量が必要な場合には、パフィコートからの調製 (英語版 Handbook 19 ページ参照) を推奨します。

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。
- ステップ 4 に使用するウォーターバスまたはヒートブロックを 56°C に加熱しておきます。
- ステップ 11 の溶出に使用する Buffer AE あるいは精製水を室温にします。
- Buffer AW1、Buffer AW2、QIAGEN Protease を英語版 Handbook 17 ページの説明に従って調製したことを確認してください。
- Buffer AL 中に沈殿物がある場合には 56°C で溶解してください。

操作手順

1. 1.5 ml マイクロチューブの底に **QIAGEN Protease** (あるいは **Proteinase K**) 20 μ l をピペッティングする。
2. このマイクロチューブにサンプル 200 μ l を添加する。全血、血漿、血清、パフィコートあるいは体液は 200 μ l まで、また、PBS 200 μ l 中のリンパ球数は 5×10^6 個まで使用可能。

サンプル量が 200 μ l 以下の場合には PBS で 200 μ l に調製します。

QIAamp Mini Spin Column はサンプル中に RNA および DNA が存在する場合には両方の核酸を精製します。RNA は精製後のいくつかの酵素反応を阻害することがありますが、PCR 反応には影響しません。RNA フリーのゲノム DNA が必要な場合には、Buffer AL の添加前に、RNase A ストック溶液 (100 mg/ml) 4 μ l を添加します。

注：マイクロチューブに既に懸濁されているサンプルに QIAGEN Protease (あるいは Proteinase K) を添加できます。この場合、酵素を添加した後に完全に混和することが重要です。

3. サンプルに **200 µl** の **Buffer AL** を添加する。パルスボルテックスによりサンプルを **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 を十分に混和し、完全に均一な溶液を形成することが重要です。

サンプル量が 200 µl 以上の場合には、QIAGEN Protease (あるいは Proteinase K) および Buffer AL の量をサンプル量に比例して増加します。例えば、400 µl のサンプルには QIAGEN Protease (あるいは Proteinase K) 40 µl、Buffer AL 400 µl が必要です。サンプル量が 400 µl 以上の場合には、QIAamp DNA Blood Midi あるいは Maxi Kit の使用をお勧めします。これらのキットでは、それぞれ最高 2 ml あるいは 10 ml のサンプルまで処理できます。

注：QIAGEN Protease あるいは Proteinase K を Buffer AL に直接添加しないでください。

4. **56°C** で **10 分間**インキュベートする。

DNA 収量は 56°C、10 分間の溶解後に最高に達します。インキュベーション時間の延長は、精製される DNA の品質および収量には影響しません。

5. **1.5 ml** マイクロチューブを数秒間スピンドウンして蓋の内側についた溶液を収集する。
6. サンプルにエタノール (**96 ~ 100%**) **200 µl** を添加し、再び **15 秒間**ボルテックスした後、**1.5 ml** マイクロチューブを数秒間スピンドウンして蓋の内側についた溶液を収集する。

サンプル容量が 200 µl 以上の場合には、エタノール量も比例して増加します。例：400 µl のサンプルには 400 µl のエタノールが必要です。

7. ステップ 6 の混合液を **QIAamp Mini Spin 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。蓋を閉めて **6,000 x g (8,000 rpm)** で **1 分間**遠心分離する。**QIAamp Mini Spin Column** を新しい **2 ml** コレクションチューブ (付属品) に移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる*。

遠心分離中のエアゾール形成を避けるために、各スピнкаラムは密閉してください。

遠心分離中の騒音を減少するために、遠心分離は 6,000 x g (8,000 rpm) で行ないます。最高速度での遠心操作は DNA の収量および品質には影響しません。遠心操作後、ライセートが QIAamp Mini Spin Column を完全に通過しなかった場合には、スピнкаラムが空になるまで、より早い速度で遠心操作を行なってください。

注：バフィコートあるいはリンパ球から DNA を調製する場合には、目詰まりを避けるために、最高速度で遠心分離することをお勧めします。

* Buffer AL あるいは Buffer AW1 を含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 8 ページをご覧ください。

8. 注意深く QIAamp Mini Spin Column を開き、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 分間遠心分離する。QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (付属品) に移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる*。

サンプル量が 200 μ l 以上の場合でも Buffer AW1 の量を増加する必要はありません。

9. 注意深く QIAamp Mini Spin Column を開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l の Buffer AW2 を添加する。蓋を閉めて最高速度 (20,000 x g、14,000 rpm) で 3 分間遠心分離する。

10. 推奨: QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (別途準備) にのせ、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。最高スピードで 1 分間遠心操作を行なう。

このステップにより Buffer AW2 のキャリーオーバーの可能性を排除することができます。

11. QIAamp Mini Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブ (別途準備) に移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。注意深く QIAamp Mini Spin Column を開き、200 μ l の Buffer AE あるいは精製水を添加する。室温 (15 ~ 25°C) で 1 分間インキュベートした後、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心分離する。

Buffer AE あるいは精製水を添加した QIAamp Mini Spin Column を室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートすることにより、DNA 収量は増加します。

Buffer AE 200 μ l で再度溶出することにより、DNA 収量は 15% まで増加します。

スピncラムと溶出液が接触すると、遠心操作中にエアゾールが形成される危険性があるので、1.5 ml マイクロチューブへは 200 μ l 以上の容量で溶出しないでください。

200 μ l 以下で溶出を行なう場合は、溶出液中の DNA 濃度は増加しますが、トータルの DNA 収量が多少低下することがあります (英語版 Handbook 26 ページ、Table 5 参照)。サンプル中の DNA が 1 μ g 以下の場合には、50 μ l の Buffer AE あるいは精製水で溶出することをお勧めします。200 μ l で 1 回溶出する代わりに 100 μ l で 2 回溶出しても、溶出効果は増加しません。

精製水で保存した DNA は酸性加水分解を起こすため、長期間 DNA を保存する場合には Buffer AE で溶出し、-20°C で保存することをお勧めします。

ヒト全血 200 μ l (約 5×10^6 白血球/ml) のサンプルから 200 μ l の水で溶出した場合、 A_{260}/A_{280} 比率が 1.7 ~ 1.9 の DNA 6 μ g (30 ng/ μ l) が通常得られます。溶出に関する詳細なインフォメーションおよび DNA の収量、純度ならびに DNA サイズの決定方法については英語版 Handbook 25 ~ 26 ページおよび 51 ページの Appendix A を参照してください。

