

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

全血、血漿、血清、体液、リンパ球からの
ゲノムおよびウイルス DNA 大量精製用

目次	ページ
プロトコール	
QIAamp DNA Blood Midi Kit を用いた全血からの DNA 精製 (スピンプロトコール)	2
QIAamp DNA Blood Maxi Kit を用いた全血からの DNA 精製 (スピンプロトコール)	6
QIAamp DNA Blood Midi Kit を用いた全血からの DNA 精製 (吸引プロトコール)	10
QIAamp DNA Blood Maxi Kit を用いた全血からの DNA 精製 (吸引プロトコール)	14
トラブルシューティング	18



プロトコール：QIAamp Blood Midi Kit を用いた全血からの DNA 精製（スピンプロトコール）

本プロトコールは最高 2 ml の全血からのゲノム DNA 分離用です。

実験を始める前の重要事項

- テキスト中、全血 0.3 ~ 1 ml からの精製は▲、全血 1 ~ 2 ml からの精製は●で印しています。
- 2×10^7 個以上の白血球細胞を使用しないでください。サンプルが 2×10^7 個以上の白血球細胞を含む場合は、QIAamp DNA Blood Maxi Kit を使用してください。
- 全ての遠心操作は室温（15 ~ 25℃）で行ないます。固定ローターは使用しないでください。
- 白血球細胞数が少ないサンプル（例えば 20,000 ゲノム数以下）の場合は、キャリア DNA を操作の初めに添加します。キャリア DNA は血液中の DNA と一緒に精製されます。キャリア DNA が PCR のようなダウンストリーム解析を妨害しないことを確認してください。

実験を始める前の準備事項

- 実験開始前にサンプルを室温（15 ~ 25℃）にする。
- プロトコールのステップ 4 で使用するインキュベーターを 70℃にする。
- Buffer AW1、Buffer AW2 および QIAGEN Protease を英語版 Handbook 18、19 ページの指示に従い調製する。
- Buffer AL 中に沈澱物がある場合は、56℃で溶解する。

操作手順

1. 15 ml 遠心分離チューブ（別売）の底に▲ 100 μ l あるいは● 200 μ l の QIAGEN Protease をピペッティングする。
2. 血液▲ 0.3 ~ 1 ml あるいは● 1 ~ 2 ml を添加し、簡単に混和する。

必要なら遠心チューブに添加する前に血液サンプルを PBS で最高▲ 1 ml あるいは● 2 ml に調節します。

注：遠心チューブに既に分注されているサンプルに QIAGEN Protease（または Protease K）を添加できます。この場合、酵素添加後に完全に混和することが重要です。

3. **Buffer AL ▲ 1.2 ml あるいは● 2.4 ml** を添加し、チューブを 15 回転倒後、少なくとも 1 分間激しくボルテックスして完全に混和する。複数のチューブを同時に転倒させるには、チューブの入ったラックを空のラックで固定し、両方のラックをつかんで同時に転倒させる。

完全な溶解のために、サンプルと Buffer AL を十分にミックスして、完全に均一な溶液にしてください。

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

4. **70°C で 10 分間インキュベートする。**

DNA 収量は 70°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 の収量には影響しません。

5. サンプルにエタノール(96 ~ 100%) **▲ 1 ml あるいは● 2 ml** を添加し、チューブを 10 回転倒後、激しくボルテックスして完全に混和する。

効率的な結合条件のためには、サンプルとエタノールが十分にミックスし、完全に均一な溶液になっていることが大切です。

注：96 ~ 100%エタノールを必ず使用してください。エタノール以外のアルコールを使用すると収量および純度が低下することがあります。メタノールやメチルエチルケトンなどの物質を含む変性アルコールは使用しないでください。

6. **ステップ 5 の▲全量あるいは●半量をカラムの縁を濡らさないように注意して 15 ml 遠心チューブ(添付)中の QIAamp Midi カラムに移す。蓋を開けて 1,850 x g (3,000 rpm) で 3 分間遠心分離する。▲ステップ 8 (ステップ 7 を飛ばす) あるいは●ステップ 7 で処理する。**

▲最初のサンプル容量が 1 ml 以下の場合には、上記ステップで QIAamp Midi カラムにライセートを全てアプライします。ステップ 7 を飛ばして、ステップ 8 に進んでください。

QIAamp Midi カラムにライセートをアプライする場合に、15 ml 遠心チューブについている蓋の溝まで注入すれば、操作はより簡便になります。

溶液が完全にメンブレンを通過しなかった場合には、もう一度少し速めの速度で遠心操作を行ないます。

蓋をぎつと閉めすぎないでください。音がするまで蓋を閉めると遠心操作中に蓋がゆるみ、遠心機を傷めることがありますので注意してください。

注：蓋を閉めた状態でも、カラムの縁の通風用のスロットから溶液が漏れることがありますので、蓋を閉めた QIAamp Midi カラムは必ず上向きにしたままにしてください。

