

prepGEM™ Universal Kit 簡易マニュアル

2020/09/10 作成

エムエス機器株式会社

以下は MicroGEM 社の公式 Website (<https://microgembio.com/>) からダウンロードできる Quick-Start Guide (QSG) や Ordering Information & Product Guide や公式 Website の記述など、複数の情報源から作成した簡易マニュアルです。必要に応じアレンジしていただけたら幸いです。なお、簡易マニュアルのもととなった QSG の版は “QSG_001_190531_prepGEM Universal” です。

<用途>

prepGEM Universal Kit はさまざまなサンプルから DNA を抽出するためのキットです。

<内容物>

prepGEM Universal Kit の内容物は以下のとおりです。

- prepGEM
- Histosolv
- 10x BLUE Buffer
- 10x RED+ Buffer
- 10x ORANGE+ Buffer

<溶解>

上記内容物のうち Histosolv だけは凍結乾燥粉末で届くので到着後に DNA-free 水を下記のように添加して溶解してください。

| 反応(回) | 型番 | DNA-free 水 |
|-------|---------|------------|
| 50 | PUN0050 | 0.55 mL |
| 100 | PUN0100 | 1.1 mL |
| 500 | PUN0500 | 5.5 mL |
| 1000 | PUN1000 | 11.0 mL |

<保管>

prepGEM Universal Kit は安定ゆえ室温配送されますが、到着後の未開封キットは 4℃で保管してください。チューブ開封後の prepGEM や溶解後の Histosolv は念のため小分けにして-20℃で保管してください。バッファーは 4℃で保管できます。

Buccal swabs (口腔スワブ)

1. 口腔スワブをできるだけ少量の DNA-free 水に浸して洗浄します。通常 400-500 μL の液量が必要です。マイクロチューブの内壁にスワブをこすりつけるようにしてできるだけ液体を絞り出します。

2. PCR チューブ中で以下のようにサンプル・試薬を混合します。

| | |
|------------------|-----------------|
| 20 μL | スワブ溶出液 |
| 10 μL | 10x BLUE Buffer |
| 69 μL | DNA-free 水 |
| 1 μL | <i>prep</i> GEM |

3. サーマルサイクラーで以下のように熱処理を行います。

| | |
|-----------------------|------|
| 75 $^{\circ}\text{C}$ | 5 分 |
| 95 $^{\circ}\text{C}$ | 2 分 |
| 4 $^{\circ}\text{C}$ | HOLD |

これでサンプルは解析準備が整いました。抽出された DNA を保存する場合は 1/10 容量の 10x TE Buffer を添加して-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下で保存します。

Tissue Culture (培養細胞)

細胞数にあわせて下記のように抽出液量を調節可能です。10x BLUE Buffer は抽出液量の 1/10 容量となるよう添加してください。

| 抽出液量 | 細胞数 | prepGEM 液量 |
|----------------|----------------|-------------|
| 50-100 μ L | 50,000-500,000 | 1 μ L |
| 20-50 μ L | 5,000-50,000 | 1 μ L |
| 5-20 μ L | 100-5,000 | 0.5 μ L |
| 1-15 μ L | 1-500 | 0.2 μ L |

<浮遊細胞>

1. 細胞懸濁液を 200g x 5 分遠心します。
2. 上清を完全に取り除きます。
3. 細胞ペレットを prepGEM 抽出液ミクスチャー（次ページ参照）に懸濁します。

<接着細胞>

1. フラスコ等に接着した細胞をトリプシンやセルスクレイパーで剥がし 200g x 5 分遠心します。
2. 上清を完全に取り除きます。
3. 細胞ペレットを prepGEM 抽出液ミクスチャーに懸濁します。

<RNAlater 中で保存された細胞>

1. 細胞懸濁液を 3,000g x 5 分遠心します。
2. 上清を完全に取り除きます。
3. 細胞ペレットを prepGEM 抽出液ミクスチャーに懸濁します。

<FACS または LCM>

prepGEM 抽出液ミクスチャーに目的細胞集団をダイレクトに集めることが可能です。あるいは LCM のキャピラリーにダイレクトに prepGEM 抽出液ミクスチャーを添加することが可能です。もし細胞が別のバッファー中に集められた場合は 1/10 容量の 10x バッファーを添加して 1x 終濃度のバッファーとします。

prepGEM は EDTA 等のキレート剤に影響を受けます。もし細胞が EDTA を含む溶液に懸濁されている場合は 200g の遠心で細胞をペレットにしたのち上清を取り除き 1x BLUE Buffer で遠心洗浄してからお使いください。

