

製品コード 9091

研究用

TaKaRa

TaKaRa DEXPAT™

(DNA Extraction from Paraffin-embedded Tissue)

説明書

v201907Da

TaKaRa DEXPAT は、10%ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片から、PCR 増幅に適した DNA をワンステップで抽出するための画期的な DNA 抽出剤です。従来、非常に時間と労力を要したパラフィン切片からの DNA 抽出が、TaKaRa DEXPAT を用いると、

1. 脱パラフィン不要
2. わずか 10 分で抽出 (全工程約 25 分)
3. PCR グレードの DNA (400 bp 以下の PCR に使用可能)
4. 毒劇物を一切使用しない
5. 部位限定抽出法により解析の精度を高める

といった優れた特長で迅速かつ簡便に行うことが可能になりました。TaKaRa DEXPAT は、特殊界面活性剤と PCR 阻害物質吸着樹脂を最適濃度に混合したものです。パラフィン包埋組織切片にこの TaKaRa DEXPAT を加え、100°C で加熱後 4°C で遠心するだけで PCR グレードの DNA が得られます。なお、パラフィン包埋組織切片から抽出される DNA は、固定・包埋処理によりすでに分解されている可能性が高く、多くの場合 400 bp 以上の PCR 増幅は困難です。また、抽出された DNA の品質は固定・包埋された組織の状態に直接影響されますのでご注意ください。

【注】本製品は、哺乳類組織のパラフィン切片から DNA を抽出して哺乳類遺伝子を検出するために使用してください。細菌および真菌遺伝子の検出に用いることはできません。

I. 内容 (100 回用)

DEXPAT 10 ml × 5

II. 保存

4°C

III. 製品以外に必要な器具

マイクロピペット
微量冷却遠心機 (12,000 rpm)
ヒートブロック (100°C)
1.5 ml マイクロチューブ (目盛り付を使うと便利です。)
プラスチックグローブ

IV. 操作

1. パラフィン包埋組織を 5 μm の厚さ (4 ~ 10 μm であれば可能) に切断し、切片 1 ~ 3 枚を 1.5 ml マイクロチューブ (オートクレーブ処理済み) に滅菌ピンセットで移す。組織の大きさとして、少なくとも 6 mm × 6 mm 相当のものを準備する。

以下の操作も含め、実験用手袋を着用し、ヌクレアーゼの混入による DNA の分解を防いでください。試料の薄切にあたっては、マイクロームはネオクリーナーなどの過酸化水素系消毒剤、ついでエタノールで拭いてください。換刃メス、ピンセットなどの器具は同様の処置を行った後、UV 照射を 10 分以上行い、DNA の残存によるクロスコンタミを避けるように注意してください。

2. DEXPAT ボトルを回転させ、試薬を均一に懸濁する。試料の入ったマイクロチューブに迅速に 0.5 ml (約 20 滴) ずつ添加する。添加途中で試薬が分離した場合は再懸濁する。

1 チューブごとにボトル中の試薬を均一に懸濁し添加してください。静置しておくとも PCR 阻害物質吸着樹脂が沈殿しますので注意してください。

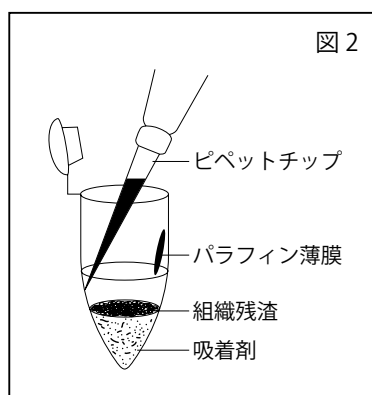
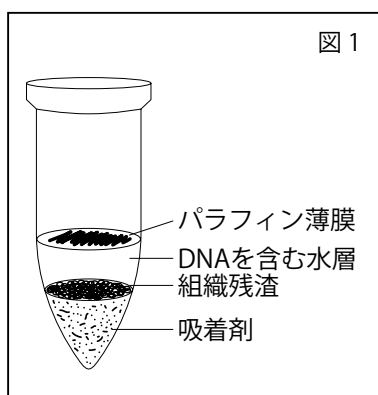
3. マイクロチューブの蓋を閉め、100℃で10分間加熱処理する。