7. ● QIAamp Midi カラムを取り除き、ろ液を棄て、QIAamp Midi カラムを 15 ml 遠心チューブに戻す。ステップ 5 の残りの溶液を QIAamp Midi カラムにアプライする。蓋を閉めて 1,850 x g (3,000 rpm) で 3 分間遠心分離する。

▲ 1 ml 以下の血液で実験を始める場合には本ステップは必要ありません。ステップ 8 の操作に進んでください。

注：QIAamp Midi カラムを 15 ml 遠心チューブに戻す前に、チューブの外側についているろ液は拭き取ってください。

QIAamp Midi カラムの縁を濡らさないように注意し、遠心分離中のクロソコトミを避けるために、各カラムに蓋をしてください。溶液が完全に通過しなかった場合には、もう一度少し速めの速度で遠心操作を行ないます。

8. QIAamp Midi カラムを取り除き、ろ液を棄て、QIAamp Midi カラムを 15 ml 遠心チューブに戻す。

注：QIAamp Midi カラムを 15 ml 遠心チューブに戻す前に、チューブの外側についているろ液は拭き取ってください。

ろ液を除去しない場合、QIAamp Midi カラムのノズルがろ液に沈んで、溶液の通過が完全に行なわれないことがあります。

9. カラムの縁を濡らすことなく注意深く 2 ml の Buffer AW1 を QIAamp Midi カラムに添加する。蓋を閉めて 4,500 x g (5,000 rpm) で 1 分間遠心分離する。

注：このステップでは、ろ液を除去する必要はありません。直ぐにステップ 10 に進んでください。

10. カラムの縁を濡らすことなく注意深く 2 ml の Buffer AW2 を、QIAamp Midi カラムに添加する。蓋を閉めて 4,500 x g (5,000 rpm) で 15 分間遠心分離する。

注：遠心分離の時間を延ばすことにより、溶出前に QIAamp Midi カラムから Buffer AW2 を完全に除去することができます。遠心力が 4,000 x g 以下の場合には、残っているアルコールを蒸発させるために 70°C で 10 分間インキュベートすることをお勧めします。溶出液中の残留エタノールは、PCR を阻害する原因となり、誤った結果につながります。

11. 新しい 15 ml 遠心チューブ（添付）に QIAamp Midi カラムを移し、ろ液の入ったチューブは除去する。

注：QIAamp Midi カラムを 15 ml 遠心チューブに戻す前に、チューブの外側についているろ液は拭き取ってください。

12. 室温 (15 ~ 25°C) にした Buffer AE あるいは精製水▲ 200 µl あるいは● 300 µl を QIAamp Midi カラムのメンブレン上に直接ピペティングして蓋を閉める。室温で 5 分間インキュベートした後、4,500 x g (5,000 rpm) で 2 分間遠心分離する。

精製水で溶出した DNA は酸性加水分解をおこすので、長期間 DNA を保存する場合には Buffer AE で溶出後、分注して -20°C で保存することをお勧めします。

13. 高濃度の DNA が必要な場合にはステップ 13a、最高の DNA 収量が必要な場合にはステップ 13b へ進む。

注：制限酵素反応およびサザンブロットなどのアプリケーションには高濃度 DNA が必要です。その他のアプリケーションには DNA のトータル収量が多いステップの方が適しています（溶出効率に関する詳細な情報は英語版 Handbook 13 ページ、Table 2A および 2B を参照）。

13a. 最高濃度用：DNA を含む溶出液（▲ 200 μ l あるいは● 300 μ l）を QIAamp Midi カラムのメンブレン上にもう 1 度ロードして蓋を閉める。室温で 5 分間インキュベートした後、4,500 x g (5,000 rpm) で 2 分間遠心分離する。

注：カラムからの溶出量が▲ 200 μ l あるいは● 300 μ l 以下に減少しますが、DNA 収量には影響しません。

13b. 最高収量用：室温に戻した Buffer AE あるいは精製水（▲ 200 μ l あるいは● 300 μ l）を QIAamp Midi カラムのメンブレン上に直接ピペティングでアプライする。蓋を閉め、室温で 5 分間インキュベートした後、4,500 x g (5,000 rpm) で 2 分間遠心分離する。

注：カラムからの溶出量が▲ 200 μ l あるいは● 300 μ l 以下に減少しますが、DNA 収量には影響しません。

プロトコール：QIAamp Blood Maxi Kit を用いた全血からの DNA 精製（スピンプロトコール）

本プロトコールは最高 10 ml の全血からのゲノム DNA 分離用です。

実験を始める前の重要事項

- テキスト中、全血 3 ~ 5 ml からの精製は▲、全血 5 ~ 10 ml からの精製は●で印しています。
- 1×10^8 個以上の白血球細胞を使用しないでください。
- 全ての遠心操作は室温（15 ~ 25℃）で行ないます。固定ローターは使用しないでください。
- サンプル中の白血球細胞数が少ない（例えば 100,000 ゲノム数以下）場合は、キャリア DNA を操作の初めに添加します。キャリア DNA は血液中の DNA と一緒に精製されます。キャリア DNA が PCR のようなダウンストリームの解析を妨害しないことを確認してください。