Tissue Culture (培養細胞) ~前ページからのつづき~

以下は抽出容量 50 μ L の系の例ですが、前ページの表のとおり必要に応じてスケールを変化させることが可能です。

1. PCR チューブ中で以下のサンプル・試薬を混合します。

細胞懸濁液または細胞ペレット

5 μ L 10x BLUE Buffer

1 μ L *prep*GEM

50 μ L となるまで DNA-free 水で Fill up

2. サーマルサイクラーで以下のように熱処理を行います。

75 $^{\circ}$ C 10 分 (細胞数が 50,000 以上の場合)

または 5 分 (細胞数が 1,000~50,000 の場合)

または 2 分 (細胞数が 1,000 以下の場合)

95 $^{\circ}$ C 2 分

4 $^{\circ}$ C HOLD

これでサンプルは解析準備が整いました。抽出された DNA を保存する場合は 1/10 容量の 10x TE Buffer を添加して-20 $^{\circ}$ C以下で保存します。

Tissue (組織・臓器)

組織・臓器を約 1-2mm³にカットします。毛包の場合は 1-3 本の毛髪を用意し、毛包のうえ 4mm ぐらいの位置でカットします。

1. PCR チューブ中で以下の試薬を混合します。

| | |
|------|--------------------|
| 79μL | DNA-free 水 |
| 10μL | 10x ORANGE+ Buffer |
| 1μL | <i>prep</i> GEM |
| 10μL | Histosolv |

2. サンプルを入れます。

3. サンプルをイエローチップ等で押しつぶしボルテックスミキサーにかかけます。

4. サーマルサイクラーで以下のように熱処理を行います。

| | |
|-----|------|
| 52℃ | 5 分 |
| 75℃ | 10 分 |
| 95℃ | 3 分 |
| 4℃ | HOLD |

5. 上清を別の新しいチューブに移しとります。

これでサンプルは解析準備が整いました。DNA は移しとった上清中にあります。抽出された DNA を保存する場合は 1/10 容量の 10x TE Buffer を添加して-20℃以下で保存します。

Insects and Mouse Tails (昆虫・マウス尾)

1. PCRチューブ中で以下のサンプル・試薬を混合します。必要に応じてスケールを変化させることが可能です。

昆虫（必要に応じてイエローチップ等で押しつぶす）またはマウス尾

44 μ L DNA-free 水

5 μ L 10x BLUE Buffer

1 μ L *prep*GEM

2. サーマルサイクラーで以下のように熱処理を行います。

75 $^{\circ}$ C 15分

95 $^{\circ}$ C 2分

4 $^{\circ}$ C HOLD

3. 上清を別の新しいチューブに移しとります。

これでサンプルは解析準備が整いました。DNA は移しとった上清中にあります。抽出された DNA を保存する場合は 1/10 容量の 10x TE Buffer を添加して-20 $^{\circ}$ C以下で保存します。

Saliva on Storage Cards (FTA カード中の唾液)

FTA カードによってはカード中の保存剤で Taq DNA Polymerase の反応が阻害されることがあります。そのため DNA 抽出のまえに洗浄することをお勧めします。

1. FTA カードから約 3mm のディスクを打ち抜き PCR チューブに移します。
2. PCR チューブに 100 μ L の DNA-free 水を添加して室温で 15 分間静置して洗浄します。上清をできるだけ取り除きます。
3. PCR チューブ中で以下のようにサンプル・試薬を混合します。

| | |
|------------|-----------------|
| 5 μ L | 10x BLUE Buffer |
| 44 μ L | DNA-free 水 |
| 1 μ L | <i>prep</i> GEM |
4. サーマルサイクラーで以下のように熱処理を行います。

| | |
|-----------------|------|
| 75 $^{\circ}$ C | 5 分 |
| 95 $^{\circ}$ C | 2 分 |
| 4 $^{\circ}$ C | HOLD |
5. 上清を別の新しいチューブに移しとります。