* Buffer AL あるいは Buffer AW1 を含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 8 ページをご覧ください。

プロトコール：血液あるいは体液からの DNA 精製 (吸引プロトコール)

本プロトコールは QIAvac 24 Plus あるいは相当する吸引マニホールドを用いた全血、血漿、血清、パフィコート、リンパ球、体液からのトータル（ゲノム、ミトコンドリア、ウイルス）DNA 精製用です。マイクロ遠心機を用いたトータル DNA 精製に関しては、3 ページの “プロトコール：血液あるいは体液からの DNA 精製（スピンプロトコール）” を参照してください。

実験を始める前の重要事項

- 全ての遠心操作は室温（15 ~ 25℃）で行ないます。
- QIAvac 24 Plus のセットアップに関しては英語版 Handbook 20 ~ 24 ページを参照ください。
- 吸引操作中に一定の吸引力を確保するために、各プロトコールステップの間は必ず吸引ポンプのスイッチを切ってください。
- サンプル中の DNA 量が少ない場合（10,000 コピー以下）はキャリア DNA を使用します（英語版 Handbook 18 ページ参照）。
- 全血 200 μ l からの DNA 収量は 3 ~ 12 μ g です。

実験開始前の準備事項

- サンプルを室温（15 ~ 25℃）に戻します。
- ステップ 4 に使用するウォーターバスまたはヒートブロックを 56℃ に加熱しておきます。
- ステップ 11 の溶出に使用する Buffer AE あるいは精製水を室温にします。
- Buffer AW1、Buffer AW2、QIAGEN Protease を英語版 Handbook 17 ページの説明に従って調製したことを確認してください。
- Buffer AL 中に沈殿物がある場合には 56℃ で溶解してください。

操作手順

1. 1.5 ml マイクロチューブの底に **QIAGEN Protease**（あるいは **Proteinase K**）20 μ l をピペッティングする。
2. このマイクロチューブにサンプル 200 μ l を添加する。全血、血漿、血清、あるいは体液は 200 μ l まで、また、PBS 200 μ l 中のリンパ球数は 5×10^6 個まで使用可能。

サンプル量が 200 μ l 以下の場合には PBS を適量追加し、200 μ l にします。

QIAamp Mini Spin Column はサンプル中に RNA および DNA が存在する場合には両方の核酸を精製します。RNA は精製後のいくつかの酵素反応を阻害することがありますが、PCR 反応には影響しません。RNA フリーのゲノム DNA が必要な場合には、Buffer AL の添加前に、RNase A ストック溶液（100 mg/ml）4 μ l をサンプルに添加します。

注：マイクロチューブに既に懸濁されているサンプルに QIAGEN Protease（あるいは Proteinase K）を添加できます。この場合、酵素を添加した後に完全に混和することが重要です。

3. サンプルに 200 μ l の Buffer AL を添加する。ボルテックスによりサンプルを 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 を十分に混和し、完全に均一な溶液を形成することが重要です。

サンプル量が 200 μ l 以上の場合には、QIAGEN Protease（あるいは Proteinase K）および Buffer AL の量をサンプル量に比例して増加します。例えば、400 μ l のサンプルには QIAGEN Protease（あるいは Proteinase K）40 μ l、Buffer AL 400 μ l が必要です。サンプル量が 400 μ l 以上の場合には、QIAamp DNA Blood Midi あるいは Maxi Kit の使用をお勧めします。これらのキットでは、それぞれ最高 2 ml あるいは 10 ml のサンプルまで処理できます。

注：QIAGEN Protease あるいは Proteinase K を Buffer AL に直接添加しないでください。

4. 56°C で 10 分間インキュベートする。

DNA 収量は 56°C、10 分間の溶解後に最高に達します。インキュベーション時間の延長は、精製される DNA の品質および収量には影響しません。

5. 1.5 ml マイクロチューブを数秒間スピンドウンして蓋の内側についた溶液を収集する。

6. サンプルにエタノール（96 ~ 100%）200 μ l を添加し、再び 15 秒間ボルテックスした後、1.5 ml マイクロチューブを数秒間スピンドウンして蓋の内側についた溶液を収集する。

サンプル容量が 200 μ l 以上の場合には、エタノール量も比例して増加します。例：400 μ l のサンプルには 400 μ l のエタノールが必要です。

7. QIAvac 吸引マニホールド上の VacConnector に QIAamp Mini Spin Column を差し込む。ステップ 6 の混合液を QIAamp Mini Spin Column 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。真空ポンプのスイッチを入れる。吸引中は QIAamp Mini Spin Column の蓋が開いていることを確認する。すべてのライセートがカラムから流出した後、真空ポンプのスイッチを切る。

プラスチックの袋に入っているコレクションチューブはステップ 10 の遠心分離の際に使用できます。

このステップでライセートの全てがメンブレンを通過しなかった場合には、QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ（添付）に移し、蓋を閉め 6,000 x g（8,000 rpm）で 3 分間あるいは溶液が通過するまで遠心操作を行ないます。ろ液を含むチューブを捨て*、新しい 2 ml コレクションチューブに QIAamp Mini Spin Column を置き、スピンプロトコールのステップ 8（5 ページ）を続けて行ないます。

* Buffer AL あるいは Buffer AW1 を含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 8 ページをご覧ください。

8. QIAamp Mini Spin Column の縁を濡らさないように 750 μ l の Buffer AW1 を添加する。QIAamp Mini Spin Column の蓋を開けたままで真空ポンプのスイッチを入れる。Buffer AW1 のすべてが QIAamp Mini Spin Column から流出した後、真空ポンプのスイッチを切る。
9. QIAamp Mini Spin Column の縁を濡らさないように 750 μ l の Buffer AW2 を添加する。QIAamp Mini Spin Column の蓋を開けたままで真空ポンプのスイッチを入れる。Buffer AW2 のすべてが QIAamp Mini Spin Column から流出した後、真空ポンプのスイッチを切る。
10. QIAamp Mini Spin Column の蓋を閉め、吸引マニホールドから取り除き、VacConnector は捨てる。QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブに移し、メンブレンを完全に乾燥させるために、20,000 \times g (14,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。
11. 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ (別途準備) に QIAamp Mini Spin Column をセットする。ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。注意深く QIAamp Mini Spin Column を開く。室温 (15 ~ 25°C) に戻した Buffer AE あるいは蒸留水を 200 μ l 添加する。室温で 1 分間インキュベート後、6,000 \times g (8,000 rpm) で 1 分間遠心分離する。