実験を始める前の準備事項

- 実験開始前にサンプルを室温（15 ~ 25℃）にする。
- プロトコールのステップ 4 で使用するインキュベーターを 70℃にする。
- Buffer AW1、Buffer AW2 および QIAGEN Protease を英語版 Handbook 18、19 ページの指示に従い調製する。
- Buffer AL 中に沈澱物がある場合は、56℃で溶解する。

操作手順

1. 50 ml 遠心分離チューブ(別売)の底に 500 μ l の QIAGEN Protease をピペッティングする。

2. 血液▲ 3 ~ 5 ml あるいは● 5 ~ 10 ml を添加し、簡単に混和する。

必要なら遠心チューブに添加する前に血液サンプルを PBS で最高▲ 5 ml あるいは● 10 ml に調節します。

注：遠心チューブに既に分注されているサンプルに QIAGEN Protease（または Protease K）を添加できます。この場合、酵素添加後に完全に混和することが重要です。

3. Buffer AL ▲ 6 ml あるいは● 12 ml を添加し、チューブを 15 回転倒後、少なくとも 1 分間激しくボルテックスして完全に混和する。複数のチューブを同時に転倒させるには、チューブの入ったラックを空のラックで固定し、両方のラックをつかんで、同時に転倒させる。

完全な溶解のために、サンプルと Buffer AL を十分にミックスして、完全に均一な溶液にしてください

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

4. 70℃で 10 分間インキュベートする。

DNA 収量は 70℃、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 の収量には影響しません。

5. サンプルにエタノール(96～100%) ▲5 mlあるいは●10 mlを添加し、チューブを 10 回転倒後、激しくボルテックスして完全に混和する。

効率的な結合条件のためには、サンプルとエタノールが十分にミックスし、完全に均一な溶液になっていることが大切です。

注：96～100%エタノールを必ず使用してください。エタノール以外のアルコールを使用すると収量および純度が低下することがあります。メタノールやメチルエチルケトンなどの物質を含む変性アルコールは使用しないでください。

6. ステップ 5 の▲全量あるいは●半量をカラムの縁を濡らさないように注意して 50 ml 遠心チューブ（添付）中の QIAamp Maxi カラムに移す。蓋を閉めて 1,850 x g (3,000 rpm) で 3 分間遠心分離する。▲ステップ 8（ステップ 7 を飛ばす）あるいは●ステップ 7 に進む。

▲最初のサンプル容量が 5 ml 以下の場合には、上記ステップで QIAamp Maxi カラムにライセートを全てアプライします。ステップ 7 を飛ばして、ステップ 8 に進んでください。

QIAamp Maxi カラムにライセートをアプライする場合に、50 ml 遠心チューブについている蓋の溝まで注入すれば、操作はより簡便になります。

溶液が完全にメンブレンを通過しなかった場合には、もう一度少し速めの速度で遠心操作を行ないます。

蓋をきつく閉めすぎないでください。音がするまで蓋を閉めると遠心操作中に蓋がゆるみ、遠心機を傷めることがありますので注意してください。

注：蓋を閉めた状態でも、カラムの縁の通風用のスロットから溶液が漏れることがありますので、蓋を閉めた QIAamp Maxi カラムは必ず上向きにしたままにしてください。

7. ● QIAamp Maxi カラムを取り除き、ろ液を棄て、QIAamp Maxi カラムを 50 ml 遠心チューブに戻す。ステップ 5 の残りの溶液を QIAamp Maxi カラムにアプライする。蓋を閉めて 1,850 x g (3,000 rpm) で 3 分間遠心分離する。

▲5 ml 以下の血液で実験を始める場合には本ステップは必要ありません。ステップ 8 の操作に進んでください。

注：QIAamp Maxi カラムを 50 ml 遠心チューブに戻す前に、チューブの外側についているろ液は拭き取ってください。

QIAamp Maxi カラムの縁を濡らさないように注意し、遠心分離中のクロソコタミを避けるために、各カラムに蓋をしてください。溶液が完全に通過しなかった場合には、もう一度少し速めの速度で遠心操作を行ないます。

8. **QIAamp Maxi カラムを取り除き、ろ液を棄て、QIAamp Maxi カラムを 50 ml 遠心チューブに戻す。**

注：QIAamp Maxi カラムを 50 ml 遠心チューブに戻す前に、チューブの外側についているろ液は拭き取ってください。

ろ液を除去しない場合、QIAamp Maxi カラムのノズルがろ液に沈んで、溶液の通過が完全に行なわれないことがあります。

9. **カラムの縁を濡らすことなく注意深く 5 ml の Buffer AW1 を QIAamp Maxi カラムに添加する。蓋を閉めて 4,500 x g (5,000 rpm) で 1 分間遠心分離する。**

