

製品コード 9104

研究用

TaKaRa

TaKaRa DEXPAT™ Easy

(DNA Extraction from Paraffin-embedded Tissue Easy)

説明書

v202204Da

TaKaRa DEXPAT Easy は、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片から PCR 用鋳型に適した DNA を短時間に抽出するための、簡易 DNA 抽出用試薬です。特殊界面活性剤と PCR 阻害物質吸着樹脂が最適濃度に混合されており、1.5 ml チューブに分注済みのため、そのまま使用できます。本チューブにパラフィン包埋組織切片を加え、100℃で加熱後 4℃で遠心分離を行い、さらに 5 分間水冷するだけの約 30 分の作業で PCR 用鋳型 DNA が得られます。また、熱処理後の冷却遠心処理により、吸着樹脂の上部にゲル状の層が形成され、DNA 水溶液と吸着樹脂が分離されるため、DNA 溶液回収時における吸着樹脂の吸引を防ぐことができ、吸着樹脂の PCR 反応液への持ち込みによる PCR 増幅阻害も低減されるようになりました。

非常に時間と労力を要するパラフィン切片からの DNA 抽出が、TaKaRa DEXPAT Easy を用いると、

1. 脱パラフィン不要
2. 全工程約 30 分で抽出
3. PCR 用鋳型グレードの DNA が調製可能 (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精度を高めることができる
6. DNA 水溶液と吸着樹脂が確実に分離されるため、DNA 水溶液の回収が容易

といった優れた特長で、迅速かつ簡便に行うことが可能です。

本試薬は、TaKaRa DEXPAT (製品コード 9091) の性能をそのまま保持しています。また、反応チューブに分注し、DNA 回収時に DNA 水溶液と吸着樹脂が分離されるように組成を改良したことで、さらに使いやすくなりました。

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 (50 回用)

TaKaRa DEXPAT Easy

500 μ l \times 50

II. 保存

4℃

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

17,000 $\times g^*1$ 程度の遠心が可能なものが望ましい。15,000 $\times g^*2$ 以上であれば利用できるが、17,000 $\times g$ での遠心分離に比べて、DNA 水溶液の回収量が減少する。

* 1 : 17,000 $\times g$: 半径 9 cm ローター使用の場合、約 13,500 rpm

* 2 : 15,000 $\times g$: 半径 9 cm ローター使用の場合、約 12,500 rpm

ご使用の遠心機の取扱説明書等で、回転数をご確認ください。

ヒートブロック (100℃)

マイクロチューブ (DNA 溶液回収用)

実験用手袋

IV. 操作

IV-1. パラフィン包埋組織から抽出する場合

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 TaKaRa DEXPAT Easy 入り 1.5 ml マイクロチューブに滅菌ピンセットで移す。
 - ・組織の大きさとしては、少なくとも 6 mm \times 6 mm 相当のものをご準備ください。
 - ・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 の分解を防ぐようにしてください。
 - ・試料の薄切に使用するマイクロトームの消毒には、ネオクリーナーなどの過酸化水素系消毒剤を使用し、さらに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を使用する場合は、上記と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してください。
2. マイクロチューブの蓋を閉め、100°C で 10 分間加熱する。加熱開始から約 5 分後に、試薬全体が混ざるように 2 ~ 3 回緩やかに転倒混和を行う。
 - ・ヒートブロックを使用すると便利です。
 - ・チューブは熱くなっていますので、火傷には十分注意してください。
3. 加熱後直ちに、あらかじめ 4°C 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、17,000 $\times g$ 、4°C で 10 分間遠心分離する。(図 1)
4. 遠心後のチューブを直ちに氷中で 5 分間静置する。
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、水層を分取する。(図 2) 分取していくと吸着樹脂の上部のゲル状の層が見えてくるので、ゲル状の層の上部にある水層部分を分取する。
 - ・分取した水層 (DNA 溶液) をそのまま PCR 反応の鋳型として使用することができます。
 - ・TaKaRa Ex Taq[®] など一般的な PCR 酵素を用いる場合、反応系への持ち込み量を PCR 反応液の 1/10 量 (50 μl PCR 反応系で 5 μl) 以下に設定してください。
 - ・阻害物質にある程度の耐性を示す PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase を用いることで PCR の反応性が向上する場合があります。PrimeSTAR GXL の場合も DNA 溶液の持ち込み量は PCR 反応液の 1/10 量以下に設定してください。
 - ・阻害物質に強い耐性を有するクルードサンプル用 PCR 酵素 MightyAmp[™] DNA Polymerase を用いる場合は、DNA 溶液の持ち込み量を反応液の 4/10 量 (50 μl 反応系で 20 μl) 程度まで増やしても良好に反応することを確認しています。

