

SOP 番号 GEN106

Ver.5

# 標準操作手順書

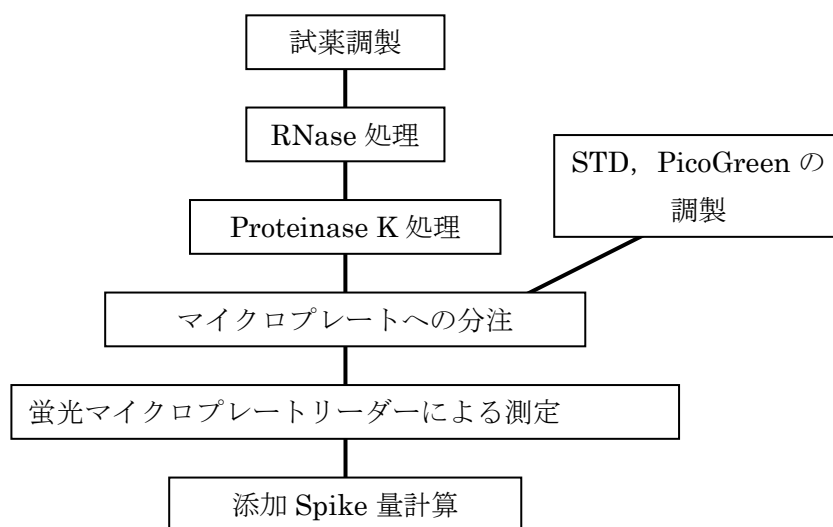
## DNA量の測定

承認 \_\_\_\_\_ 年 月 日

目 次

分類	項目	ページ
GEN106 Ver.5	DNA 量測定	
	作業手順の流れ図	1
	1 序	2
	2 試薬、器具	
	2-1 試薬	2
	2-2 器具	2,3
	2-3 機器	3
	3DNA 濃度の測定	3-13
	4 添加 SpikeCocktail 量の計算	14
	5DNA 測定プログラム	15-18
6 精度チェック	19	
7 その他	20	

作業手順の流れ図



## 1 序

本 SOP は PicoGreen (Molecular Probes, Inc, USA)を用いた DNA 量の定量法および Spike cocktail の添加量の計算方法について記載する。

## 2 試薬・器具

### 2-1 試薬

- 1) TE buffer (Invitrogen, cat.#.12090-015 等) 室温保存。  
使用期限:購入日から 1 年以内, 開封日から 3 ヶ月以内。  
使用状況により、開封時に DNase/RNase フリーコニカルチューブ (50 mL: TPP(BM), cat.# 91051, 100 mL: IWAKI, cat.# 2355-100 または同等品) に分注する。  
使用期限は、分注したコニカルチューブ初回使用時より 3 ヶ月とする。
- 2) Buffer RLT (QIAGEN) 室温保存。  
使用期限:購入日から 1 年以内, 2-Mercapto Ethanol (2-ME) 添加日から 1 ヶ月以内。
- 3) 2-Mercapto Ethanol (Sigma, cat.# M-6250)  
使用期限:購入日から 1 年
- 4) 10mg/mL RNase (Ribonuclease (DNase free) Glycerol Solution、ニッポンジーン、cat.#312-01931) -20℃保存。  
使用期限:購入日から 1 年以内。
- 5) PicoGreen dsDNA Quantitation Kit, special packaging (Invitrogen, cat.# P11496), -20℃遮光保存。  
使用期限:試薬容器に記載。凍結融解後の残液は廃棄する。
  - ・ PicoGreenR dsDNA reagent (10x100 µL solution in DMSO)
  - ・ 20X TE (25 mL of 200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH7.5)
  - ・ Lambda DNA standard (1 ml of 100 µL/mL in TE)注) PicoGreen は、2 プレート分が 1 本のチューブに分注されている。  
20X TE は廃棄して良い。
- 6) Proteinase K 溶液リコンビナント (F. Hoffmann-La Roche Ltd, cat.# 3115844 (25 mL)) 4℃保存。  
使用期限:試薬瓶に記載されている。