Buffer AE あるいは精製水を添加した QIAamp Mini Spin Column を遠心操作前に室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートすることにより、DNA 収量が通常増加します。

200 μ l の Buffer AE で再度溶出することにより、DNA 収量は 15% まで増加します。

スピncラムと溶出液が接触すると遠心操作中にエアゾールが形成される危険性があるため、1.5 ml マイクロチューブには 200 μ l 以上の容量で溶出しないでください。

200 μ l 以下で溶出を行なう場合は、溶出液中の DNA 濃度は増加しますが、トータルの DNA 収量は多少減少します (英語版 Handbook 26 ページ、Table 5 参照)。サンプル中の DNA が 1 μ g 以下の場合は、50 μ l の Buffer AE あるいは精製水で溶出することをお勧めします。200 μ l で 1 回溶出する代わりに 100 μ l で 2 回溶出しても溶出効果は増加しません。

精製水で保存した DNA は酸性加水分解を起こすため、長期間 DNA を保存する場合には Buffer AE で溶出し、-20°C で保存することをお勧めします。

ヒト全血 200 μ l (約 5×10^6 白血球 /ml) のサンプルから 200 μ l の水で溶出した場合、 A_{260}/A_{280} 比率が 1.7 ~ 1.9 の DNA 6 μ g (30 ng/ μ l) が通常得られます。溶出に関する詳細なインフォメーションおよび DNA の収量、純度ならびに DNA サイズの決定方法については英語版 Handbook 25 ~ 26 ページおよび 51 ページの Appendix A を参照してください。

プロトコール：組織からの DNA 精製 (QIAamp DNA Mini Kit)

本プロトコールは QIAamp DNA Mini Kit を用いた組織からのトータル DNA (ゲノム、ミトコンドリア、ウイルス) 精製用です。

実験を始める前の重要事項

- 全ての遠心操作は室温 (15 ~ 25°C) で行ないます。
- サンプル中の DNA 量が少ない場合 (10,000 コピー以下) はキャリア DNA を使用します (英語版 Handbook 18 ページ参照)。
- DNA が分解されるため、保存したサンプルを繰り返し凍結融解することは避けてください。
- 肝臓や腎臓のような転写反応が活発な組織は RNA 含有量が高いため、ゲノム DNA とともに RNA が精製されることがあります。RNA は精製後のいくつかの酵素反応を阻害することがありますが、PCR 反応には影響しません。RNA フリーのゲノム DNA が必要な場合には、本プロトコールのステップ 5a に記載されているように RNase A 分解を行ないます。

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。
- ウォーターバスまたはヒートブロックを 2 個用意し、一つをステップ 3 用に 56°C に、もう一つをステップ 5 用に 70°C に加熱してください。
- ステップ 11 の溶出に使用する Buffer AE あるいは精製水を室温にします。
- 英語版 Handbook 17 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てください。
- Buffer ATL または Buffer AL 中に沈澱物がある場合は 56°C で溶解してください。

操作手順

1. 組織サンプルを切り取る、あるいは保存していたサンプルを取り出す。使用する組織量を決定する。25 mg (脾臓は 10 mg) 以上使用しない。

組織サンプルの重量の測定が、組織量を決定する最も正確な方法です。

脾臓からの DNA 調製の場合には 10 mg 以上は使用しないでください。

DNA 収量は調製する組織サンプルの量とタイプに依存します。

1 mg の組織から得られる DNA 収量は約 0.2 ~ 1.2 µg です。

2. 組織サンプルを細かくカット (ステップ 2a)、すり砕く (ステップ 2b)、あるいは機械的に破砕 (ステップ 2c) する。

QIAamp 調製法では組織サンプルの機械的な破砕の必要はありませんが、サンプルを前もって液体窒素中ですり砕いたり、機械的にホモジナイズすることで溶解時間を短縮できます。

- 2a. 組織 25 mg（脾臓は 10 mg まで）を細かくカットする。1.5 ml マイクロチューブに組織を入れ、180 μ l の Buffer ATL を添加する。ステップ 3 に進む。

溶解時間を短縮するために必ず組織を細かくカットしてください。

2 ml チューブの方がより溶解に適しています。

- 2b. 最高 25 mg の組織（脾臓は 10 mg）を液体窒素に入れ、乳鉢と乳棒を用いて完全に細かくすり碎く。粉末状組織と液体窒素を 1.5 ml マイクロチューブにデカントにより入れる。液体窒素を蒸発させるが、サンプルが解凍しないように注意する。180 μ l の Buffer ATL を添加する。ステップ 3 に進む。

- 2c. 25 mg までの組織（脾臓は 10 mg まで）を 80 μ l 以下の PBS が入った 1.5 ml マイクロチューブに添加する。TissueRuptor™あるいはこれに相当するローター／ステーター方式ホモジナイザーを用いてサンプルをホモジナイズする。100 μ l の Buffer ATL を添加し、ステップ 3 に進む。

いくつかのサンプルは完全に溶解するために希釈していない Buffer ATL が必要です。このような場合には、液体窒素中でサンプルをすり碎くことをお勧めします。Buffer ATL は界面活性剤を含むため、サンプルを Buffer ATL 中で直接ホモジナイズできません。

3. Proteinase K 20 μ l を添加後、ボルテックスし、組織が完全に溶解するまで 56°C でインキュベートする。サンプルを拡散するために時々ボルテックスするか、振とう器付きのウォーターバスあるいはシェーカーを使用する。

注：Proteinase K を必ず使用してください。QIAGEN Protease は Buffer ATL の存在下では活性が低下します。

溶解時間は使用する組織タイプにより変動します。通常、溶解は 1～3 時間で完了します。溶解を一晩中行なっても調製には影響しません。効率的な溶解を確実にするため、振とう器付きのウォーターバスあるいはシェーカーを使用してください。もし、そのような装置がない場合には、インキュベーション中に 1 時間に 2～3 回ボルテックスすることをお勧めします。

4. 1.5 ml マイクロチューブを数秒間スピンドウンして蓋の内側についた溶液を収集する。
5. RNA フリーなゲノム DNA が必要な場合には、ステップ 5a に進む。それ以外の場合には、ステップ 5b に進む。

肝臓や腎臓のような転写反応が活発な組織は RNA 含有量が高いため、ゲノム DNA と共に RNA が精製されることがあります。RNA は精製後のいくつかの酵素反応を阻害することがありますが、PCR 反応には影響しません。