図 1

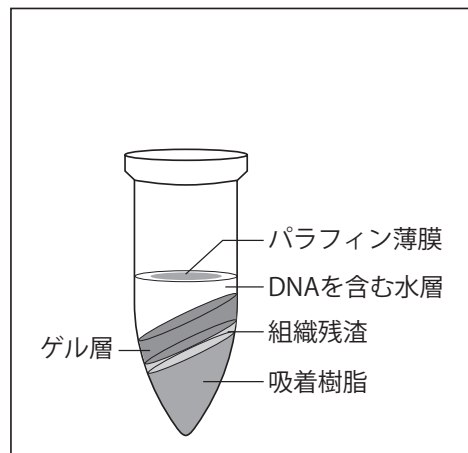
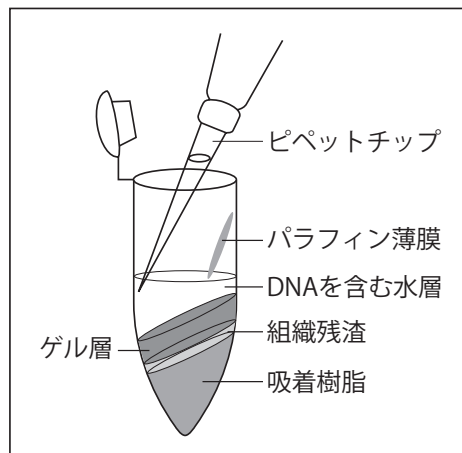


図 2



【フローチャート】

< TaKaRa DEXPAT Easy >

4～10 μm の厚さのパラフィン包埋組織切片 (1～3 枚)
を、TaKaRa DEXPAT Easy 入り 1.5 ml チューブに入れる



100°C 加熱 [10 分]



17,000 $\times g$ 遠心 [4°C、10 分]



氷中で静置 [5 分]



DNA 溶液を分取 (→ PCR 反応へ)

所要時間 30 分

< 従来抽出法 ¹⁾ >

(パラフィン包埋組織切片)
脱パラフィン



乾燥



除蛋白質 [1～2 日]



フェノール/クロロホルム抽出



エタノール沈殿



乾燥、溶解



DNA 溶液 (→ PCR 反応へ)

所要時間 2～3 日

IV-2. 限定部位から抽出する場合 (部位限定抽出法)