### 2-2 器具

- 1) Black 96 well plate (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、cat.#353241)
- 2) マイクロピペッター, チップ
- 3) RNase/DNase & Pyrogen フリー1.5 mL 容マイクロチューブ (BM-15、ビーエム機器等) 0.5 mL 容マイクロチューブ (Treff, cat.# 96.8185.9.03 等)

- 4) 50 mL 容ディスポーザブルチューブ (TRP 社, cat.# 91051 等)
- 5) 1.5 ml 容チューブマイクロチューブ (キアゲンの純正品は使用しないこと)

### 2-3 機器

- 1) 蛍光マイクロプレートリーダー (Fluoroskan, サーマバイオアナリシスジャパン株式会社)
- 2) ヒートブロック (TruTemp DNA heating base, Robbins Scientific, cat.# 1057-30-0)

## 3 DNA 濃度の測定 (肝組織の場合)

### 3-1 RNase/Proteinase K 処理

- 1) 0.5 mL 容マイクロチューブに通し番号を記入する。
- 2) 40  $\mu$ L の RLT (1% 2-ME 含有)\*1 を 0.5 mL 容マイクロチューブにそれぞれ分注する。  
\*1: SOP/GEN103 3 項参照
- 3) ホモジナイズしたサンプルを、ジルコニウムボールが入ったままボルテックスミックスする。ここから 10  $\mu$ L をとり、40  $\mu$ L の RLT (1% 2-ME 含有) が分注されているチューブに添加する (1/5 希釈)。ボルテックスミキサーを用いてよく混合後、軽くスピンドウンする。  
注 1) チップはサンプル毎に交換する。  
注 2) 組織が大きい場合は工程責任者に連絡して希釈率の指示を受ける。組織片が 80 mg 以上の場合は 20 倍、150 mg 以上の場合は 30 倍希釈を目安とする。  
注 3) 腎組織の場合、希釈率を 1/10 とする。(ホモジナイズ 10  $\mu$ L + RLT 90  $\mu$ L)  
注 4) ラット及びヒト培養肝細胞の溶解液を用いる場合は、希釈を行わないので(1)~(3)の工程は省略する。
- 4) 以後の作業は「トキシコ実験室 2」で行う。
- 5) 2 台のヒートブロックのスイッチを入れ、それぞれ 37°C と 55°C に設定する。
- 6) 2.5  $\mu$ g/mL RNase-TE 溶液を次表に従って 50 mL 容コニカルチューブ等に調製する。ボルテックスミキサーを用いてよく混合する。用時調製とし、残分は廃棄する。

試薬	26 サンプル分	50 サンプル分
10mg/mL RNase	6.5 $\mu$ L	12.5 $\mu$ L
TE Buffer	26 mL	50 mL

- 7) 1.5 mL 容マイクロチューブのフタに油性ペンで通し番号 (1~24 等) を記入する。
- 8) し番号を記入したマイクロチューブに 2.5  $\mu$ g/mL RNase-TE 溶液を 980  $\mu$ L ずつ分注する。この際のチップ交換は不要であるが、液切れが悪い場合は交換する。

- 9) 1/5 希釈したホモジナイズ液を速やかに 10  $\mu$ L ずつ(8)のマイクロチューブに添加する。  
注1) チップはサンプル毎に交換する。  
注2) 分注を速やかに行わないと、再沈殿して不均一になる可能性がある。
- 10) サンプル溶液をボルテックスミキサーにより混合後、スピンドウンする。ヒートブロックにマイクロチューブをセットし、37°Cで30分間インキュベートを行う。
- 11) 15 mg/mL Proteinase K 溶液を各マイクロチューブに 10  $\mu$ L ずつ添加する。ボルテックスミキサーにてよく混合し、スピンドウンする。  
注) チップはサンプル毎に交換する。
- 12) ヒートブロックにマイクロチューブをセットし、55°Cで3時間インキュベートを行う（この間に標準DNA溶液の希釈、PicoGreen-TE溶液の調製を行う。4-2項参照）
- 13) ヒートブロックよりマイクロチューブを取り出し、ボルテックスミキサーにてよく混合後、軽くスピンドウンする。マイクロチューブをラックに並べる。  
注) 溶液が不均一になる可能性があるため、長時間スピンドウンしない。
- 14) DNA濃度を測定する。

