

## 法医学研究用

## DNA エキストラクターFMキット

## 〔はじめに〕

法医学的 DNA 鑑定は対象の個人を特定する鑑定法として威力を発揮しています。事件現場における鑑定の対象となる検体は、体毛や爪、血痕といった難溶解性のもや極く僅かな DNA を含有するものが多く、取得した DNA の少なさ、収率の悪さが鑑定の障害となる場合があります。本キットはこれらの諸問題を解決するべく、検体の迅速な溶解を成し遂げ、且つ、有害なフェノール/クロロホルムに代わる弊社独自の高収率な DNA 抽出法である「よう化ナトリウム法」を組み合わせ、法医学的材料に適した DNA 抽出法をキット化したものです。

## 〔対 象〕

ヒト体毛（約 1 cm × 2 本以内）、爪（約 0.5 mg 以内）、唾液斑、血痕

## 〔特 長〕

- (1) ヒト体毛を数十分で完全溶解します。
- (2) 有害な有機溶剤であるフェノールやクロロホルムを使用しません。
- (3) 固相化抽出法を行わないため、担体への吸着等による微量 DNA のロスが生じません。
- (4) 100%に近い回収率の「よう化ナトリウム法」による DNA 精製を行ないます。
- (5) 核酸増幅反応に適した DNA サンプルが取得できます。
- (6) 一連の操作に必要な試薬類を殆どセット化しています。

## 〔キットの内容〕 50回用

溶解液	9.5 ml
酵素活性化剤 (Enzyme-activated Reagent)	80 mg
酵素活性化剤溶液 (Reconstitution Solution for Enzyme-activated Reagent)	0.5 ml
タンパク質分解酵素 (Protease)	10 mg
よう化ナトリウム溶液	12.5 ml
洗浄液 (A)	50 ml
洗浄液 (B)	50 ml

## 〔保存条件〕

冷蔵保存 (2~10 )

## 〔キット以外に必要なもの〕

2-プロパノール  
滅菌済み蒸留水  
冷却式微量高速遠心機  
マイクロチューブ (1.5 ml 容)  
ピペット等、マイクロピペッター (1 ml ~ 10  $\mu$ l)

## 〔操作方法〕

## 〔試薬の調製、及び保存条件など〕

- ・保存中、「溶解液」の内容物が析出、沈澱することがあります。そのまま使用すると、溶解力が著しく低下しますので、析出物が認められないことを確認してからお使い下さい。もし、析出が認められた場合は、加温 (37~60 ) により、溶解してからお使い下さい。
- ・(酵素活性化剤溶液の調製): 「酵素活性化剤 (80 mg)」に 500  $\mu$ l の酵素活性化剤溶解液を添加して、溶解して下さい。

・(注) 溶解後の酵素活性化剤 (酵素活性化剤溶液) は、-20 で凍結保存して下さい。3ヶ月間は凍結融解を繰り返しても安定であることを確認しております。

- ・(タンパク質分解酵素溶液の調製): タンパク質分解酵素 (10 mg) は、550  $\mu$ l の滅菌済み蒸留水を添加して、溶解して下さい。  
爪を試料とする場合は、それを3倍希釈して使って下さい。その他の試料の場合は、そのままの濃度で使って下さい。

・(注) 溶解後のタンパク質分解酵素 (タンパク質分解酵素溶液) は、-20 で凍結保存して下さい。  
3ヶ月間は凍結融解を繰り返しても安定であることを確認しております。

〔操作方法〕

(体毛の場合)

[体毛のエタノール洗浄方法の例]

飛 マイクロチューブに約 1 ml のエタノールを添加して下さい。

飛 そこへ、切断前の体毛を入れて下さい。

飛 転倒混合した後、体毛を取りだし、ペーパータオルなどの上で、エタノールを充分除去して下さい。

(1) 体毛<sup>\*1)</sup> は、1 cm 程度に切断して下さい<sup>\*2)</sup>。

\*1) 使用前に、エタノール洗浄をお奨めします。

\*2) 下記溶解液に完全に浸る体毛の長さは 1 cm 以下を目安としております。メラニンが増幅反応を阻害する場合がありますので、なるべく 2 本以内 (合計 2 cm 以内) を試料としてお使い下さい。