注：このステップでは、ろ液を除去する必要はありません。直ぐにステップ 10 に進んでください。

10. **カラムの縁を濡らすことなく注意深く 5 ml の Buffer AW2 を、QIAamp Maxi カラムに添加する。蓋を閉めて 4,500 x g (5,000 rpm) で 15 分間遠心分離する。**

注：遠心分離時間を延ばすことにより、溶出前に QIAamp Maxi カラムから Buffer AW2 を完全に除去することができます。遠心力が 4,000 x g 以下の場合には、残っているアルコールを蒸発させるために 70°C で 10 分間インキュベートすることをお勧めします。溶出液中の残留エタノールは、PCR を阻害する原因となり、誤った結果につながります。

11. **新しい 50 ml 遠心チューブ（添付）に QIAamp Maxi カラムを移し、ろ液の入ったチューブは除去する。**

注：QIAamp Maxi カラムを 50 ml 遠心チューブに戻す前に、チューブの外側についているろ液は拭き取ってください。

12. **室温（15 ~ 25°C）にした Buffer AE あるいは精製水（▲ 600 µl あるいは● 1 ml）を QIAamp Maxi カラムのメンブレン上に直接ピペッティングして蓋を閉める。室温で 5 分間インキュベートした後、4,500 x g (5,000 rpm) で 2 分間遠心分離する。**

精製水で溶出した DNA は酸性加水分解をおこすので、長期間 DNA を保存する場合には Buffer AE で溶出後、分注して -20°C で保存することをお勧めします。

13. **高濃度の DNA が必要な場合にはステップ 13a、最高の DNA 収量が必要な場合にはステップ 13b へ進む。**

注：制限酵素反応およびサザンブロットなどのアプリケーションには高濃度 DNA が必要です。その他のアプリケーションには DNA のトータル収量が多いステップの方が適しています（溶出効率に関する詳細な情報は英語版 Handbook 13 ページ、Table 2A および 2B を参照）。

- 13a. **最高濃度用：DNA を含む溶出液（▲ 600 µl あるいは● 1 ml）を QIAamp Maxi カラムのメンブレン上にもう 1 度ロードして蓋を閉める。室温で 5 分間インキュベートした後、4,500 x g (5,000 rpm) で 5 分間遠心分離する。**

注：カラムからの溶出量が▲ 600 µl あるいは● 1 ml 以下に減少しますが、DNA 収量には影響しません。

13b. 最高収量用：室温に戻した Buffer AE あるいは精製水（▲ 600 μ l あるいは● 1 ml）を QIAamp Maxi カラムのメンブレン上に直接ピペティングでアプライする。蓋を閉め、室温で 5 分間インキュベートした後、4,500 x g（5,000 rpm）で 5 分間遠心分離する。

注：カラムからの溶出量が▲ 600 μ l あるいは● 1 ml 以下に減少しますが、DNA 収量には影響しません。

プロトコール：QIAamp Blood Midi Kit を用いた全血からの DNA 精製（吸引プロトコール）

本プロトコールは最大 2 ml の全血からのゲノム DNA 分離用です。

実験を始める前の重要事項

- テキスト中、全血 0.3 ~ 1 ml からの精製は▲、全血 1 ~ 2 ml からの精製は●で印しています。
- 2×10^7 個以上の白血球細胞を使用しないでください。サンプルが 2×10^7 個以上の白血球細胞を含む場合は、QIAamp DNA Blood Maxi Kit を使用してください。
- ステップ中に一定した均一の吸引力を保持するために、全吸引操作中は吸引ポンプのスイッチを切らず、ステップ間はメインの吸引バルブを閉じるようにしてください（英語版 Handbook 17 ページ、Figure 3）。
- 全ての遠心操作は室温（15 ~ 25℃）で行ないます。固定ローターは使用しないでください
- サンプル中の白血球細胞数が少ない（例えば 20,000 ゲノム数以下）場合は、キャリア DNA を操作の初めに添加します。キャリア DNA は血液中の DNA と一緒に精製されます。キャリア DNA が PCR のようなダウンストリームの解析を妨害しないことを確認してください。

実験を始める前の準備事項

- 実験開始前にサンプルを室温（15 ~ 25℃）にする。
- プロトコールのステップ 4 で使用するインキュベーターを 70℃にする。
- Buffer AW1、Buffer AW2 および QIAGEN Protease を英語版 Handbook 18、19 ページの指示に従い調製する。
- Buffer AL 中に沈澱物がある場合は、56℃で溶解する。
- 英語版 Handbook 15 ~ 17 ページ、“Processing QIAamp Midi and QIAamp Maxi spin columns on the QIAvac 24 Plus” に従って QIAvac 24 Plus をセットする。

操作手順

1. 15 ml 遠心分離チューブ（添付）の底に▲ 100 μ l あるいは● 200 μ l の QIAGEN Protease をピペッティングする。
2. 血液▲ 0.3 ~ 1 ml あるいは● 1 ~ 2 ml を添加し、簡単に混和する。
必要なら遠心チューブに添加する前に血液サンプルを PBS で最高▲ 1 ml あるいは● 2 ml に調節します。