### 3-2 標準DNA溶液の調製

- 1) PicoGreen dsDNA Quantitation Kit 付属の Lambda DNA standard を融解する。
- 2) Lambda DNA を TE buffer(pH8.0)で50倍希釈する。  
通常は Lambda DNA 1 mL、TE buffer 49 mL。
- 3) 調製した Lambda DNA を 0.5 mL チューブへ 80  $\mu$ L ずつ分注する。
- 4) GeneQuant にて同じサンプルを連続して3回測定する。  
測定モード ; DNA  
希釈倍率 ; 1
- 5) 1.5 mL マイクロチューブに 600  $\mu$ L ずつ分注し、-30°Cで保存する。

3-3 標準 DNA 溶液の希釈

- 1) 1%RLT-TE を下表に従って調製し、ボルテックスミキサーで混合する。用時調製とし残分は廃棄する。

試薬	1 プレート分	2 プレート分
TE buffer(pH8.0)	2.5 mL	5 mL
1% 2-mercaptoethanol 添加 RLT (QIAGEN)*1	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L

\*1: SOP/GEN103 3 項参照

- 2) 下表に従って標準 DNA 溶液を希釈する (2 倍希釈系列)。希釈には 1.5 mL 容マイクロチューブを使用する。ボルテックスミキサーでよく混ぜること。

注) チップは希釈段階毎に交換する。

プレート 1 枚分 (括弧内は、プレート 2 枚分の量)

標準 DNA 溶液濃度 (ng/mL)	希釈方法			
1000	2 $\mu$ g/mL	500 $\mu$ L	+ 1%RLT-TE 溶液	500 $\mu$ L
500	1000 ng/mL	500 $\mu$ L	+ 1%RLT-TE 溶液	500 $\mu$ L
250	500 ng/mL	500 $\mu$ L	+ 1%RLT-TE 溶液	500 $\mu$ L
125	250 ng/mL	500 $\mu$ L	+ 1%RLT-TE 溶液	500 $\mu$ L
62.5	125 ng/mL	500 $\mu$ L	+ 1%RLT-TE 溶液	500 $\mu$ L
31.3	62.5 ng/mL	500 $\mu$ L	+ 1%RLT-TE 溶液	500 $\mu$ L
15.6	31.3 ng/mL	500 $\mu$ L	+ 1%RLT-TE 溶液	500 $\mu$ L
Blank	1%RLT-TE 溶液 500 $\mu$ L			

3-4 PicoGreen-TE 溶液の調製

- 1) PicoGreen 液を融解する。融解時はチューブをアルミ箔で覆って遮光する。
- 2) 下表に従って PicoGreen-TE 溶液を 50 mL 容ディスポーザブルチューブ(必ず 50 mL 容のチューブを使用)に調製し、ボルテックスミキサーにて十分に混合する。調製後、チューブをアルミ箔等で覆い遮光する。用時調製とし、残分は廃棄する。調製後 1 時間以上保存をする場合は 4°C で保存し、使用前に室温に戻す。
- 注) この操作は、室内の白色灯を消して黄色灯下で行う。

















試薬/用量	1 well	プレート 1 枚分 a) (88 well + デットボリューム 1 mL)	プレート 2 枚分 a) (176 well + デットボリューム 1 mL)
PicoGreen	0.5 $\mu$ L	49 $\mu$ L	93 $\mu$ L
TE Buffer	0.1 mL	9.8 mL	18.6 mL

a) : サンプル 24 (48 well) + スタンダード 16 サンプル (32 well) + ウォーミングアップ用 (8 well)