(2) 切断した毛髪を、マイクロチューブ (1.5 ml/容) に入れ、190  $\mu$ l の溶解液、10  $\mu$ l の酵素活性化剤溶液、10  $\mu$ l のタンパク質分解酵素溶液を添加して混合して下さい<sup>\*3), \*4)</sup>。

\*3) これらの溶液は、使用直前に混合することもできます。その場合は、内容物の析出が生じますので、必ず、よく混合し、均一にしてから、検体に添加して下さい。

\*4) 添加した後、体毛が、溶液に完全に浸っていることを確認して下さい。

(3) 56 ~ 60 で、20~40分間、インキュベーションして下さい<sup>\*5)</sup>。

\*5) インキュベーション途中又は終了時、ボルテックス等で混合して、溶解を確実にして下さい。

(4) 10,000 ~ 15,000 rpm (9,600 ~ 21,600  $\times$  g) で、1~2分間、遠心して下さい<sup>\*6)</sup>。

\*6) フラッシュ遠心より、多少長めの遠心をして下さい。

(5) 不溶性沈澱を取らないように注意して、上清 200  $\mu$ l を別のマイクロ遠沈管に移して下さい<sup>\*7)</sup>。

\*7) メラニンは、増幅反応を阻害することがありますので、沈澱物の混入は避けて下さい。

(6) よう化ナトリウム溶液 250  $\mu$ l、及び 2-プロパノール 450  $\mu$ l を順次添加して、混合して下さい。

(7) 12,000 ~ 15,000 rpm (13,800 ~ 21,600  $\times$  g) で、10分間、4 で遠心して下さい。

(8) 沈澱を落とさないように注意しながら、上清を除いて下さい<sup>\*8)</sup>。

\*8) 試薬中に共沈剤としてグリコーゲンが入っていますので、沈澱は目視で確認できます。

(9) 洗浄液 (A) を 1 ml 添加して、沈澱が器壁から剥がれる程度に、充分混合して下さい<sup>\*9)</sup>。

\*9) ステップ (9)~(11) を省略し、洗浄液 (B) による 1 回洗浄でも、十分に増幅反応等へ適用できるサンプルが得られますが、安定したデータを得るためには、洗浄液 (A) と (B) による 2 回洗浄をお奨めします。

(10) 12,000 ~ 15,000 rpm( 13,800 ~ 21,600 × g ) で、5 ~ 10分間、4 で遠心して下さい。

(11) 沈澱を落とさないように注意しながら、上清を除いて下さい\*10)。

\*10) この工程では、沈澱が透明化し、確認しづらくなる場合があります。

(12) 洗浄液 (B) を 1 ml 添加して、沈澱が器壁から剥がれる程度に、充分混合して下さい。

(13) 12,000 ~ 15,000 rpm( 13,800 ~ 21,600 × g ) で、5 ~ 10分間、4 で遠心して下さい。

(14) 沈澱を落とさないように注意しながら、上清を除いて下さい。

(15) DNA 沈澱を、加温や減圧により、乾燥させて下さい。

(16) 適当量 (20 ~ 50  $\mu$ l 程度) の TE Buffer 等で溶解して下さい\*11)。

\*11) 検体により異なりますが、核酸増幅反応などを行う場合、試料の 1/2 ~ 1/10 が適用できます。又、毛髪の染色剤が増幅反応を阻害することがあります。

( 血痕、唾液斑の場合 )

(1) 血痕や唾液斑などの斑痕状のものは、5 mm × 5 mm 程度に切り取ってください。1 回に 5 mm × 5 mm の斑痕 2 枚ぐらいまで処理できます。

(2) 切り取った斑痕を、マイクロチューブ (1.5 ml 容) に入れ、190  $\mu$ l の溶解液、10  $\mu$ l の酵素活性化剤溶液、10  $\mu$ l のタンパク質分解酵素溶液を添加して、混合して下さい\*1)、\*2)。