部位限定抽出法はスライドガラスに固定されたパラフィン包埋組織切片や、その切片の一部から DNA を回収するときに行う抽出法です。

1. パラフィン包埋組織切片スライドガラス上の回収したい組織部分をスライドガラスの裏側よりマジックで囲む。
2. TaKaRa DEXPAT Easy 入り 1.5 ml マイクロチューブを 100°C で 1 分加温する。
 - ・ ヒートブロックを使用すると便利です。
 - ・ チューブは熱くなっていますので、火傷には十分注意してください。
3. 1 ml 用ピペットチップで TaKaRa DEXPAT Easy を吸い取り、裏からマークしたパラフィン切片部分の上に少量のチップの先で擦り、切片をスライドよりはがし TaKaRa DEXPAT Easy や切片を残らず回収する (マークした部分以外の組織を擦らない限り混ざることはないので、特に回収したくない部分をマスクする必要はない。病変部位、正常部位など同じスライド上で分けて回収したい場合は、まず病変部位を回収し、その後、同様に正常部位も回収する)。
4. マイクロチューブの蓋を閉め、100°C で 10 分間加熱する。加熱開始から約 5 分後に、試薬全体が混ざるように 2～3 回緩やかに転倒混和を行う。
 - ・ チューブは熱くなっていますので、火傷には十分注意してください。
5. 加熱後直ちに、あらかじめ 4°C 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、17,000 $\times g$ 、4°C で 10 分間遠心分離する。

-
6. 遠心後のチューブを氷中で5分静置する。
 7. 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、水層を分取する (3 ページ図 2)。分取していくと吸着樹脂の上部のゲル状の層が見えてくるので、ゲル層の上部にある水層部分を分取する。
 - ・ 分取した水層 (DNA 溶液) をそのまま PCR 反応の鋳型として使用することができます。
 - ・ TaKaRa Ex Taq など一般的な PCR 酵素を用いる場合、反応系への持ち込み量を PCR 反応液の 1/10 量 (50 μ l PCR 反応系で 5 μ l) 以下に設定してください。
 - ・ 阻害物質にある程度の耐性を示す PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を用いることで PCR の反応性が向上する場合があります。PriemSTAR GXL の場合も DNA 溶液の持ち込み量は PCR 反応液の 1/10 量以下に設定してください。
 - ・ 阻害物質に強い耐性を有するクルードサンプル用 PCR 酵素 MightyAmp DNA Polymerase を用いる場合は、DNA 溶液の持ち込み量を反応液の 4/10 量 (50 μ l 反応系で 20 μ l) 程度まで増やしても良好に反応することを確認しています。

【フローチャート (限定部位からの抽出)】

回収したい組織部位にスライドの裏側よりマジックでマークをつける。



加熱した TaKaRa DEXPAT Easy を用いて、目的部位の切片をスライドから回収する。



100°C加熱 [10 分]



17,000 $\times g$ 遠心 [4°C、10 分]



氷中で静置 [5 分]



DNA 溶液を分散 (→ PCR 反応へ)

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。以下の一般的な組織固定、包埋の注意事項を参考にしてください。

1. 固定液は、10%ホルマリン液が推奨されています。浸透率は1時間に約1 mm とされています。小さな生検材料はそのまま浸漬してください。大きい摘出材料には切れ目を入れて固定液の浸透を高め、固定時間は3日以内をお勧めします。また、佐藤ら²⁾は AMeX 固定を推奨していますので参考にしてください。
2. 包埋は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 抽出できますか？

A3：スライドから削り落としたり、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、IV-2. 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 反応の阻害が起こりますので、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：TaKaRa DEXPAT Easy は精製キットではなく DNA 回収用キットであるため、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ますか？

A6：4℃で3ヶ月、-20℃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 μl 以上回収できます。

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検討ください。

- ・ 切片の量を減らす。
- ・ 遠心回転数を上げる (ご使用になっている遠心機の最高回転数にて回転)。
- ・ 加熱中に攪拌し、TaKaRa DEXPAT Easy とよくなじませる。

サンプルの数 (チューブの本数) 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 溶液を用いて *TaKaRa Ex Taq* で増幅を行ったが、目的バンドが確認できなかった。原因と対策は？

A9：1) 阻害物質の混在が考えられます。

→ PCR 酵素を阻害物質に強い MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 (製品コード R071A/B)、MightyAmp DNA Polymerase Ver.3 (製品コード R076A/B) や PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (製品コード R050A/B) に替えてお試しください。DNA 溶液の持ち込み量は、PrimeSTAR GXL では反応液の 1/10 量まで、MightyAmp では 4/10 量までです。