3-5 蛍光マイクロプレートリーダー (Fluoroskan) による測定


- 1) Fluoroskan 本体左側のスイッチを ON にする。(光源を安定させるため、測定開始の少なくとも 15 分前にはスイッチを入れる。)
- 2) コンピューターを起動する。
- 3) Black 96 well plate に各 100  $\mu$ L の DNA 標準溶液、サンプル、ブランク (1%RLT-TE) を表 1 に従って分注する。各サンプルは duplicate で測定を行う。サンプルを分注した Black 96well plate は、直ちに蛍光プレートリーダーにて測定する。
- 4) 分注後、サンプルの残りは、スパイク量の計算が終了するまで室温で保存する。

表 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Blank	サンプル 1	サンプル 9	サンプル 17	Blank						
B		STD 1000	サンプル 2	サンプル 10	サンプル 18	STD 1000						
C		STD 500	サンプル 3	サンプル 11	サンプル 19	STD 500						
D		STD 250	サンプル 4	サンプル 12	サンプル 20	STD 250						
E		STD 125	サンプル 5	サンプル 13	サンプル 21	STD 125						
F		STD 62.5	サンプル 6	サンプル 14	サンプル 22	STD 62.5						
G		STD 31.3	サンプル 7	サンプル 15	サンプル 23	STD 31.3						
H		STD 15.6	サンプル 8	サンプル 16	サンプル 24	STD 15.6						

STD : 標準 DNA 希釈液

 : ウォーミングアップとして PicoGreen のみ分注するウェル

 : サンプルをアプライしないウェル

- 5) デスクトップの「[ASCENT SOFTWARE for Fluoroskan Ascent](#)」のショートカット

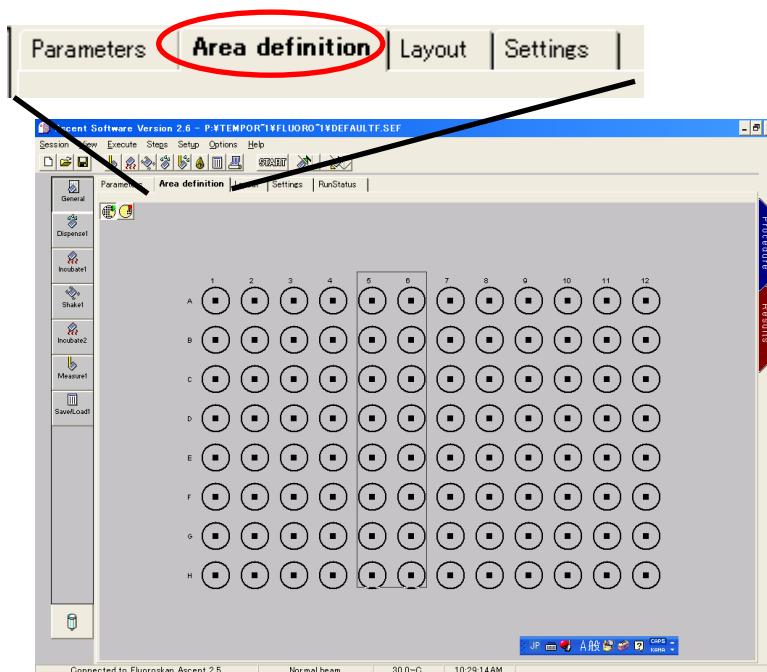


をクリックして、ASCENT SOFTWARE を起動する。

- 6) DNA 測定用プログラムを Session の「C: ¥ASC SW26 ¥TOXICO.SEF」から開く。(プログラムの内容は「6.DNA 測定プログラムの内容について」に示す)