注：遠心チューブに既に分注されているサンプルに QIAGEN Protease（または Protease K）を添加できます。この場合、酵素添加後に完全に混和することが重要です。

3. **Buffer AL ▲ 1.2 ml あるいは● 2.4 ml** を添加し、チューブを 15 回転倒後、少なくとも 1 分間激しくボルテックスして完全に混和する。複数のチューブを同時に転倒させるには、チューブの入ったラックを空のラックで固定し、両方のラックをしっかりとつかんで、同時に転倒させる。

完全な溶解のために、サンプルと Buffer AL を十分にミックスして、完全に均一な溶液にしてください。

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

4. **70℃で 10 分間インキュベートする。**

DNA 収量は 70℃、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 の収量には影響しません。

5. サンプルにエタノール(96 ~ 100%) ▲ 1 ml あるいは● 2 ml を添加し、チューブを 10 回転倒後、ボルテックスして完全に混和する。

効率的な結合条件のためには、サンプルとエタノールが十分にミックスし、完全に均一な溶液になっていることが大切です。

注：96 ~ 100%エタノールを必ず使用してください。エタノール以外のアルコールを使用すると収量および純度が低下することがあります。メタノールやメチルエチルケトンなどの物質を含む変性アルコールは使用しないでください。

6. **QIAamp Midi カラムを VacConnector (オプション) あるいは吸引マニフォールドの VacValve に直接挿入する。それぞれの VacValve を開く。メインの吸引バルブを閉じ、吸引ポンプのスイッチを入れる。**

15 ml の遠心チューブはステップ 12 の遠心操作に使用することができます。

7. **ステップ 5 の混合液を▲全量あるいは●半量取り、カラムの縁を濡らさないように注意して QIAamp Midi カラムに移す。メインの吸引バルブを開く。サンプルの流速が異なる場合は、ライセートが既に通過した VacValve を閉じ、残りのカラムで一定の吸引が行なわれるようにする。全てのライセートがカラムを通過後、メインの吸引バルブを閉じる。▲ステップ 9 (ステップ 8 を飛ばす) あるいは●ステップ 8 の操作を行なう。**

▲最初のサンプル容量が 1 ml 以下の場合には、上記と同様に QIAamp Midi カラムにライセートを全て移します。ステップ 8 を飛ばしてステップ 9 に直接続けます。

8. ● **VacValve を開き、カラムの縁を濡らさないように注意してステップ 5 からの残りの溶液半量を QIAamp Midi カラムにアプライする。メインの吸引バルブを開く。サンプルの流速が異なる場合は、ライセートが既に通過した VacValve を閉じ、残りのカラムに一定の吸引が行なわれるようにする。全てのライセートがカラムを通過後、メインの吸引バルブを閉じる。**

▲最初のサンプル容量が 1 ml 以下の場合にはこのステップは不要です。ステップ 9 に直接続けます。

9. **VacValve** を開き、カラムの縁を濡らさないように注意して **4 ml** の **Buffer AW1** を **QIAamp Midi** カラムに添加する。メインの吸引バルブを開く。**Buffer AW1** がすべてカラムを通過後、メインの吸引バルブを閉じる。

サンプルの流速が異なる場合は、**Buffer AW1** が既に通過した **VacValve** を閉じ、残りのカラムに一定の吸引が行なわれるようにします。

10. **VacValve** を開き、縁を濡らさないように注意して **4 ml** の **Buffer AW2** を **QIAamp Midi** カラムに添加する。メインの吸引バルブを開く。**Buffer AW2** が全てカラムを通過後、**VacValve** を閉じる。

サンプルの流速が異なる場合は、**Buffer AW2** が既に通過した **VacValve** を閉じ、残りのカラムに一定の吸引が行なわれるようにします。

11. メンブレンを乾燥するためにそれぞれ個別に **VacValve** を **10 秒間** 開く。その後すべての **VacValve** を開き、さらにメンブレンを **15 分間** 吸引・乾燥する。

注：溶出液中の残留エタノールは、PCR を阻害する原因となり、誤った結果につながります。本ステップでのメンブレンの乾燥はこれを防ぐことができます。

12. 吸引ポンプのスイッチを切り、**QIAamp Midi** カラムを **15 ml** の遠心チューブ（ステップ 6 で取っておいたチューブ）にセットする。

注：QIAamp Midi カラムを 15 ml 遠心チューブ（ステップ 6 で取っておいたチューブ）にセットする前に、ウエットティッシュでチューブの外側についているろ液は拭き取ってください。

13. 室温（**15 ~ 25℃**）にした **Buffer AE** あるいは精製水（▲ **200 µl** あるいは● **300 µl**）を **QIAamp Midi** カラムのメンブレン上に直接添加して蓋を閉める。室温で **5 分間** インキュベート後、**4,500 x g** (**5,000 rpm**) で **2 分間** 遠心分離する。

