

forensicGEM™ Universal Kit 簡易マニュアル

2020/10/09 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_003_190531_forensicGEM Universal" です。

<用途>

forensicGEM Universal Kit はさまざまな法医学サンプルから DNA を抽出するためのキットです。

<内容物>

forensicGEM Universal Kit の内容物は以下のとおりです。

- forensicGEM
- 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 | FUN0050 | 0.55 mL |
| 100 | FUN0100 | 1.1 mL |
| 500 | FUN0500 | 5.5 mL |
| 1000 | FUN1000 | 11.0 mL |

<保管>

forensicGEM 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 forensicGEM 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>forensic</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 (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>forensic</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。

Cigarette Butts (タバコ吸殻)

1. タバコ吸殻のフィルター部分から 1 cm の紙を取り、四分の一にカットします。
2. その紙を 3 cm² ほどの小紙片に刻み、そのうちの 1 つを PCR チューブに入れます。
3. PCR チューブ中で以下の試薬を混合します。

| | |
|------|---------------------|
| 44μL | DNA-free 水 |
| 5μL | 10x BLUE Buffer |
| 1μL | <i>forensic</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°C | 5 分 |
| 95°C | 2 分 |
| 4°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°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>forensic</i> GEM |
6. 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 |
7. 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 forensicGEM
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>forensic</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。

Bloodstains (血液の染み)

<直接抽出>

1. 血液の染みがある布地を 3 mm x 3 mm より小さくなるようにカットして PCR チューブに入れます。
2. PCR チューブ中で以下のように試薬を混合します。

| | |
|------------|-----------------|
| 5 μ L | 10x RED+ Buffer |
| 44 μ L | DNA-free 水 |
| 1 μ L | forensicGEM |
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 $^{\circ}$ C | 5 分 |
| 95 $^{\circ}$ C | 5 分 |
| 4 $^{\circ}$ C | HOLD |
4. 最高速で 2 分で遠心し上清を別の新しいチューブに移しとります。前述の遠心に関する記述を参照ください。

<スワブ リフト>

1. 血液の染みのある布地を湿らせた極細スワブでこすってリフトしてください。
2. PCR チューブ中で以下のように試薬を混合します。

| | |
|------------|-----------------|
| 10 μ L | 10x RED+ Buffer |
| 89 μ L | DNA-free 水 |
| 1 μ L | forensicGEM |
3. 極細スワブを抽出液ミクスチャーに浸け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。
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. 最高速で 2 分で遠心し上清を別の新しいチューブに移しとります。前述の遠心に関する記述を参照ください。

Technical Tips (技術情報)

- *forensicGEM 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。
- *forensicGEM 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。
- *forensicGEM 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。
- *forensicGEM 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。