- 5a. まず RNase A (100 mg/ml) 4 μ l を添加し、15 秒間ボルテックスした後、室温 (15～25°C) で 2 分間インキュベートする。1.5 ml マイクロチューブを数秒間スピンドウンして溶液を収集後、200 μ l の Buffer AL をサンプルに添加する。再度 15 秒間パルスボルテックスし、70°C で 10 分間インキュベートする。1.5 ml マイクロチューブを数秒間スピンドウンして蓋の内側に付いた溶液を収集する。

サンプルと Buffer AL が十分に混和し完全に均一な溶液を形成していることが重要です。

Buffer AL の添加により沈殿物が生じることがあります。ほとんどの場合、沈殿物は 70℃ で溶解します。この沈殿物は QIAamp 調製あるいはどのような精製後の実験にも悪影響を与えません。

- 5b. 200 µl の Buffer AL をサンプルに添加後、15 秒間パルスボルテックスし、70℃ で 10 分間インキュベートする。1.5 ml マイクロチューブを数秒間スピンドウンして蓋の内側に付いた溶液を収集する。**

サンプルと Buffer AL が十分に混和し完全に均一な溶液を形成していることが重要です。

Buffer AL の添加時に、白色の沈澱が形成されることがありますが、ほとんどの場合は 70℃ でのインキュベーション中に溶解します。この沈澱物は QIAamp 調製あるいはどのような精製後の実験にも悪影響を与えません。

- 6. エタノール (96 ~ 100%) 200 µl をサンプルに添加し、再び 15 秒間パルスボルテックスした後、1.5 ml マイクロチューブを数秒間スピンドウンして蓋の内側に付いた溶液を収集する。**

サンプル、Buffer AL、エタノールが十分に混和し完全に均一な溶液を形成していることが重要です。

エタノールの添加により白色の沈殿物が生じることがあります。沈殿物をすべて QIAamp Mini Spin Column にアプライすることが重要です。この沈澱物は QIAamp 調製あるいはどのような精製後の実験にも悪影響を与えません。

エタノール以外のアルコールを使用すると収量が低下することがあります。

- 7. ステップ 6 の混合液を沈殿物を含む QIAamp Mini Spin 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。蓋を閉めて 6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心分離する。QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (付属品) に移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる*。**

遠心分離中のエアゾール形成を避けるために、各スピнкаラムは密閉してください。

沈殿物をすべて QIAamp Mini Spin Column にアプライすることが重要です。

遠心分離中の騒音を減少するために、遠心分離は 6,000 x g (8,000 rpm) で行ないます。最高速度での遠心操作は DNA の収量および品質には影響しません。遠心操作後、ライセートがスピнкаラムを完全に通過しなかった場合には、スピнкаラムが完全に空になるまで、より早い速度で遠心操作を行なってください。

* Buffer AL あるいは Buffer AW1 を含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 8 ページをご覧ください。

8. 注意深く QIAamp Mini Spin Column を開き、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 分間遠心分離する。QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (付属品) に移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる*。
9. 注意深く QIAamp Mini Spin Column を開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l の Buffer AW2 を添加する。蓋を閉めて最高速度 (20,000 x g、14,000 rpm) で 3 分間遠心分離する。
10. 推奨 : QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml のコレクションチューブ (別途準備) にのせ、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。最高スピードで 1 分間遠心操作を行なう。

このステップにより Buffer AW2 のキャリーオーバーの可能性を排除することができます。

11. QIAamp Mini Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブ (別途準備) に移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。注意深く QIAamp Mini Spin Column を開き 200 μ l の Buffer AE あるいは精製水を添加する。室温 (15 ~ 25°C) で 1 分間インキュベート後、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心分離する。
12. ステップ 11 を繰り返す。

Buffer AE あるいは精製水を添加した QIAamp Mini Spin Column を遠心操作前に室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートすることにより、DNA 収量は増加します。

Buffer AE 200 μ l で 3 回溶出することにより、DNA 収量は 15% まで増加します。

スピncラムと溶出液が接触すると、遠心操作中にエアゾールが形成される危険性があるので、1.5 ml マイクロチューブへは 200 μ l 以上の容量で溶出しないでください。

200 μ l 以下で溶出を行なう場合は、溶出液中の DNA 濃度は増加しますが、トータルの DNA 収量が多少低下することがあります (英語版 Handbook 26 ページ、Table 5 参照)。200 μ l で 2 回溶出する代わりに 100 μ l で 4 回溶出しても溶出効果は増加しません。

精製水で保存した DNA は酸性加水分解を起こすため、長期間 DNA を保存する場合には Buffer AE で溶出し、-20°C で保存することをお勧めします。

DNA 収量は調製した組織の量およびタイプによって異なります。25 mg の組織サンプルから 400 μ l の精製水で溶出した場合、 A_{260}/A_{280} 比が 1.7 ~ 1.9 の DNA が 10 ~ 30 μ g (25 ~ 75 ng/ μ l) 通常得られます。

溶出に関する詳細なインフォメーションおよび DNA の収量、純度ならびに DNA サイズの決定方法については英語版 Handbook 25 ~ 26 ページおよび 51 ページの Appendix A を参照してください。

* Buffer AL あるいは Buffer AW1 を含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 8 ページをご覧ください。

プロトコール：口腔スワブからの DNA 精製 (スピンプロトコール)

本プロトコールはマイクロ遠心機を用いた口腔スワブからのトータル DNA (ゲノム、ミトコンドリア、ウイルス) 精製用です。吸引マニホールドを用いたトータル DNA 精製に関しては、16 ページの “プロトコール：口腔スワブからの DNA 精製 (吸引プロトコール)” を参照してください。

実験を始める前の重要事項

- 口腔スワブプロトコールでは使用する Buffer AL 量が増えるため、調製できるサンプル数が減少します。追加の Buffer AL は別途に購入できません (英語版 Handbook 71 ページ参照)。
- 本プロトコールは次のようなスワブタイプに推奨します：C.E.P. (Omni Swabs ; Whatman® Bioscience、www.whatman.com)、脱脂綿、DACRON® (プラスチック棒と脱脂綿のついた Daigger、Puritan® あるいは DACRON チップ ; Hardwood Products Company、www.hwppuritan.com または Hain Diagnostika、www.hain-diagnostika.de)。
- スワブで頬の内側を強く 6 回擦ってサンプルを採取する。サンプル採取後、スワブを最低 2 時間空気乾燥してください。サンプル採取前の 30 分間にサンプル提供者が飲食しなかったことを確認します。
- 全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