- 7) 「Area definition」タブをクリックし、Area definition 画面を表示する。

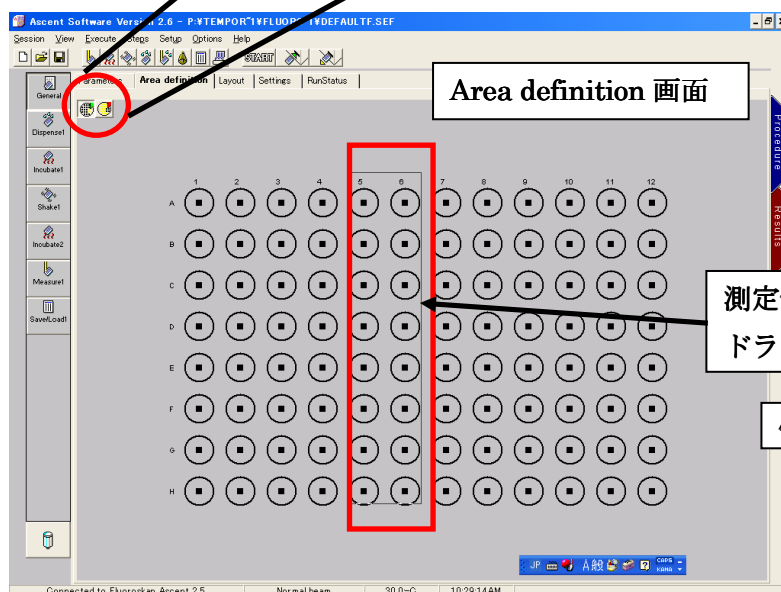


Area definition 画面

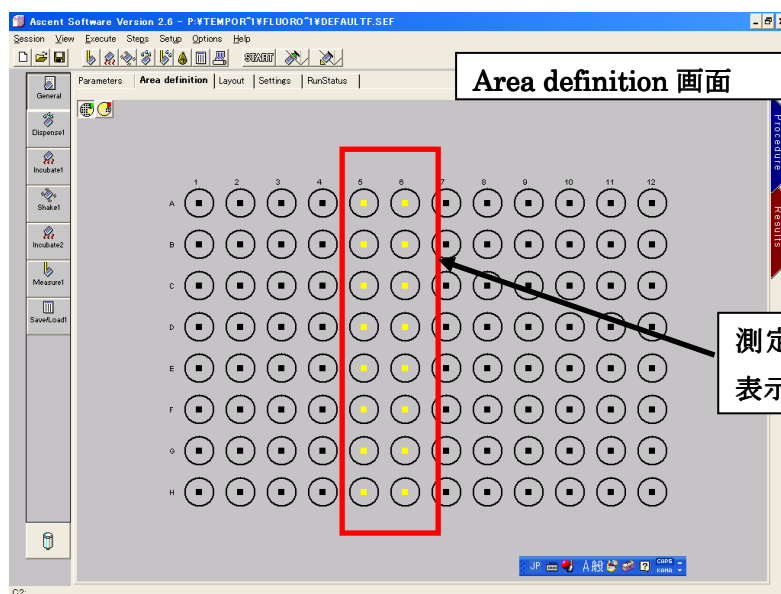
- 8) 次ページの A) のアイコンをクリックしてから、測定領域 (ウェル) をマウスでドラッグして黄色に反転させる。取り消す場合は、B) のアイコンをクリックしてから、取り消す領域をマウスでドラッグして黒色に反転させる。

A) 測定領域を指定する場合

B) 測定領域を取り消す場合



領域指定後




9) 下表に従って測定領域を指定する。

PicoGreen をウォーミングアップ用に分注するため、測定領域は 1 列目から指定する。

例) 24 サンプルを測定する場合

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Blank	サンプル 1	サンプル 9	サンプル 17	Blank						
B		STD 1000	サンプル 2	サンプル 10	サンプル 18	STD 1000						
C		STD 500	サンプル 3	サンプル 11	サンプル 19	STD 500						
D		STD 250	サンプル 4	サンプル 12	サンプル 20	STD 250						
E		STD 125	サンプル 5	サンプル 13	サンプル 21	STD 125						
F		STD 62.5	サンプル 6	サンプル 14	サンプル 22	STD 62.5						
G		STD 31.3	サンプル 7	サンプル 15	サンプル 23	STD 31.3						
H		STD 15.6	サンプル 8	サンプル 16	サンプル 24	STD 15.6						