ヒートブロックを使用すると便利です。マイクロチューブの蓋にあらかじめ注射針（例えば23G）で穴をあけておくと内圧上昇による試料の飛散を防げます。この場合、アルミホイルで軽くマイクロチューブの上部をカバーしておくことで水分蒸発を防げます。

4. 加熱後、直ちにあらかじめ4℃に冷却しておいた微量遠心機にマイクロチューブをセットし、12,000 rpm、4℃で10分間遠心分離を開始する。（図1）

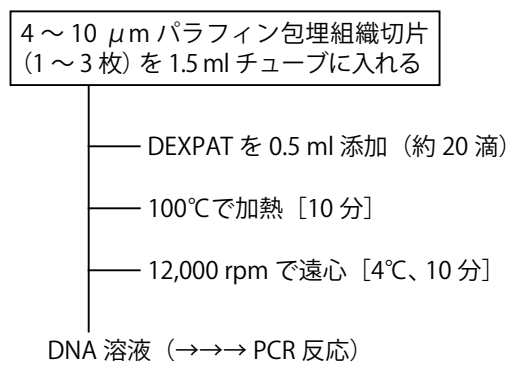
5. マイクロピペットで上層にできたパラフィン薄膜を避けて、樹脂ならびに組織残渣を吸い取らないように水層を分取する。（図2）

5. で分取した水層をそのまま PCR 反応のテンプレートとして使用できます。（PCR 反応液の 1/10 量まで持ち込み可）。50 μ l PCR 反応系で 5 μ l の使用が標準ですが、切片の大きさ、状態で変動します。PCR 反応に用いるサンプル量が多すぎると、PCR 反応が阻害されることがあります。



【フローチャート】

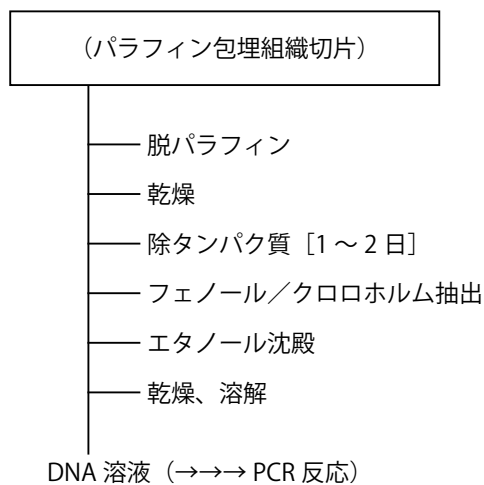
TaKaRa DEXPAT



25分

所要時間

従来抽出法¹⁾



2 ~ 3日

V. 注意

PCR の成否は固定、包埋された組織の状態に直接影響されます。以下に一般的な組織固定、包埋時の注意事項を示します。

1. 固定法 固定液は 10%ホルマリン液が浸透性がよく、推奨されています（浸透率は 1 時間に約 1 mm）。小さな生検材料はそのまま浸漬してください。大きい摘出材料では割を入れ固定液の浸透を高め、固定時間を 3 日以内にするをお勧めします。また、佐藤ら²⁾は AMeX 固定を推奨しているので参考にしてください。
2. 包埋 通常の方法でエタノール脱水、クロロホルム置換後、融点 56 ~ 58°C のパラフィンに包埋してください。ウイルスなどの外来性遺伝子をターゲットとするときは新鮮な試薬を使用してください。

VI. Q & A

Q1：RNA は回収できますか？

A1：本製品は DNA 回収用の製品ですので RNA は回収できません。

Q2：パラフィン包埋切片以外からの回収に使用できますか？

A2：凍結切片で使用できることを確認しています（VII. 実験例 C）。なお、脱パラフィン済みの切片は確認しておりません。

Q3：スライドに固定した組織から DNA 抽出できるか？

A3：スライドから削り落とししたり、キシレン等ではがして使用する場合は DNA を抽出できません。スライドから行う場合は、部位限定抽出法を用いてください。ただし、組織染色を行ったスライドからは染色剤による PCR 反応の阻害が起きますので、ご注意ください。