2) 発現量が低い可能性があります。あるいは固定・包埋処理により DNA がかなり切断を受けている可能性も考えられます。

→ PCR 酵素を MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 や Ver.3 に替え、DNA 溶液の使用量を増やしてお試しください。

TaKaRa Ex Taq など一般的な PCR 酵素の場合、反応系に持ち込むことができる DNA 溶液は反応液の 1/10 量までですが、クルードサンプル用 PCR 酵素 MightyAmp DNA Polymerase なら、持ち込み量を反応液の 4/10 量まで増やしても良好に反応します。

【ご参考】一般的な酵素で増幅を行いたい場合は、回収した DNA 溶液をエタノール沈殿により精製することで、阻害物質の影響を除き、反応系への持ち込み量を増やすことができます。

＜エタノール沈殿による精製および濃縮例＞

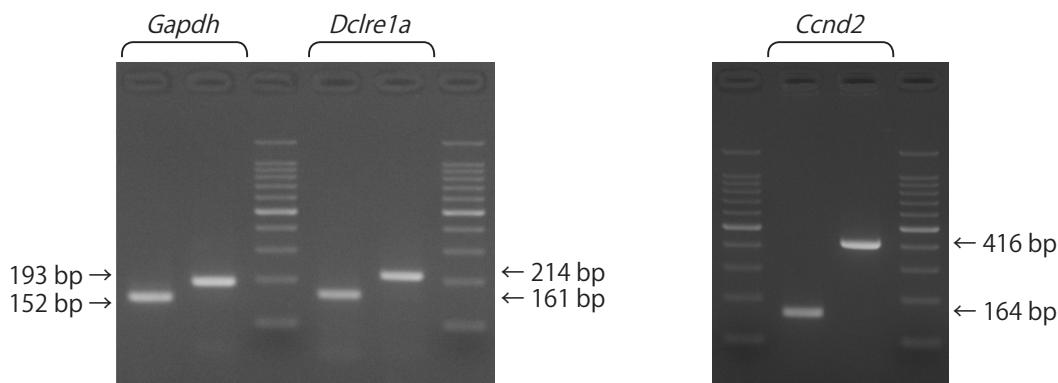
1. 回収した抽出 DNA 液の液量を見積もる。
2. 1. の液量の 1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムを加える。
3. 1. の 2.5 倍量のエタノール、または等量のイソプロパノールを加える。
4. 均一になるように転倒混和する。
5. -20°C で、30 分から 1 時間静置する。
6. 4°C 、 $12,000 \times g$ で、10 分から 15 分間遠心する。
7. 上清を除き、70%エタノールを 1 ml 加える。
8. 4°C 、 $12,000 \times g$ で、10 分から 15 分間遠心する。
9. 上清を捨て、風乾する。
10. 適当量の TE 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

VII. 実験例

TaKaRa DEXPAT Easy と TaKaRa Ex Taq との組合せによる PCR 増幅

A. ラットの精巣組織からの *Gapdh*、*Dclre1a*、*Ccnd2* の PCR 増幅

ラット精巣組織パラフィン包埋組織切片スライドガラスから TaKaRa DEXPAT Easy で抽出した DNA 溶液を用いて、TaKaRa Ex Taq で各遺伝子の各サイズ領域を PCR 増幅し、目的サイズの増幅を確認した。