 :測定領域

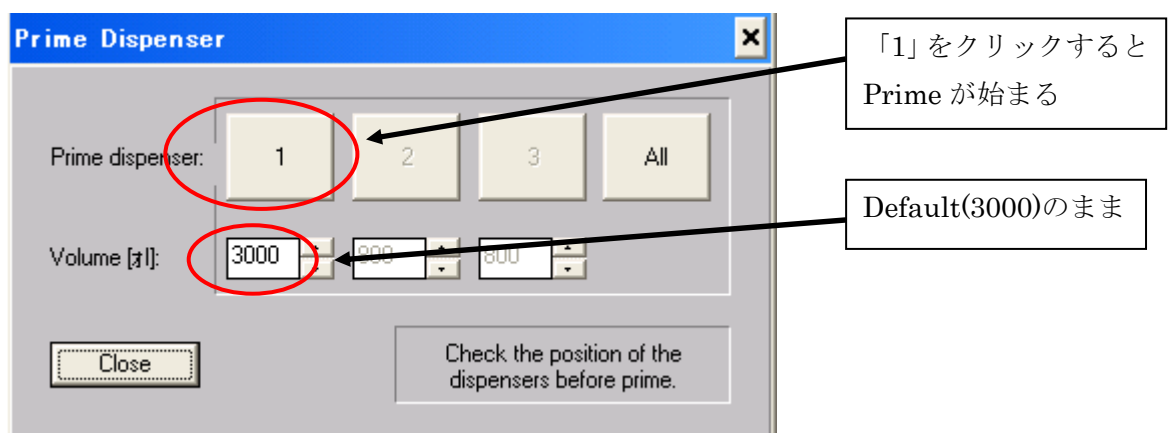
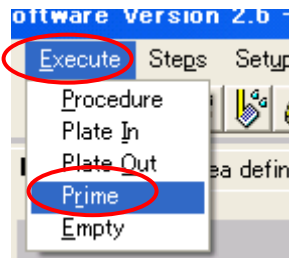
10) 以後の操作は黄色灯下で行う。

蛍光マイクロプレートリーダー本体のカバーを開けて 50 mL 容のディスポーザブルチューブに分注した PicoGreen-TE 溶液をセットする。ディスペンサーの吸引チューブおよび分注チューブを 50 mL 容のディスポーザブルチューブうちに入れる。吸引チューブを手で軽く押さえ、チューブの先端が完全に PicoGreen-TE 溶液に浸るようにする。チューブは必ず 50 mL 容のチューブを使用する。

注) Pico Green-TE 溶液を分注する容器は 50 mL 容のディスポーザブルチューブを使用(15 mL 容ディスポーザブルチューブの使用は不可)。

15 mL 容ディスポーザブルチューブの底径が吸引チューブのチップの径とほぼ同じため、15 mL 容ディスポーザブルチューブを使用するとチップがチューブ底面に隙間なく詰まり、Pico Green-TE 溶液が吸引されない場合がある。

- 11) 「Execute→prime」を選択する。Prime dispenser「1」を選択し、ディスペンサー内を PicoGreen-TE 液で満たす(分注チューブのチップの先から液が噴射されること、ディスペンサー内に空気が入っていないことを確認)。Volume は **Default (3000)**とする。