\*1) これらの溶液は、使用直前に混合することもできます。その場合は、内容物の析出が生じますので、必ず、よく混合し、均一にしてから、添加して下さい。

\*2) 添加した後、斑痕が、溶液に完全に浸っていることを確認して下さい。

(3) 56 ~ 60 で、3 ~ 4時間、インキュベーションして下さい\*3)。

\*3) インキュベーションの途中又は終了時、ボルテックス等で混合して、溶解を確実にして下さい。

(4) 溶液を別のマイクロチューブに移して下さい (このとき出来るだけ溶液を回収して下さい)。

(5) 回収液の量を 2 に対して、よう化ナトリウム溶液 2.5、2-プロパノール 4.5 の比率 (2 : 2.5 : 4.5) で順次添加して、混合して下さい (例えば回収液が 200  $\mu$ l の時、よう化ナトリウム溶液 250  $\mu$ l、及び 2-プロパノール 450  $\mu$ l を添加します)。

(6) 12,000 ~ 15,000 rpm( 13,800 ~ 21,600 × g ) で、10分間、4 で遠心して下さい。

(7) 沈澱を落とさないように注意しながら、上清を除いて下さい\*4)。

\*4) 試薬中に共沈剤としてグリコーゲンが入っていますので、沈澱は目視で確認できます。

(8) 洗浄液 (A) を 1 ml 添加して、沈澱が器壁から剥がれる程度に、充分混合して下さい\*5)。

\*5) ステップ (8) ~ (10) を省略し、洗浄液 (B) による 1 回洗浄でも十分に増幅反応等へ適用できるサンプルが得られますが、安定したデータを得るためには、洗浄液 (A) と (B) による 2 回洗浄をお奨めします。

(9) 12,000 ~ 15,000 rpm( 13,800 ~ 21,600 × g ) で、5 ~ 10分間、4 で遠心して下さい。

(10) 沈澱を落とさないように注意しながら、上清を除いて下さい\*6)。

\*6) この工程では、沈澱が透明化し、確認しづらくなる場合があります。

(11) 洗浄液 (B) を 1 ml 添加して、沈澱が器壁から剥がれる程度に、充分混合して下さい。

(12) 12,000 ~ 15,000 rpm( 13,800 ~ 21,600 × g ) で、5 ~ 10分間、4 で遠心して下さい。

(13) 沈澱を落とさないように注意しながら、上清を除いて下さい。

(14) DNA 沈澱を、加温や減圧により、乾燥させて下さい。

(15) 適当量 (20 ~ 50  $\mu$ l) の TE Buffer 等で溶解して下さい。

(爪の場合)

(1) 約 0.5 mg 以下の爪を 0.5 mm × 1 mm 程度の大きさに切断して下さい\*1)。

\*1) 0.5 mg の爪は、約 1 mm 角の大きさです。爪の溶解度合いは、その大きさに大きく依存し、細かく切断するほど容易になりますので、それを 2 個以上に切断して下さい。

(2) 切断した爪を、マイクロチューブ (1.5 ml 容) に入れ、190  $\mu$ l の溶解液、10  $\mu$ l の酵素活性化剤溶液、10  $\mu$ l のタンパク質分解酵素溶液\*2) を添加して、混合して下さい\*3)。

\*2) [ 試薬の調製、及び保存条件など ] の項に記載したように、タンパク質分解酵素溶液は、他の試料の場合より 3 倍薄い濃度に希釈し、使用して下さい。

\*3) これらの溶液は、使用直前に混合することもできます。その場合は、内容物の析出が生じますので、必ず、よく混合し、均一にしてから、添加して下さい。

(3) 56 ~ 60 でインキュベーションして下さい。

(4) 4 時間おきに 10  $\mu$ l ずつタンパク質分解酵素溶液を 2 回追加し、その後、終夜でインキュベーションして下さい\*4)。

\*4) 仮に、1 mg 程度の爪を材料としたい場合は、タンパク質分解酵素溶液を、体毛等の場合より 4 倍薄い濃度にし、10  $\mu$ l ずつ 4 回に分けて 3 時間おきに添加して、且つ、終夜反応前に 5  $\mu$ l の酵素活性化剤溶液を追加すると、良好な結果が得られます。ただし、その場合も、爪は、上記の大きさ (0.5 mm × 1 mm 角程度) に細切する必要があります。

