

October 2002

マイクロダイセクション用特別プロトコール

マイクロダイセクションにより採取した 組織サンプルからの DNA 分離および HotStarTaq[®] DNA Polymerase を用いた増幅

本プロトコールは、マイクロダイセクションにより採取した動物組織から proteinase K (例 ; QIAGEN[®] Proteinase K、Cat. no. 19131) を用いた DNA 精製および HotStarTaq DNA Polymerase (Cat. no. 203203) による増幅のためにデザインされています。

イントロダクション

レーザーマイクロダイセクションにより採取した組織は、微量なサンプルから核酸を精製しなければならないため、これらの分子生物学的な解析は非常に困難です。さらに、固定ステップや染色ステップにより DNA が分解していないという保証はなく、これらの問題を最小限に抑えるために、固定プロトコールを改良、あるいは瞬間凍結したサンプルから凍結切片を使用する必要性が生じます。

Leica では切片作製、染色、マイクロダイセクションのための様々な装置および消耗品を提供しています (www.leica-microsystems.com)。

DNA を PCR のみに使用する場合は、次ページの“プロトコール (直接調製法)”に記載されているように、適当量の PCR バッファー中で proteinase K を用いてサンプルのタンパク質分解を行なった後、酵素を不活性化し、その一部を PCR 反応に使用することが可能です。メラニン、スベルミディン、あるいはエオジンのような PCR を阻害する可能性のある物質を PCR 反応前に除去するため、サンプルのクリーンアップが必要な場合がしばしばあります。

注：使用した固定法、サンプルの保存期間、染色方法、保存条件により、DNA のフラグメント化が高いことがあり、分離した DNA フラグメントサイズには限度があります。

プロトコール：直接調製法

1. 少量の 1x QIAGEN PCR Buffer 中にサンプルを直接採取する（10x QIAGEN PCR Buffer を蒸留水で希釈して 1x QIAGEN PCR Buffer を調製する）。
2. QIAGEN Proteinase K 10 μ l（少なくとも 6 mAU）添加し、1x QIAGEN PCR Buffer により最終容量を 25 μ l に調整する。
3. 時々チューブを回転させて反応溶液を 55°C で 3 時間（ホルマリン固定組織では 16 時間）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する。

注：ホルマリン固定組織サンプルを調製する場合には、使用した固定時間および固定プロトコールにより、このステップでのインキュベーション時間を 16 ~ 24 時間に延長する必要があります。

4. サンプルを 95°C で 10 分間インキュベートし、Proteinase K を不活性化する。
5. チューブ蓋のサンプルを回収するために簡単に遠心操作する。
6. 全サンプルを用いて PCR を行なうためには、1x QIAGEN PCR Buffer、HotStarTaq DNA Polymerase、2 倍の濃度のプライマーを含む PCR マスターミックス 25 μ l をサンプルチューブに添加し、PCR アッセイを 50 μ l にセットアップする。または、スタンダード PCR 反応に Proteinase K 処理されたサンプルの一部を使用する。

Trademarks: QIAGEN®, QIAquick®, HotStarTaq® (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。

また、製品情報、仕様、カタログ番号 (Cat. no.)、価格等は予告なく変更する場合がございます。予めご了承ください。

最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては www.qiagen.com の “Trademarks and Disclaimers” をご覧ください。
QIAGEN キットの Handbook および User Manual は www.qiagen.com から入手可能です。

© 2016 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.com

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