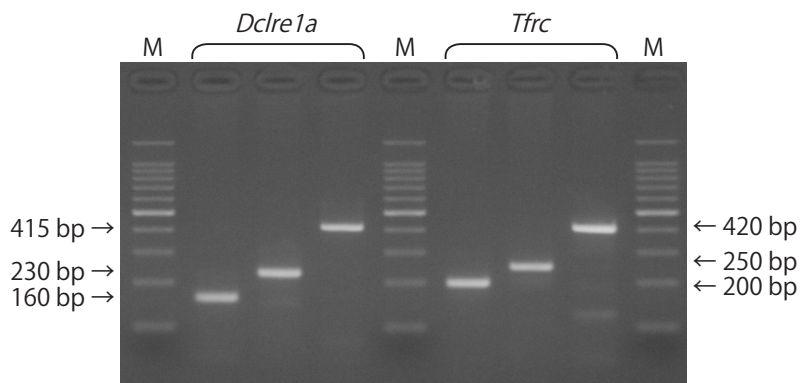
M : 100 bp DNA Ladder (400 ng)

Template : 抽出 DNA 溶液 2.5 μl
PCR 液量 : 25 μl
Polymerase : TaKaRa Ex Taq

PCR 条件 :
94 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec. }
54 $^{\circ}\text{C}$ 60 sec. } 35 cycles
72 $^{\circ}\text{C}$ 60 sec. }
↓
72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min.

B. マウスの足組織からの *Dclre1a*、*Tfrc* の PCR 増幅

マウス足組織パラフィン包埋組織切片スライドガラスから TaKaRa DEXPAT Easy で抽出した DNA 溶液を用いて、*Dclre1a* および *Tfrc* 遺伝子の各サイズ領域を PCR 増幅し、目的サイズの増幅を確認した。



M : 100 bp DNA Ladder (400 ng)

Template : 抽出 DNA 溶液 2.5 μ l

PCR 液量 : 25 μ l

Polymerase : TaKaRa Ex Taq

PCR 条件 :

94°C 30 sec.

54°C

72°C 60 sec.

↓
72°C 5 min.

35 cycles

C. 凍結切片からの PCR 増幅

<検体> マウス凍結切片 (1 日齢の全身)

< DNA 抽出 >

500 μ l の TaKaRa DEXPAT Easy をあらかじめ 100°C に加温する。

↓

DEXPAT の水層を一部スライドガラスにのせ、切片をよくこすりとり、チューブに移す。

↓

100°C 10 分加熱 (5 分経過時に混合)

↓

遠心 (17,000 $\times g$ 、4°C、10 分)

↓

氷冷、5 分

↓

水層を新しいチューブに回収する。

< PCR 増幅 >

Target : *Dclre1a*、*Tfrc*

Template : 抽出 DNA 溶液 2.5 μ l

PCR 液量 : 25 μ l

Polymerase : *TaKaRa Ex Taq*

PCR 条件 :

94°C 30 sec.

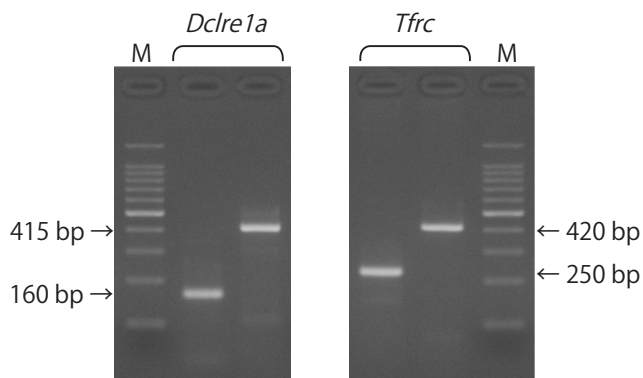
54°C 60 sec.

72°C 60 sec.

35 cycles

↓

72°C 5 min.



M : 100 bp DNA Ladder (400 ng)

※それぞれ目的サイズの増幅を確認した。

D. ラットおよびマウスのパラフィン包埋組織切片スライドガラスから抽出した DNA を用いたリアルタイム PCR

鋳型 DNA： ラットもしくはマウスの抽出 DNA 溶液を原液から 10^4 倍希釈まで 5 段階、10 倍ごとに希釈したものをそれぞれ 2.5 μ l 添加

Target： ラット *Gapdh*、マウス *Tfrc*

PCR 液量： 25 μ l

使用試薬： TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420A)

使用機器： Thermal Cycler Dice® Real Time System II (製品コード TP900：終売)

PCR 条件： 95°C 30 sec.