- ステップ 3 で使用するウォーターバスを 56°C にしてください。
- ステップ 10 の溶出に使用する Buffer AE あるいは精製水を室温にします。
- Buffer AW1、Buffer AW2、QIAGEN Protease を英語版 Handbook 17 ページの説明に従って調製したことを確認してください。
- Buffer AL 中に沈殿物がある場合には 56°C で溶解してください。

操作手順

1. 口腔スワブを 2 ml のマイクロチューブにセットする。400 µl (脱脂綿か DACRON スワブ) あるいは 600 µl (Omni Swab) の PBS をサンプルに添加する。

Omni Swab は柄の末端をスワブの方に押しつけてマイクロチューブの中に入れます。脱脂綿あるいは DACRON スワブを手あるいはハサミを用いて柄から外します。

QIAamp Mini Spin Column は、サンプル中に RNA および DNA が存在する場合には両方の核酸を精製します。RNA は精製後のいくつかの酵素反応を阻害することがありますが、PCR 反応には影響しません。RNA フリーのゲノム DNA が必要な場合には、Buffer AL の添加前に、RNase A ストック溶液 (100 mg/ml) 4 µl を添加します。

2. 20 μ l の QIAGEN Protease ストック溶液（あるいは Proteinase K）および 400 μ l（脱脂綿あるいは DACRON スワブ）あるいは 600 μ l（Omni Swab）の Buffer AL をサンプルに添加する。ボルテックスにより即座にサンプルを 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 を即座にかつ十分に混和し、完全に均一な溶液を形成することが重要です。

注：QIAGEN Protease あるいは Proteinase K を Buffer AL に直接添加しないでください。

3. 56°C で 10 分間インキュベートした後、蓋の内側の溶液を集めるために数秒間遠心する。
4. 400 μ l（脱脂綿か DACRON スワブ）あるいは 600 μ l（Omni Swab）のエタノール（96 ~ 100%）をサンプルに添加し、ボルテックスにより混和する。蓋の内側の溶液を集めるために数秒間遠心する。
5. ステップ 4 の混合液 700 μ l を QIAamp Mini Spin 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。蓋を閉めて 6,000 x g（8,000 rpm）で 1 分間遠心分離する。QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ（付属品）に移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる*。
遠心分離中のエアゾール形成を避けるために、各スピンカラムは密閉してください。
6. ステップ 4 の残りの混合液（最大 700 μ l）を QIAamp Mini Spin Column にアプライしてステップ 5 を繰り返す。
7. 注意深く QIAamp Mini Spin Column を開き、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 分間遠心分離する。QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ（付属品）に移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる*。
8. 注意深く QIAamp Mini Spin Column を開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l の Buffer AW2 を添加する。蓋を閉めて最高速度（20,000 x g、14,000 rpm）で 3 分間遠心分離する。
9. 推奨：QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml のコレクションチューブ（別途準備）にのせ、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。最高スピードで 1 分間遠心操作を行なう。

このステップにより Buffer AW2 のキャリーオーバーの可能性を排除することができます。

* Buffer AL あるいは Buffer AW1 を含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 8 ページをご覧ください。

10. **QIAamp Mini Spin Column** を新しい 1.5 ml マイクロチューブ(別途準備)に移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。注意深く **QIAamp Mini Spin Column** を開き、150 μ l の **Buffer AE** あるいは精製水を添加する。室温 (15 ~ 25°C) で 1 分間インキュベート後、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心分離する。

100 μ l のバッファーで溶出すると最終 DNA 濃度は増加しますが、全体的な DNA 収量は多少低下します。100 μ l 以下の溶出量では DNA 収量が顕著に減少するのでお薦めしません。

DNA を含んだ 150 μ l の溶出液で 2 度目の溶出を行なうと DNA 収量は顕著に増加しますが、溶出液を PCR に使用する場合にはお薦めしません。

長期間 DNA を保存する場合には Buffer AE で溶出し、-20°C で保存することをお薦めします。

口腔スワブサンプル 1 個を 150 μ l のバッファーで溶出した場合、 A_{260}/A_{280} 比 1.7 ~ 1.9 (水で希釈後測定) の DNA が 0.5 ~ 3.5 μ g (3 ~ 23 ng/ μ l) 通常得られます。

プロトコール：口腔スワブからの DNA 精製 (吸引プロトコール)

本プロトコールは QIAvac 24 Plus あるいは相当する吸引マニホールドを用いて口腔スワブからのトータル（ゲノム、ミトコンドリア、ウイルス）DNA 精製用です。マイクロ遠心機を用いたトータル DNA 精製に関しては、13 ページの“プロトコール：口腔スワブからの DNA 精製（スピンプロトコール）”を参照してください。

実験を始める前の重要事項

- 口腔スワブプロトコールでは使用する Buffer AL 量が増えるため、調製できるサンプル数が減少します。追加の Buffer AL は別途に購入できます（英語版 Handbook 71 ページ参照）。
- 本プロトコールは次のようなスワブタイプに推奨します：C.E.P. (Omni Swabs；Whatman Bioscience、www.whatman.com)、脱脂綿、DACRON（プラスチック棒と脱脂綿のついた Daigger、Puritan あるいは DACRON チップ；Hardwood Products Company、www.hwppuritan.com または Hain Diagnostika、www.hain-diagnostika.de)。
- スワブで頬の内側を強く 6 回擦ってサンプルを採取してください。サンプル採取後、スワブを最低 2 時間空気乾燥させます。サンプル採取前の 30 分間にサンプル提供者が飲食しなかったことを確認します。
- 全ての遠心操作は室温（15～25℃）で行ないます。
- QIAvac 24 Plus のセットアップに関しては英語版 Handbook 20～24 ページを参照ください。
- 吸引操作中に一定の吸引力を確保するために、各プロトコールステップの間は必ず真空ポンプのスイッチを切ります。

実験開始前の準備事項

- ステップ 3 で使用するウォーターバスを 56℃ にします。
- ステップ 10 の溶出に使用する Buffer AE あるいは精製水を室温にします。
- Buffer AW1、Buffer AW2、QIAGEN Protease を英語版 Handbook 17 ページの説明に従って調製したことを確認してください。
- Buffer AL 中に沈殿物がある場合には 56℃ で溶解してください。

操作手順

- 1. 口腔スワブを 2 ml のマイクロチューブにセットする。400 μ l (脱脂綿か DACRON スワブ) あるいは 600 μ l (Omni Swab) の PBS をサンプルに添加する。**