精製水で溶出した DNA は酸性加水分解をおこすので、長期間 DNA を保存する場合には **Buffer AE** で溶出後、分注して **-20℃** で保存することをお勧めします。

14. 高濃度の DNA が必要な場合にはステップ **14a**、最高の DNA 収量が必要な場合にはステップ **14b** へ進む。

注：制限酵素反応およびサザンブロットなどのアプリケーションには高濃度 DNA が必要です。その他のアプリケーションには DNA のトータル収量が多いステップの方が適しています（溶出効率に関する詳細な情報は英語版 Handbook 13 ページ、Table 2A および 2B）。

- 14a. 最高濃度の DNA を得るために：DNA を含む溶出液（▲ **200 µl** あるいは● **300 µl**）を **QIAamp Midi** カラムのメンブレン上にもう **1 度** ロードして蓋を閉める。室温で **5 分間** インキュベートした後、**4,500 x g** (**5,000 rpm**) で **2 分間** 遠心分離する。

注：溶出量が▲ **200 µl** あるいは● **300 µl** 以下に減少しますが、DNA 収量には影響しません。

14b. 最高 DNA 収量のために：室温に戻した **Buffer AE** あるいは精製水（▲ 200 μ l あるいは● 300 μ l）を **QIAamp Midi** カラムのメンブレン上に直接ピペッティングして蓋を閉める。室温で 5 分間インキュベートした後、**4,500 x g**（5,000 rpm）で 2 分間遠心分離する。

注：溶出量が▲ 200 μ l あるいは● 300 μ l 以下に減少しますが、DNA 収量には影響しません。

プロトコール：QIAamp Blood Maxi Kit を用いた全血からの DNA 精製（吸引プロトコール）

本プロトコールは最高 10 ml の全血からのゲノム DNA 分離用です。

実験を始める前の注意事項

- テキスト中、全血 3 ~ 5 ml からの精製は▲、5 ~ 10 ml からの精製は●で印しています。
- 1×10^8 個以上の白血球細胞を使用しないでください。
- ステップ中に一定した均一の吸引力を保持するために、全吸引操作中は吸引ポンプのスイッチを切らず、操作ステップの間はメインの吸引バルブを閉じるようにしてください（英語版 Handbook 17 ページ、Figure 3 参照）。
- すべての遠心操作は室温（15 ~ 25℃）で行なってください。固定ローターは使用しないでください。
- 白血球細胞数が少ないサンプル（例；100,000 ゲノム数以下）に関しては、操作の初めにキャリア DNA を追加してください。キャリア DNA は血液中の DNA と一緒に精製されます。キャリア DNA が PCR のようなダウンストリーム解析を妨害しないことを確認してください。

実験を始める前の準備事項

- 実験開始前にサンプルを室温（15 ~ 25℃）にする。
- ステップ 4 で使用するインキュベーターを 70℃にする。
- Buffer AW1、Buffer AW2 および QIAGEN Protease を英語版 Handbook 18、19 ページの指示に従い調製する。
- Buffer AL 中に沈澱物がある場合は、56℃で溶解する。
- 英語版 Handbook 15 ~ 17 ページの“Processing QIAamp Midi and QIAamp Maxi spin columns on the QIAvac 24 Plus” に従って QIAvac 24 Plus をセットする。

操作手順

1. 50 ml 遠心分離チューブ(添付)の底に 500 μ l の QIAGEN Protease をピペッティングする。
2. 血液▲ 3 ~ 5 ml あるいは● 5 ~ 10 ml を添加し、簡単に混和する。
必要なら遠心チューブに添加する前に血液サンプルを PBS で最高▲ 5 ml あるいは● 10 ml に調節します。

注：遠心チューブに既に分注されているサンプルに QIAGEN Protease（または Protease K）を添加できます。この場合、酵素添加後に完全に混和することが重要です。

3. **Buffer AL ▲ 6 ml** あるいは **● 12 ml** を添加し、チューブを 15 回転倒後、少なくとも 1 分間激しくボルテックスして完全に混和する。複数のチューブを同時に転倒させるには、チューブに入ったラックを空のラックで固定し、両方のラックをつかんで、同時に転倒させる。

完全な溶解のために、サンプルと Buffer AL を十分にミックスして、完全に均一な溶液にしてください

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

4. **70℃で 10 分間インキュベートする。**

DNA 収量は 70℃、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 の収量には影響しません。

5. サンプルにエタノール(96～100%) **▲ 5 ml** あるいは **● 10 ml** を添加し、チューブを 10 回転倒後、激しくボルテックスして完全に混和する。

効率的な結合条件のためには、サンプルとエタノールが十分にミックスし、完全に均一な溶液になっていることが大切です。

注：96～100%エタノールを必ず使用してください。エタノール以外のアルコールを使用すると収量および純度が低下することがあります。メタノールやメチルエチルケトンなどの物質を含む変性アルコールは使用しないでください。

6. **QIAamp Maxi カラムを VacConnector (オプション) あるいは吸引マニフォールドの VacValve に直接挿入する。それぞれの VacValve を開く。メインの吸引バルブを閉じ、吸引ポンプのスイッチを入れる。**