これでサンプルは解析準備が整いました。DNA は移しとった上清中にあります。抽出された DNA を保存する場合は 1/10 容量の 10x TE Buffer を添加して-20 $^{\circ}$ C以下で保存します。

Blood (血液)

10x RED+ Buffer には血液中の PCR 阻害物質を沈殿させる成分が含まれています。PCR チューブの遠心後は沈殿物に触れないよう上清を新しいチューブに移しとってください。遠心は通常 13,000r.c.f × 5 分で十分です。もし r.c.f を低く設定した場合は遠心時間を延ばしてください。例えば 96 穴プレートをスウィングローターで遠心する場合は 3,000r.c.f で 10 分となります。遠心はサーマルサイクラーで熱処理を行った後ただちに行ってください。遠心後に移しとった上清にわずかに色がついていることがありますが PCR や qPCR 反応や STR 解析には影響ありません。

1. PCR チューブ中で以下のサンプル・試薬を混合します。

- 2-5 μ L 血液
- 10 μ L 10x RED+ Buffer
- 1 μ L *prepGEM*
- 100 μ L となるまで DNA-free 水で Fill up する

2. サーマルサイクラーで以下のように熱処理を行います。

- 75°C 5 分
- 95°C 5 分
- 4°C HOLD

3. PCR チューブを 13,000r.c.f で 5 分遠心します。上の遠心に関する記述を参照ください。

4. 上清を別の新しいチューブに移しとります。

これでサンプルは解析準備が整いました。DNA は移しとった上清中にあります。抽出された DNA を保存する場合は 1/10 容量の 10x TE Buffer を添加して -20°C 以下で保存します。

Blood on Storage Cards (FTA カード中の血液)

FTA カードによってはカード中の保存剤で Taq DNA Polymerase の反応が阻害されることがあります。そのため DNA 抽出のまえに洗浄することをお勧めします。

1. FTA カードから約 3mm のディスクを打ち抜き PCR チューブに移します。
2. PCR チューブに 100 μ L の DNA-free 水を添加して室温で 15 分間静置して洗浄します。上清をできるだけ取り除きます。
3. PCR チューブ中で以下のようにサンプル・試薬を混合します。

| | |
|------------|-----------------|
| 5 μ L | 10x RED+ Buffer |
| 44 μ L | DNA-free 水 |
| 1 μ L | <i>prep</i> GEM |
4. サーマルサイクラーで以下のように熱処理を行います。

| | |
|-----------------|------|
| 75 $^{\circ}$ C | 5 分 |
| 95 $^{\circ}$ C | 5 分 |
| 4 $^{\circ}$ C | HOLD |
5. PCR チューブを 13,000r.c.f で 5 分遠心します。前述の遠心に関する記述を参照ください。
6. 上清を別の新しいチューブに移しとります。

これでサンプルは解析準備が整いました。DNA は移しとった上清中にあります。抽出された DNA を保存する場合は 1/10 容量の 10x TE Buffer を添加して-20 $^{\circ}$ C以下で保存します。

Technical Tips (技術情報)

- *prepGEM Universal Kit* は DNA を抽出するためのキットです。このキットは細胞を溶解し DNA から核タンパク質を除去します。抽出された DNA はさまざまなジェノタイピング (SNP 解析、STR 解析など) や定量 PCR、マルチプレックス PCR、エンドポイント PCR 等に用いることが可能です。
- *prepGEM Universal Kit* のプロトコルには濃縮ステップがありません。それゆえ最終抽出物の DNA 濃度は 1) サンプルの質 2) スワブの場合はスワブサイズや溶出に使った液量 3) サーマルサイクラーにかけた際の液量 に依存します。
- *prepGEM Universal Kit* で抽出された DNA は 95°C 数分のステップのために多くがシングルストランド形状となっています。
- *prepGEM Universal Kit* で抽出された DNA を正確に定量するには qPCR を奨励します。あるいは PicoGreen, iQuant, Qubit 等の蛍光色素法で定量することも可能です。OD₂₆₀ 測定による定量は適していません。
- DNA 抽出前や抽出後はサンプルを 4°C あるいは氷上で扱うことを奨励します。
- 抽出された DNA を保存する場合は 1/10 容量の 10x TE Buffer を添加して -20°C 以下で保存します。