Omni Swab は柄の末端をスワブの方に押しつけてマイクロチューブの中に入れます。脱脂綿あるいは DACRON スワブを手あるいはハサミを用いて柄から外します。

QIAamp Mini Spin Column は、サンプル中に RNA および DNA が存在する場合には両方の核酸を精製します。RNA はその後のいくつかの酵素反応を阻害することがありますが、PCR 反応には影響しません。RNA フリーのゲノム DNA が必要な場合には、Buffer AL の添加前に、RNase A ストック溶液 (100 mg/ml) 4 μ l を添加します。
- 2. 20 μ l の QIAGEN Protease ストック溶液 (あるいは Proteinase K) および 400 μ l (脱脂綿あるいは DACRON スワブ) あるいは 600 μ l (Omni Swab) の Buffer AL をサンプルに添加する。ボルテックスによりサンプルを 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 を即座に混和し、完全に均一な溶液を形成することが重要です。

注：QIAGEN Protease あるいは Proteinase K を Buffer AL に直接添加しないでください。
- 3. 56°C で 10 分間インキュベートした後、蓋の内側の溶液を集めるために数秒間遠心する。**
- 4. 400 μ l (脱脂綿か DACRON スワブ) あるいは 600 μ l (Omni Swab) のエタノール (96 ~ 100%) をサンプルに添加し、ボルテックスにより混和する。**
- 5. QIAvac 吸引マニホールド上の VacConnector に QIAamp Mini Spin Column を差し込む。Extension Tube (英語版 Handbook 69 ページの Ordering Information 参照) をカラム上にセットする。使用しない Luer Adapter を Luer Plug でシールする。**
- 6. QIAamp Mini Spin Column にステップ 4 の混合液をアプライする。QIAamp Mini Spin Column をライセートが通過するように真空ポンプのスイッチを入れる。ライセートが QIAamp Mini Spin Column を通過後、真空ポンプのスイッチを切る。**
- 7. 750 μ l の Buffer AW1 を Extension Tube にアプライする。QIAamp Mini Spin Column を Buffer AW1 が通過するように真空ポンプのスイッチを入れる。真空ポンプのスイッチを切る。QIAamp Mini Spin Column から Extension Tube を注意深く取り除き、チューブを捨てる。**
- 8. QIAamp Mini Spin Column の縁を濡らさないように 750 μ l の Buffer AW2 を添加する。QIAamp Mini Spin Column の蓋を開けたままで真空ポンプのスイッチを入れる。Buffer AW2 が QIAamp Mini Spin Column から流出した後、真空ポンプのスイッチを切る。**

9. QIAamp Mini Spin Column の蓋を閉め、吸引マニホールドから取り除き、Vac-Connector は捨てる。QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブに移し、メンブレンを完全に乾燥させるために、20,000 x g (14,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。
10. 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に QIAamp Mini Spin Column をセットする。ろ液とコレクションチューブを捨てる。注意深く QIAamp Mini Spin Column を開く。150 μ l の Buffer AE あるいは蒸留水で DNA を溶出する。室温（15 ~ 25°C）で 1 分間インキュベート後、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心分離する。

100 μ l のバッファーで溶出すると最終 DNA 濃度は増加しますが、全体的な DNA 収量は多少低下します。100 μ l 以下の溶出量では DNA 収量が顕著に減少するのでお勧めしません

DNA を含んだ 150 μ l の溶出液で 2 度目の溶出を行なうと DNA 収量は顕著に増加しますが、溶出液を PCR に使用する場合にはお勧めしません。

長期間 DNA を保存する場合には Buffer AE で溶出し、-20°C で保存することをお勧めします。

口腔スワブサンプル 1 個を 150 μ l のバッファーで溶出した場合、 A_{260}/A_{280} 比 1.7 ~ 1.9（水で希釈後測定）の DNA が 0.5 ~ 3.5 μ g（3 ~ 23 ng/ μ l）通常得られます。

プロトコール：乾燥血液斑からの DNA 精製 (QIAamp DNA Mini Kit)

本プロトコールはろ紙 (Schleicher and Schuell 903) にスポットし、乾燥した未処理血液および抗凝固剤で処理した血液からのトータル (ゲノム、ミトコンドリア、ウイルス) DNA 精製用です。

実験を始める前の重要事項

- 全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

- ステップ 2 では 85°C、ステップ 3 では 56°C、ステップ 4 では 70°C にインキュベーターをセットしてください。
- ステップ 10 の溶出に使用する Buffer AE あるいは精製水を室温にします。
- 英語版 Handbook 17 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てください。
- Buffer AL あるいは Buffer ATL に沈殿物がある場合は 56°C で溶解してください。

操作手順

1. 乾燥血液斑から打ち抜いたディスク 3 枚を 1.5 ml のマイクロ遠心チューブに入れて、180 µl の Buffer ATL を添加する。
一穴式の紙パンチで直径 3 mm (1/8 インチ) の乾燥血液斑を打ち抜きます。
2. 85°C で 10 分間インキュベートした後、蓋の内側の溶液を集めるために数秒間遠心する。
3. 20 µl の Proteinase K ストック溶液を添加する。ボルテックスで混和し、56°C で 1 時間インキュベートした後、蓋の内側の溶液を集めるために数秒間遠心する。

注：Proteinase K を添加することは重要です。

4. サンプルに 200 µl の Buffer AL を添加する。ボルテックスで混和し、70°C で 10 分間インキュベートした後、蓋の内側の溶液を集めるために数秒間遠心する。
効率的な溶解を行なうためには、サンプルと Buffer AL を即座にかつ十分に混和し、完全に均一な溶液を形成することが重要です。

注：Proteinase K を直接 Buffer AL に加えないでください。

Buffer AL をサンプルに添加した際に白い沈殿物が生じることがあります。ほとんどの場合、沈殿物はインキュベーション中に溶解します。この沈殿物は QIAamp 調製あるいはどのような精製後の実験にも悪影響を与えません。

5. 200 μ l のエタノール (96 ~ 100%) をサンプルに添加し、ボルテックスにより完全に混和する。蓋の内側の溶液を集めるために数秒間遠心する。

サンプルとエタノールが完全に混和していることが重要です。

6. ステップ 5 の混合液を QIAamp Mini Spin 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。蓋を閉めて 6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心分離する。QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (付属品) に移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる*。