50 ml の遠心チューブはステップ 12 の遠心操作に使用することができます。

7. **ステップ 5 の混合液を ▲ 全量あるいは ● 半量取り、カラムの縁を濡らさないように注意して QIAamp Maxi カラムに移す。メインの吸引バルブを開く。サンプルの流速が異なる場合は、ライセートが既に通過した VacValve を閉じ、残りのカラムで一定の吸引が行なわれるようにする。全てのライセートがカラムを通過後、メインの吸引バルブを閉じる。▲ステップ 9 (ステップ 8 を飛ばす) あるいは ●ステップ 8 の操作を行なう。**

▲最初のサンプル容量が 5 ml 以下の場合には、上記と同様に QIAamp Maxi カラムにライセートを全て移します。ステップ 8 を飛ばしてステップ 9 に直接続けます。

8. **● VacValve を開き、カラムの縁を濡らさないように注意してステップ 5 からの残りの溶液半量を QIAamp Maxi カラムにアプライする。メインの吸引バルブを開く。サンプルの流速が異なる場合は、ライセートが既に通過した VacValve を閉じ、残りのカラムに一定の吸引が行なわれるようにする。全てのライセートがカラムを通過後、メインの吸引バルブを閉じる。**

▲最初のサンプル容量が 5 ml 以下の場合にはこのステップは不要です。ステップ 9 に直接続けます。

9. **VacValve** を開き、カラムの縁を濡らさないように注意して **15 ml** の **Buffer AW1** を **QIAamp Maxi** カラムに添加する。メインの吸引バルブを開く。**Buffer AW1** が全てカラムを通過後、メインの吸引バルブを閉じる。

サンプルの流速が異なる場合は、**Buffer AW1** が既に通過した **VacValve** を閉じ、残りのカラムに一定の吸引が行なわれるようにします。

10. **VacValve** を開き、縁を濡らさないように注意して **15 ml** の **Buffer AW2** を **QIAamp Maxi** カラムに添加する。メインの吸引バルブを開く。**Buffer AW2** が全てカラムを通過後、**VacValve** を閉じる。

サンプルの流速が異なる場合は、**Buffer AW2** が既に通過した **VacValve** を閉じ、残りのカラムに一定の吸引が行なわれるようにします。

11. メンブレンを乾燥するためにそれぞれ個別に **VacValve** を **10 秒間** 開く。その後すべての **VacValve** を開き、さらにメンブレンを **15 分間** 吸引・乾燥する。

注：溶出液中の残留エタノールは PCR を阻害する原因となり、誤った結果につながります。本ステップでのメンブレンの乾燥はこれを防ぐことができます。

12. 吸引ポンプのスイッチを切り、**QIAamp Maxi** カラムを **50 ml** の遠心チューブ（ステップ 6 で取っておいたチューブ）にセットする。

注：QIAamp Maxi カラムを 50 ml 遠心チューブ（ステップ 6 で取っておいたチューブ）にセットする前に、ウエットティッシュでチューブの外側についているろ液は拭き取ってください。

13. 室温（**15 ~ 25℃**）にした **Buffer AE** あるいは精製水（▲ **600 µl** あるいは● **1 ml**）を **QIAamp Maxi** カラムのメンブレン上に直接添加して蓋を閉める。室温で **5 分間** インキュベート後、**4,500 x g (5,000 rpm)** で **2 分間** 遠心分離する。

精製水で溶出した DNA は酸性加水分解をおこすので、長期間 DNA を保存する場合には **Buffer AE** で溶出後、分注して **-20℃** で保存することをお勧めします。

14. 高濃度の DNA が必要な場合にはステップ 14a、最高の DNA 収量が必要な場合にはステップ 14b へ進む。

注：制限酵素反応およびサザンブロットなどのアプリケーションには高濃度 DNA が必要です。その他のアプリケーションには DNA のトータル収量が多いステップの方が適しています（溶出効率に関する詳細な情報は英語版 Handbook 13 ページ、Table 2A および 2B）。

- 14a. 最高濃度の DNA を得るために：DNA を含む溶出液（▲ **600 µl** あるいは● **1 ml**）を **QIAamp Maxi** カラムのメンブレン上にもう **1 度** ロードして蓋を閉める。室温で **5 分間** インキュベートした後、**4,500 x g (5,000 rpm)** で **2 分間** 遠心分離する。

注：溶出量が▲ **600 µl** あるいは● **1 ml** 以下に減少しますが、DNA 収量には影響しません。

14b. 最高 DNA 収量のために：室温に戻した Buffer AE あるいは精製水（▲ 600 μ l あるいは● 1 ml）を QIAamp Maxi カラムのメンブレン上に直接ピペッティングして蓋を閉める。室温で 5 分間インキュベートした後、4,500 x g (5,000 rpm) で 2 分間遠心分離する。