Q4：回収した DNA を吸光度計で定量できますか？

A4：DEXPAT は精製キットではなく DNA 回収用キットであるために、回収した DNA は UV 吸光度で定量できません。

Q5：回収した DNA を電気泳動で確認することができますか？

A5：回収される DNA は微量のため電気泳動では確認できない場合が多いです。

Q6：抽出した DNA はどれくらい保存できるか？

A6：4°C で 3 ヶ月、- 20°C で 1 年間保存した例があります。

Q7：回収できる水層はどのくらいですか？

A7：通常 200 ~ 300 μ l 回収できます。

Q8：プロトコール通りに加熱、遠心したが水層ができなかった。改善点は？

A8：使用する切片が大きすぎることが考えられます。以下の項目についてご確認ください。

- ・切片の量を減らすか、DEXPAT の量を増やす。
- ・回転数を上げる（例えば、15,000 rpm）。
- ・加熱中に攪拌し、DEXPAT とよくなじませる。

サンプルの数（チューブの数）が多い場合、冷却遠心 10 分ではパラフィンが上層に薄膜としてしっかり固まらない場合があります。その時は、遠心時間を延ばすか、一度に遠心するサンプル数（チューブ数）を減らして、十分冷却されるようにして遠心してください。

-
- Q9：回収したDNAを用いてPCR反応を行なったところ目的のバンドが確認できなかった。
改善点は？
- A9：1) PCR 反応液量の 1/10 量の DNA 液をご使用ください。これ以上鑄型量を増やすときはエタノール沈殿などでバッファ交換をしてください。
- 2) 固定・包埋処理により DNA がかなりダメージを受けていることが考えられます。
- 3) 何らかの阻害物質が混在することが考えられます。一度、抽出 DNA 液をエタノール沈殿により精製して PCR を行ってみてください。

エタノール沈殿による精製および濃縮例

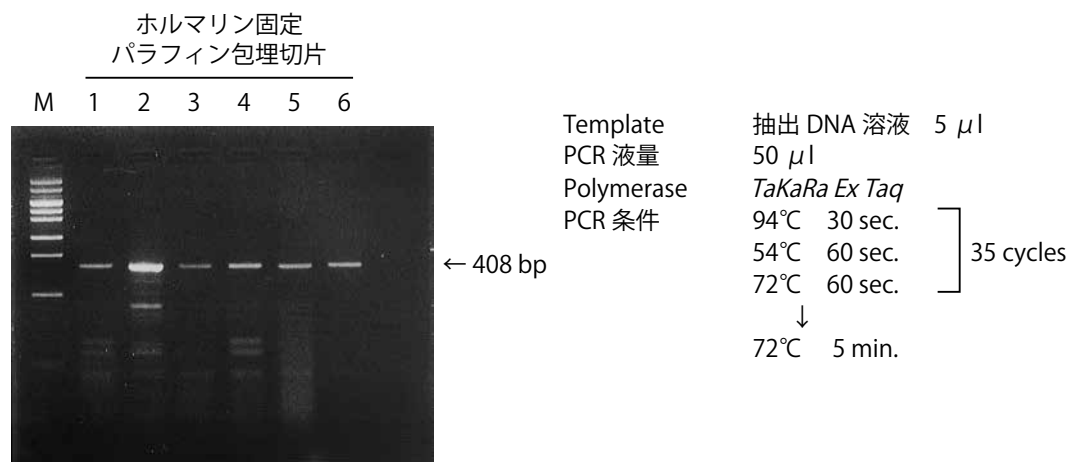
1. 回収した抽出 DNA 液の液量を見積もる。
2. 1. の液量の 1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムを加える。
3. 1. の 2.5 倍量のエタノール、または等量のイソプロパノールを加える。
4. 均一になるように転倒混和する。
5. -20°C で、30 分から 1 時間静置する。
6. 4°C 、 $12,000 \times g$ で、10 分から 15 分間遠心する。
7. 上清を除き、70%エタノールを 1 ml 加える。
8. 4°C 、 $12,000 \times g$ で、10 分から 15 分間遠心する。
9. 上清を捨て、風乾する。
10. 適当量の TE バッファなどで溶解する。(20 ~ 25 μl で溶解すれば、10 倍程度に濃縮することになる。)

VII. 実験例

TaKaRa DEXPAT と *TaKaRa Ex Taq*® との組合せで、PCR 増幅を行った実験例を示しています。

A. 6 種類の切片からの β -globin の増幅

6 種類のパラフィン切片 (それぞれ 10 μ m、2 枚) から、DEXPAT で抽出した DNA を用いて PCR を行った。なお、本実験で抽出された DNA 溶液は 4°C で 1 ヶ月保存後も同様の増幅パターンを示した。