遠心分離中のエアゾール形成を避けるために、各 QIAamp Mini Spin Column は密閉してください。

7. 注意深く QIAamp Mini Spin Column を開き、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 分間遠心分離する。QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (付属品) に移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる*。

8. 注意深く QIAamp Mini Spin Column を開き、カラムの縁を濡らさないように 500 μ l の Buffer AW2 を添加する。蓋を閉めて最高速度 (20,000 x g、14,000 rpm) で 3 分間遠心分離する。

9. 推奨 : QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml のコレクションチューブ (別途準備) にのせ、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。最高スピードで 1 分間遠心操作を行なう。

このステップにより Buffer AW2 のキャリーオーバーの可能性を排除することができます。

10. QIAamp Mini Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブ (別途準備) に移し、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。注意深く QIAamp Mini Spin Column を開き、150 μ l の Buffer AE あるいは精製水を添加する。室温 (15 ~ 25°C) で 1 分間インキュベート後、6,000 x g (8,000 rpm) で 1 分間遠心分離する。

3 枚のディスク (直径 3 mm) から、抗凝固剤で処理した血液では 150 ng、未処理血液では 75 ng の DNA がそれぞれ得られます。未処理血液からの収量が充分で無い場合には、プレップあたり 3 枚の代わりに 6 枚のディスクを使用できます。PCR アッセイで使用する DNA 溶出液の量は 10% を超えないようにします。例えば、50 μ l の PCR では 5 μ l 以上の溶出液を添加しないでください。

* Buffer AL あるいは Buffer AW1 を含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 8 ページをご覧ください。

トラブルシューティング

コメント

洗浄後 QIAamp Mini Spin Column 上に有色の残留物が見られる

- a) サンプルと Buffer AL との混和が不十分なために細胞溶解が不完全
新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。サンプルに Buffer AL に添加後、即座にボルテックスで完全に混和する。
- b) プロテアーゼ活性の低下により細胞溶解が不完全
新しいサンプルと新しく調製した QIAGEN Protease ストック溶液で再度 DNA 精製を行なう。ストック溶液は使用後すぐに 2 ~ 8℃ で保存する。QIAGEN Protease を Buffer AL に直接添加しない。
- c) QIAamp Mini Spin Column にロードする前にライセートにエタノールを添加していない
新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。
- d) Buffer AW1 あるいは AW2 の調製が正確ではない
オリジナルの Buffer AW1 および AW2 を高純度エタノールで正確に希釈したか確認する（英語版 Handbook 17 ページ参照）。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。新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。

溶出液中に DNA が少ないか皆無

- a) サンプル中の細胞あるいはウイルス濃度が低い
新しい多量の無細胞サンプルを Centricon-100 (Amicon、USA) を用いて 200 µl に濃縮する。サンプル濃度が低い場合には、各ライセートにキャリア DNA を 5 ~ 10 µg（英語版 Handbook 18 ページ）添加し、再度 DNA 精製を行なう。全血を使用した場合は、バフィコート調製する（英語版 Handbook 19 ページ参照）。
- b) サンプルと Buffer AL との混和が不十分なために細胞溶解が不完全
新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。サンプルに Buffer AL に添加後、即座にボルテックスで完全に混和する。
- c) プロテアーゼ活性の低下により細胞溶解が不完全
新しいサンプルと新しく調製した QIAGEN Protease ストック溶液で再度 DNA 精製を行なう。ストック溶液は使用後すぐに 2 ~ 8℃ で保存する。QIAGEN Protease を Buffer AL に直接添加しない。

コメント

-
- | | | |
|----|--|--|
| d) | インキュベーション時間が不十分なために Buffer AL あるいは Buffer ATL 中での細胞溶解あるいはタンパク質変性が不完全 | 新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。組織サンプルを細かくカットしたか確認し、インキュベーション時間を延長する。目にみえる微粒子の残留物がないか確認する（骨あるいは毛髪は完全に溶解されない）。 |
| e) | QIAamp Mini Spin Column にロードする前にライセートにエタノールを添加していない | 新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。 |
| f) | 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 | 新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。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) | 血液あるいは血漿以外のサンプルでエタノールの代わりにイソプロパノールを使用 | 血液あるいは血漿（血清）以外の全てのサンプルには必ずエタノールを使用することを推奨。イソプロパノールの使用により全ての他のサンプルでは収量が減少する。 |
| h) | QIAamp Mini Spin Column を室温（15 ~ 25℃）で 1 分間インキュベートしなかった | Buffer AE または精製水を添加後、QIAamp Spin Column を室温（15 ~ 25℃）で少なくとも 1 分間はインキュベートする。 |
| i) | DNA の溶出が効率的でない | 溶出効率を高めるため、QIAamp Mini Spin Column に Buffer AE あるいは精製水をピペットで添加後、遠心操作前に室温（15 ~ 25℃）でカラムを 5 分間インキュベートする。 |
| j) | 精製水の pH が適正でない（酸性） | 低い pH は DNA 収量を低下させることがある。精製水の pH が 7.0 以下でないことを確認するか、Buffer AE を溶出に使用する。 |
| k) | Buffer AW1 あるいは AW2 の調製が不正確 | オリジナルの Buffer AW1 および AW2 をエタノールで正確に希釈したか確認する（英語版 Handbook 17 ページ参照）。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。新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。 |

コメント

-
- | | |
|--|--|
| l) Buffer AW1 あるいは AW2 を 70%エタノールで調製した | Buffer AW1 あるいは AW2 を 96 ~ 100%エタノールで調製したかチェックする。新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。 |
| m) Buffer AW1 と AW2 の順番を間違えて使用 | Buffer AW1 と AW2 をプロトコールの順序に従って使用したか確認。新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。 |
| n) 多量の Buffer AE で溶出 | 200 μ l 以下で溶出を行なう場合は、溶出液中の DNA 濃度は増加するが、トータルの DNA 収量が多少低下する（英語版 Handbook 26 ページ、Table 5 参照）。1 μ g 以下の DNA を含むサンプルには 50 μ l の Buffer AE あるいは精製水での溶出を推薦する。 |