注：溶出量が▲ 600 μ l あるいは● 1 ml 以下に減少しますが、DNA 収量には影響しません。

トラブルシューティング

コメント

洗浄後 QIAamp Midi/Maxi カラム上に有色の残留物が見られる

- a) サンプルと Buffer AL とのミックス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。
- b) ライセートを QIAamp Midi/Maxi カラムにロードする前にエタノールを未添加
新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。
- c) Buffer AW1 あるいは AW2 の調製が不正確
Buffer AW1 および AW2 濃縮液をエタノールで正確に希釈したか確認する。新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。
- d) 動物血液を調製
ヘモグロビンはある動物種（例；サルおよびマウス）の血液からは除去するのが困難で、続いて行なう実験に影響を及ぼすこともある。Buffer AW1 による洗浄ステップを追加して行なう。
次回の調製で血液量を減らす。QIAGEN Protease の代わりに Proteinase K を使用する。

溶出溶液中に DNA が少ないか皆無

- a) サンプル中の細胞濃度が低い
サンプル量を増加し、QIAamp Midi/Maxi カラムに数回に分けてロードする。Buffer AE での溶出量を減少する（英語版 Handbook 12 ページ参照）。新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。
- b) サンプルと Buffer AL とのミックス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。
- c) ライセートが高粘度のために結合が不完全
新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。Buffer AL の量を 2 倍にして使用する。サンプルに Buffer AL に添加後、即座にそして完全にミックスする。インキュベーション後 2 倍量のエタノールを添加し、十分にミックスする。サンプルを数回に分けて同じ QIAamp Midi/Maxi カラムにロードする。

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 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。
- e) ライセートを QIAamp Midi/Maxi カラムにロードする前にエタノールを未添加
新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。
- f) QIAamp Midi/Maxi カラムを室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートしなかった
Buffer AE あるいは精製水を添加後、QIAamp Midi/Maxi カラムを室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間カラムをインキュベートする。
- g) DNA の溶出が効率的でない
DNA を含む溶出液 (Buffer AE あるいは精製水) を再度 QIAamp Midi/Maxi カラムにロードし、遠心分離する前に室温で 5 分間カラムをインキュベートする。
- h) 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。

溶出液中の DNA 収量が低い

Buffer AE あるいは精製水 300 µl (Midi) または 1 ml (Maxi) で DNA を溶出する

300 µl (Midi) あるいは 1 ml (Maxi) 以下の容量で溶出すれば DNA の濃度は高くなるが、DNA のトータル収量はわずかに減少する。4 µg (Midi) あるいは 8 µg (Maxi) 以下の DNA を含むサンプルには 100 µl (Midi) あるいは 400 µl (Maxi) の Buffer AE あるいは精製水での再溶出を推薦する。

コメント

精製した核酸の A_{260}/A_{280} 比率が低い

- a) サンプルと Buffer AL とのミックス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。
- b) インキュベーション時間が不十分なために Buffer AL 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。
- c) ライセートを QIAamp Midi/Maxi カラムにロードする前にエタノールを未添加
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。新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。
- e) 動物血液を調製
新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。次回の調製で血液量を減らす。QIAGEN Protease の代わりに Proteinase K を使用する。

コメント

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“溶出溶液中に DNA が少ないか皆無” (18 ページ) の項でチェックする。可能な場合には、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、溶出量を減らす。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上昇する。QIAamp Midi/Maxi カラム上に残留した DNA は溶出ステップ後に、同一の溶出液を再度カラムにアプライし、70°C に再度温めることで回収できる。
- b) 動物血液を調製
- 新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。次回の調製で血液量を減らす。QIAGEN Protease の代わりに Proteinase K を使用する。
- c) 溶出液中に Buffer AW2 が残留
- 新しいサンプルで再度 DNA 精製を行なう。ステップ 9 で推薦する方法に従って遠心操作を行なう (スピンプロトコール)。
- ステップ 10 で溶出前にスピнкаラムがろ液についていないことを確認する。(スピンプロトコール)。
- d) 洗浄ステップ後にカラムノズルに溶液が付着
- ろ液を除去し、QIAamp Midi/Maxi カラムをチューブに移し、4,500 x g (5,000 rpm) で 1 分間遠心分離する。

Buffer AL 中の白色沈澱物

白色沈澱物が低温での保存あるいは長期保存により形成

56°C でインキュベートして沈澱物を溶解する。

一般的な操作

吸引プロトコールを用いた際に、ライセートがカラムを完全に通過しない

吸引が十分でない、あるいは吸引ステップの際に VacValve が閉まっていた。吸引力を増加するか、吸引中は VacValve を開けておく。吸引力を増加できない場合には、QIAamp Maxi カラムを新しい 50 ml のコレクションチューブに入れ、蓋を開けて 1,850 x g (3,000 rpm) で 3 分間あるいはライセートがメンブレンを完全に通過するまで遠心分離する。QIAamp DNA Blood Maxi のスピンプロトコール、ステップ 8 (8 ページ) に進む。

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp® (QIAGEN Group).

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。

© 2000–2010 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