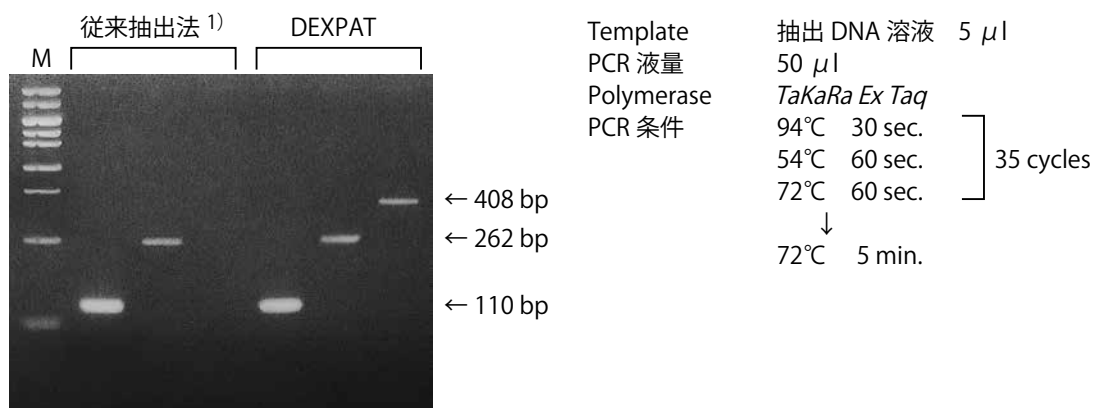


M : pHY Marker (100 ng)

B. 10 年前の切片からの β -globin、*K-ras12*、*p53* (exon 5、exon 6) の増幅

10 年前に作製された大腸癌組織のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片 (10 μ m、2 枚) から DEXPAT で抽出した DNA を用いて PCR を行った。

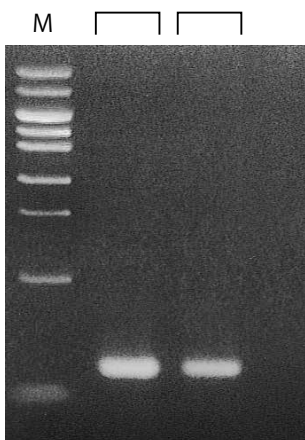
B-1. β -globin 遺伝子 (110 bp、262 bp、408 bp) の増幅



M : pHY Marker (100 ng)

B-2. K-ras12 遺伝子 (107 bp) の増幅

従来抽出法¹⁾ DEXPAT

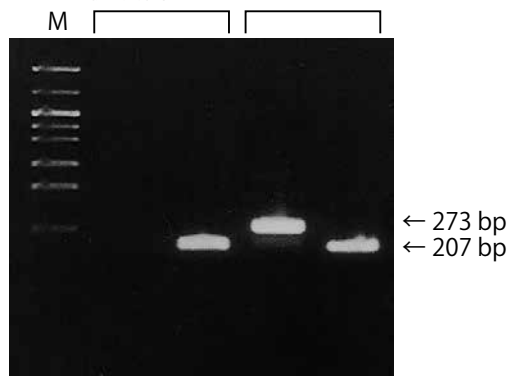


M : pHY Marker (100 ng)

Template	抽出 DNA 溶液	5 μ l
PCR 液量	50 μ l	
Polymerase	<i>TaKaRa Ex Taq</i>	
PCR 条件	94°C 30 sec.	} 35 cycles
	54°C 60 sec.	
	72°C 60 sec.	
	↓	
	72°C 5 min.	

B-3. p53 exon 5 遺伝子 (273 bp)、exon 6 遺伝子 (207 bp) の増幅

従来抽出法¹⁾ DEXPAT



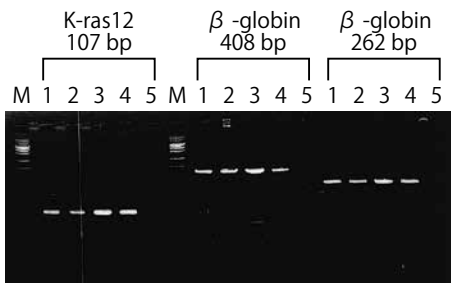
M : pHY Marker (100 ng)

< 1st PCR >		
Template	抽出 DNA 溶液	5 μ l
PCR 液量	50 μ l	
Polymerase	<i>TaKaRa Ex Taq</i>	
PCR 条件	94°C 1 min.	} 30 cycles
	60°C 1 min.	
	72°C 2 min.	
	↓	
	72°C 5 min.	