(5) インキュベーションの途中又は終了時、ボルテックス等で混合して、溶解を確実にして下さい。

(6) 10,000 ~ 15,000 rpm (9,600 ~ 21,600 × g) で、1 ~ 2 分間、遠心して下さい\*5)。

\*5) フラッシュ遠心より、多少長めの遠心をして下さい。

(7) 不溶性沈澱を取らないように注意して、上清 200  $\mu$ l を別のマイクロチューブに移して下さい。

(8) よう化ナトリウム溶液 250  $\mu$ l、及び 2-プロパノール 450  $\mu$ l を順次添加し、混合して下さい。

(9) 12,000 ~ 15,000 rpm (13,800 ~ 21,600 × g) で、10 分間、4 で遠心して下さい。

(10) 沈澱を落とさないように注意しながら、上清を除いて下さい\*6)。

\*6) 試薬中に共沈剤としてグリコーゲンが入っていますので、沈澱は目視で確認できます。

(11) 洗浄液 (A) を 1 ml 添加して、沈澱が器壁から剥がれる程度に、充分混合して下さい\*7)。

\*7) ステップ (11) ~ (13) を省略し、洗浄液 (B) による 1 回洗浄でも十分に増幅反応等へ適用できるサンプルが得られますが、安定したデータを得るためには、洗浄液 (A) と (B) による 2 回洗浄をお奨めします。

(12) 12,000 ~ 15,000 rpm (13,800 ~ 21,600 × g) で、5 ~ 10 分間、4 で遠心して下さい。

(13) 沈澱を落とさないように注意しながら、上清を除いて下さい\*8)。

\*8) この工程では、沈澱が透明化し、確認しづらくなることがあります。

(14) 洗浄液 (B) を 1 ml 添加して、沈澱が器壁から剥がれる程度に、充分混合して下さい。

(15) 12,000 ~ 15,000 rpm (13,800 ~ 21,600 × g) で、5 ~ 10 分間、4 で遠心して下さい。

(16) 沈澱を落とさないように注意しながら、上清を除いて下さい。

(17) DNA 沈澱を、加温や減圧により、乾燥させて下さい。

(18) 適当量 (20 ~ 50  $\mu$ l) の TE Buffer 等で溶解して下さい。

## ヒト体毛からの DNA 回収プロトコール

エタノール洗浄した体毛 (1 cm 以下)

←190  $\mu$ l 溶解液

←10  $\mu$ l 酵素活性化剤溶液

←10  $\mu$ l タンパク質分解酵素溶液

体毛が溶液に完全に浸っていることを確認

インキュベート, 56 ~ 60 , 20 ~ 40 分間

↻ 10,000 ~ 15,000 rpm (9,600  $\times$ g ~ 21,600  $\times$ g) 1 ~ 2 分間

上清 (200  $\mu$ l)

←250  $\mu$ l よう化ナトリウム

←450  $\mu$ l 2-プロパノール

↻ 12,000 ~ 15,000 rpm (13,800 ~ 21,600  $\times$ g) 10 分間, 4

沈殿

←1 ml 洗浄液 (A)

混合

↻ 12,000 ~ 15,000 rpm (13,800 ~ 21,600  $\times$ g) 5 ~ 10 分間, 4

沈殿

←1 ml 洗浄液 (B)