↓

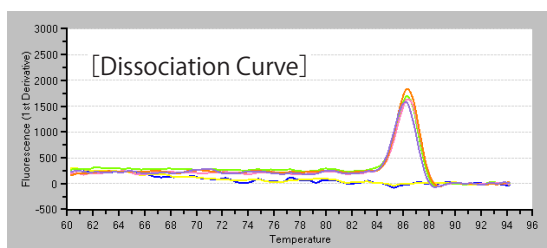
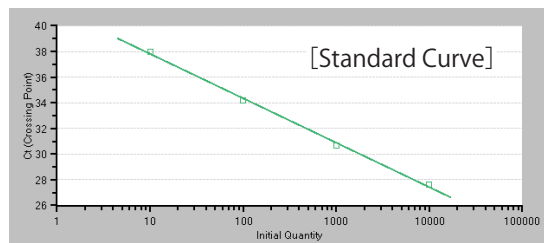
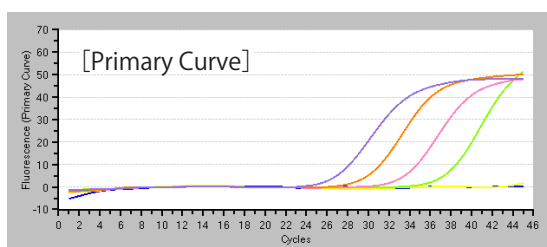
95°C 5 sec.] 35 cycles
60°C 30 sec.]

↓

Dissociation

D-1. ラットパラフィン包埋組織切片スライドガラスからの抽出 DNA を使用したリアルタイム PCR の結果

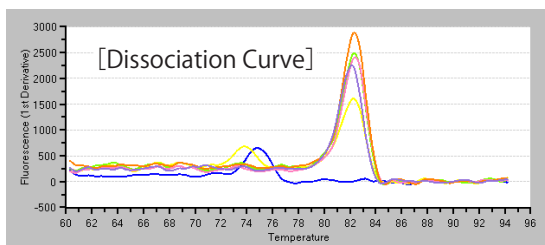
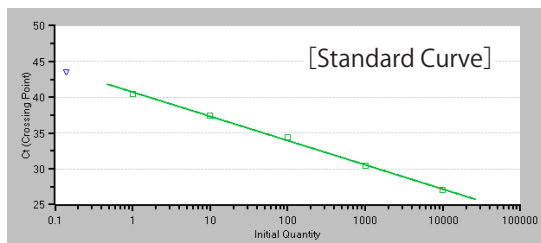
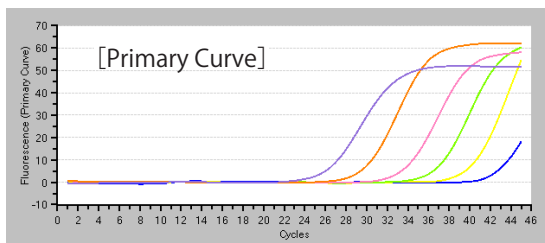
ターゲット： *Gapdh*



※原液から 10^3 倍希釈までの検出が可能であった。

D-2. マウスパラフィン包埋組織切片スライドガラスからの抽出 DNA を使用したリアルタイム PCR の結果

ターゲット：Tfrc



※原液から 10^4 倍希釈までの検出が可能であった。

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™ (製品コード 9091)
MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.2 (製品コード R071A/B)
MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 (製品コード R076A/B)
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (製品コード R050A/B)

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*、PrimeSTAR、Thermal Cycler Dice、TB Green はタカラバイオ株式会社の登録商標です。DEXPAT、MightyAmp、*Premix Ex Taq* 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 <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社