< 2nd PCR >		
Template	1st PCR 反応液	5 μ l
PCR 液量	50 μ l	
Polymerase	<i>TaKaRa Ex Taq</i>	
PCR 条件	94°C 30 sec.	} 25 cycles
	60°C 60 sec.	
	72°C 60 sec.	
	↓	
	72°C 5 min.	

C. 凍結切片からのPCR増幅

- < 検体 > ヒト扁桃腺パラフィン包埋切片
スライドガラス1枚 (25 mm × 12 mm、厚さ 5 μm)
ヒト扁桃腺凍結切片
スライドガラス1枚 (9 mm × 12 mm、厚さ 5 μm)
- < DNA 抽出 > あらかじめ 100°C に加温した DEXPAT 500 μl をスライドガラス
にのせ、よくこすりとり、チューブに移す。
↓
100°C 加熱 (10 分)
↓ 遠心 (12,000 rpm、10 分、4°C)
上清
- < PCR 増幅 > Target K-ras12 (107 bp)
β-globin (408 bp、262 bp)
Template DEXPAT 抽出液 1 μl または 2.5 μl
PCR 液量 25 μl
Polymerase TaKaRa Ex Taq
PCR 条件 94°C 60 sec.
↓
94°C 30 sec. } 35 cycles
55°C 60 sec. }
72°C 60 sec. }
↓
72°C 5 min.



3% Agarose、5 μl 泳動

D. スライド上のパラフィン切片からの部位限定抽出法

大腸癌パラフィン包埋切片を用い、同スライド上にて正常部並びに癌部をDEXPATで抽出後、マイクロサテライト解析法によるアリルの変化を調べた。

< 操作 >

1. スライドに固定した大腸癌切片 (4.5 × 1.5 cm) を、HE 染色した切片と比較し顕微鏡下で癌部と判断した部分 (2.3 × 0.9 cm) をスライドガラスの裏側よりマジックで囲む。
2. マイクロチューブに DEXPAT 500 μ l を取り、ヒートブロックで 100°C に温めておく。1 ml 用チップで DEXPAT を吸い取り、マークした癌部に少量のセチップの先で擦り、切片をスライドよりはがしゲルや切片を残らず回収する (正常部の組織を擦らない限り混ぜることはないので、特に正常部をマスクする必要はない)。同様に残りの正常部もスライドよりはがす。
3. 試料の入ったマイクロチューブをヒートブロックで 100°C、10 分間ボイルし、その後 4°C で 12,000 rpm、10 分間遠心分離を行う。上清を別のチューブに移し、これを PCR テンプレートとする。このときゲルや、境界面にある残渣を吸い取らないようにする。