混合

↻ 12,000 ~ 15,000 rpm (13,800 ~ 21,600  $\times$ g) 5 ~ 10 分間, 4

沈殿

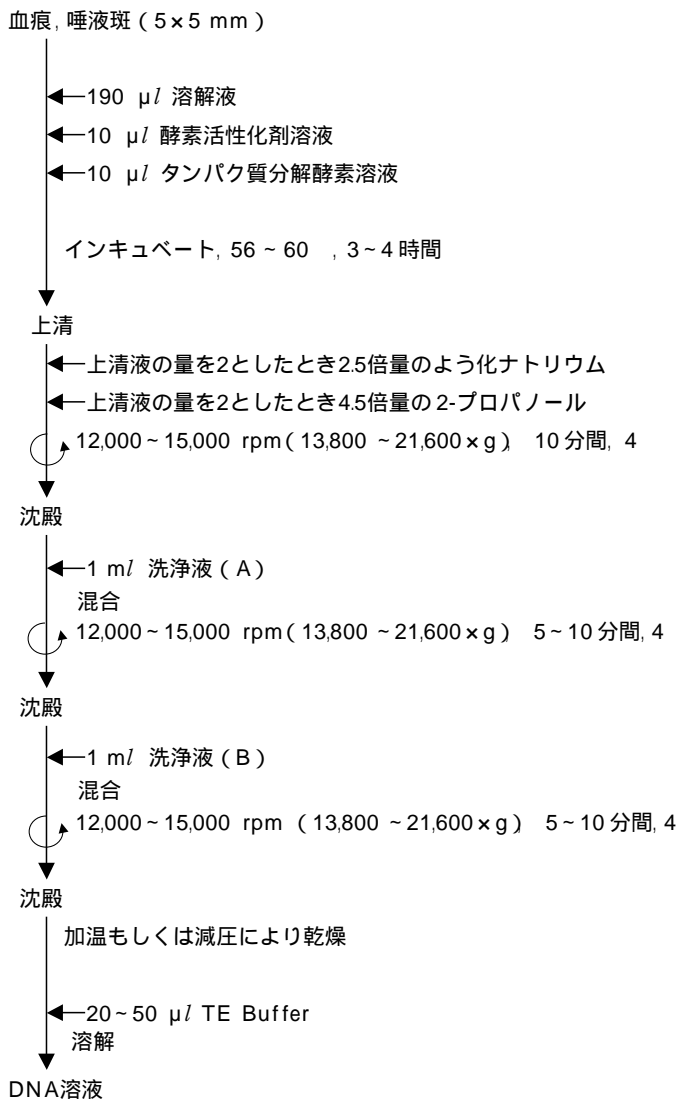
加温もしくは減圧により乾燥

←20 ~ 50  $\mu$ l TE Buffer

溶解

DNA 溶液

## 血痕からの DNA 回収プロトコール



## 爪からの DNA 回収プロトコール

爪 (約 0.5 mg 以下を 0.5 mm × 1 mm に切断)

← 190  $\mu$ l 溶解液

← 10  $\mu$ l 酵素活性化剤溶液

← 10  $\mu$ l タンパク質分解酵素溶液 (3倍希釈液)

4時間おきに 10  $\mu$ l のタンパク質分解酵素溶液を 2回追加  
インキュベート, 56 ~ 60 , 終夜

ボルテックスで完全溶解

↻ 10,000 ~ 15,000 rpm (9,600 ~ 21,600 × g) 1 ~ 2 分間

↓  
上清 (200  $\mu$ l)

← 250  $\mu$ l よう化ナトリウム

← 450  $\mu$ l 2-プロパノール

↻ 12,000 ~ 15,000 rpm (13,800 ~ 21,600 × g) 10 分間, 4

↓  
沈殿

← 1 ml 洗浄液 (A)

混合

↻ 12,000 ~ 15,000 rpm (13,800 ~ 21,600 × g) 5 ~ 10 分間, 4

↓  
沈殿

← 1 ml 洗浄液 (B)

混合

↻ 12,000 ~ 15,000 rpm (13,800 ~ 21,600 × g) 5 ~ 10 分間, 4

↓  
沈殿

加温もしくは減圧により乾燥

← 20 ~ 50  $\mu$ l TE Buffer

溶解

↓  
DNA溶液



**Wako**

製造発売元

**和光純薬工業株式会社**

大阪市中央区道修町3-1-2

電話(06)6203-3741(代表)

02X00.0開<sub>01</sub>K