精製した核酸の A_{260}/A_{280} 比率が低い

- | | |
|---|--|
| a) サンプルと Buffer AL との混和が不十分なために細胞溶解が不完全 | 新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。サンプルと Buffer AL を即座にボルテックスで完全に混和する。 |
| b) プロテアーゼ活性の低下により細胞溶解が不完全 | 新しいサンプルと新しく調製した QIAGEN Protease ストック溶液で再度 DNA 精製を行なう。ストック溶液は使用后すぐに 2 ~ 8°C で保存する。QIAGEN Protease を Buffer AL に直接添加しない。 |
| c) インキュベーション時間が不十分なために Buffer AL あるいは Buffer ATL 中での細胞溶解あるいはタンパク質変性が不完全 | 新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。インキュベーション時間を延長する。目にみえる微粒子の残留物がないか確認する（骨あるいは毛髪は完全に溶解されない）。 |
| d) QIAamp Mini Spin Column にロードする前にライセートにエタノールを添加していない | 新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。 |
| e) 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 | 新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。 |

コメント

-
- | | | |
|----|-----------------------------------|---|
| f) | Buffer AW1 あるいは AW2 の調製が正確ではない | Buffer AW1 および AW2 をエタノールで正確に希釈したか確認する（英語版 Handbook 17 ページ参照）。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。新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。 |
| g) | Buffer AW1 あるいは AW2 を 70%エタノールで調製 | Buffer AW1 あるいは AW2 を 96 ~ 100%エタノールで調製したかチェックする。新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。 |
| h) | Buffer AW1 と AW2 の順番を間違えて使用 | Buffer AW1 と AW2 をプロトコールの順序に従って使用したか確認。新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。 |

精製した核酸の A_{260}/A_{280} 比率が高い

- | | | |
|----|------------------------------------|---|
| a) | RNA の残留量が多い | プロトコールに記載されているオプションの RNase ステップを今後の DNA 調製では行なうこと。 |
| b) | RNase A の添加前に Buffer AL をサンプルに添加した | プロトコールの RNase A ステップを行なう場合は、必ず最初に RNase A を添加しボルテックスする。 |

精製した DNA が続いて行なう酵素反応で最適に作用しない

- | | | |
|----|------------------|---|
| a) | サンプル中の DNA 量が不十分 | 可能性のある原因をトラブルシューティングの“溶出液中に DNA が少ないか皆無”（21 ~ 23 ページ）の項でチェックする。可能な場合は、反応に添加する溶出液量を増やす。必要に応じて、DNA を真空濃縮するか、使用したサンプル量を増やして、再度精製を行なう。精製した DNA 量が相変わらず少ない場合には、溶出量を 50 μ l に減少する。溶出量を減少するとトータル DNA 量はわずかに低下するが、溶出液中の核酸濃度は増加する（英語版 Handbook 26 ページ、Table 5 参照）。QIAamp Mini Spin Column 上に残留した DNA は溶出ステップ後に、同一溶出液を再度カラムにアプライし溶出ステップを繰り返して回収できる。 |
|----|------------------|---|

コメント

- | | |
|--------------------------------|---|
| b) 調製中の阻害物質 | 可能性のある原因をトラブルシューティングの“精製した核酸の A_{260}/A_{280} 比率が低い” (23 ~ 24 ページ) の項でチェックする。 |
| c) 溶出液中に Buffer AW2 が残留 | それぞれのプロトコールにおけるオプションの乾燥ステップを行なう。
溶出の前に、QIAamp Mini Spin Column がろ液と接触していないことを確認する。 |
| d) Buffer AW1 と AW2 の順番を間違えて使用 | Buffer AW1 と AW2 をプロトコールの順序に従って使用したか確認。新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。 |
| e) RNA の残留量が多い | プロトコールに記載されているオプションの RNase ステップを今後の DNA 調製では行なうこと。 |
| f) 増幅反応の感度が低下 | 増幅反応にテンプレートとして添加する溶出液の量を調節する。 |
| g) 増幅反応セットアップを変更 | 添加された溶出液量を調節して増幅システムを再度至適化する。 |

Buffer ATL あるいは Buffer AL 中の白色沈澱物

白色沈澱物は低温での保存あるいは長期保存により形成しえる

Buffer ATL あるいは Buffer AL 中のほとんどの沈澱物は 56°C でのインキュベーションにより溶解される。沈澱物が調製に影響を与えることはない。沈澱物を高温で溶解しても、精製される核酸の収量あるいは品質に影響を及ぼさない。

組織用プロトコールのステップ 5 あるいは 6 での白色沈澱物

ステップ 5 での Buffer AL 添加あるいはステップ 6 でのエタノール添加の際に白色沈澱物が形成

ほとんどの場合、ステップ 5 で形成した沈澱物は 70°C でのインキュベーション中に溶解される。この沈澱物は QIAamp 調製あるいは続いて行なうなどの実験にも影響を及ぼさない。

一般的な操作

- a) ライセートがメンブレンを完全に通過しない
- スピンプロトコール使用の場合：** 最高速度で1分間あるいは全ライセートがメンブレンを通過するまで遠心分離する。
- 吸引プロトコール使用の場合：** 吸引力が不十分あるいは吸引ステップ中に QIAamp Mini Spin Column の蓋が閉まっていた。吸引力を増加し、吸引中は蓋を開けておく。吸引力が増加できない場合には、QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブに移し、蓋を閉めて 6,000 x g (8,000 rpm) で3分間、あるいはライセートが完全にメンブレンを通過するまで遠心分離する。QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブに移し、ろ液の入ったチューブは捨てる。続けてスピンプロトコールのステップ 8 (5 ページ) に進む。
- b) メンブレンの目詰まり
- 血液サンプル：** サンプル中の白血球濃度が 5 x 10⁶/200 µl 以上であった。サンプルを PBS で希釈し、精製を繰り返す。
- 血漿サンプル：** 凍結融解の繰り返しにより血漿中に寒冷沈澱物が生じた。2 回以上凍結融解を繰り返した血漿は使用しない。
- c) サンプル間のクロスコンタミネーション
- QIAamp Mini Spin Column の取り扱い中にサンプル間のクロスコンタミネーションを避けるために、英語版 Handbook 19 ページの “Handling of QIAamp Mini columns” に従う。新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。
- d) 吸引力が高すぎるか、低すぎる
- 吸引力が高すぎる場合は、QIAamp メンブレンがダメージを受けることがある。吸引力が低すぎる場合は DNA 収量および品質が低下する。吸引制御装置 (英語版 Handbook 69 ページの Ordering Information を参照) を使用し、吸引力を -800 から -900 mbar に調整する。

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, TissueRuptor™ (QIAGEN Group); Whatman® (Whatman Group); DACRON® (E. I. du Pont de Nemours and Company); Puritan® (Hardwood Products Company).

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。

© 1999–2010 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