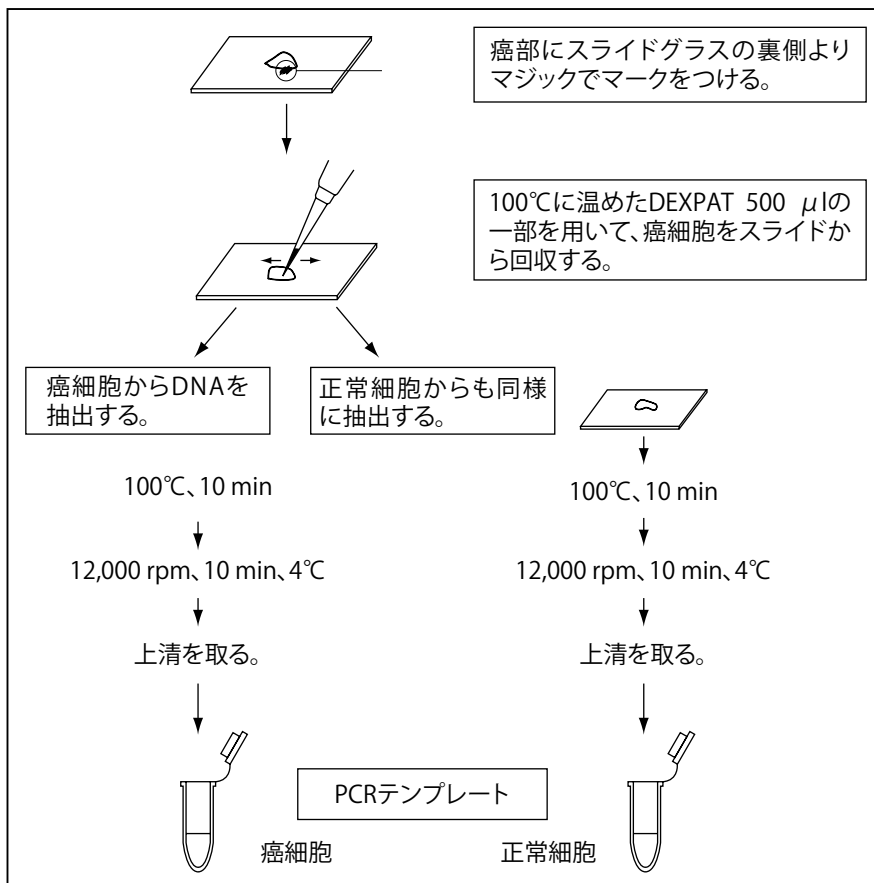


図3. スライド上のパラフィン切片からの部位限定抽出法操作フローチャート

< PCR 反応液 >

10 × <i>Ex Taq</i> Buffer	2.5 μl
dNTP Mixture	2.5 μl (250 μM each)
each primer	0.25 μl (final 10 pmol)
Template DNA	2.5 μl (DEXPAT 抽出液)
<i>TaKaRa Ex Taq</i>	0.125 μl (0.625 U/25 μl)
滅菌精製水	up to 25 μl

< PCR 条件 >

94°C	90 sec.	
↓		
94°C	30 sec.] 35 cycles
54°C	60 sec.	
72°C	60 sec.	
↓		
72°C	5 min.	

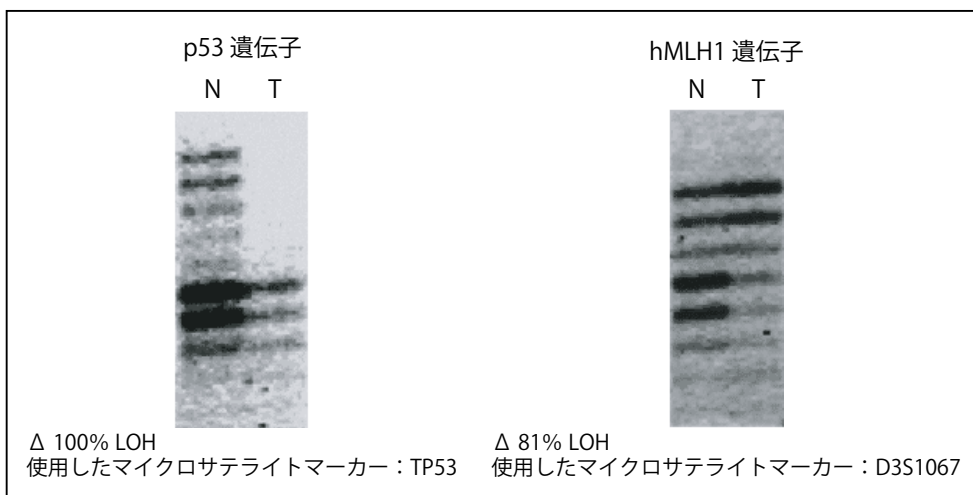


図 4. 部位限定抽出した DNA による LOH 解析 (N: 正常細胞、T: 腫瘍細胞)

< 結果 >

上記のマイクロサテライトマーカーを使用し、LOH (Loss of heterozygosity、ヘテロ接合性の消失) が検出された。

VIII. 参考文献

- 1) Goelz S E, *et al. BBRC.* (1985) **130**: No.1 118-126.
- 2) 佐藤雄一ら 病理と臨床 (別冊) (1990) **8**: 432-453.

IX. 関連製品

TaKaRa DEXPAT™ Easy (製品コード 9104)
NucleoSpin DNA FFPE XS (製品コード 740980.10/.50/.250)

X. 使用上の注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・*TaKaRa Ex Taq* はタカラバイオ株式会社の登録商標です。DEXPAT はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社