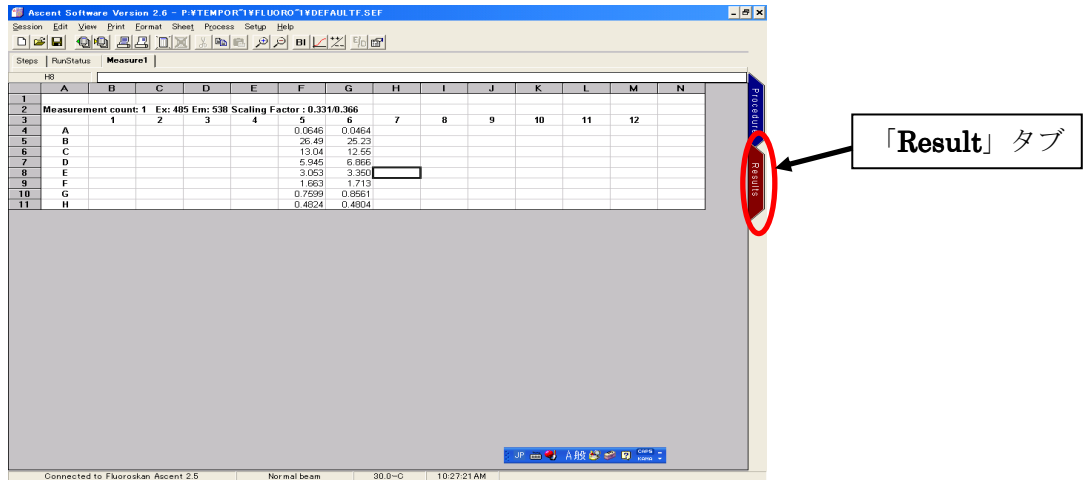


- 12) 分注チューブのチップをチップホルダーの M 位置に奥まできちんと差し込む。(チップ先端は曲がりやすいので先端をホルダーに当てないように注意する)
- 13) Black 96well plate を Fluoroskan のプレートホルダーにセットする。
- 14) ツールバーの「START」アイコンをクリックする。プレートホルダーがスライドし、プレートが本体へ収納される。

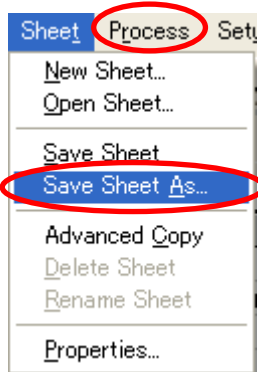


- 15) PicoGreen-TE 溶液の分注が開始される。分注が終わるまで吸引チューブを手で軽く押さえ、分注チューブの先が完全に溶液に浸かるようにする。
- 16) PicoGreen-TE 溶液の分注が終了(約 1 分)したら、蛍光マイクロプレートリーダーのカバーを開める。分注終了後、15 秒後に測定が開始される。

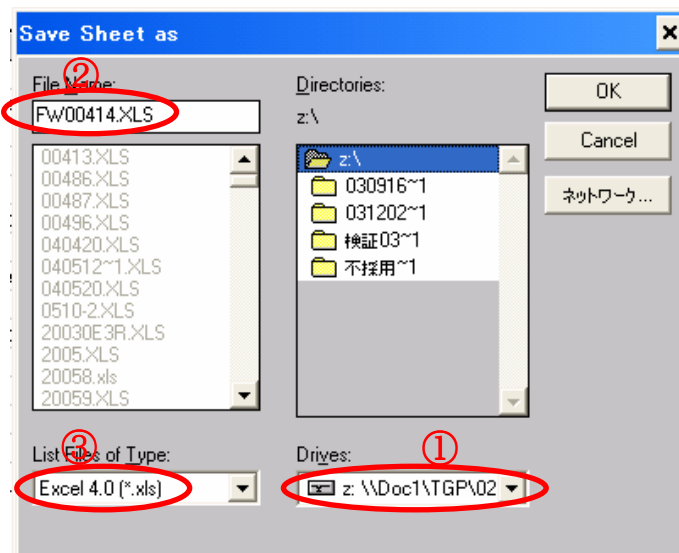
- 17) 測定終了後（測定所要時間：約3分）Resultが表示される。



- 18) 「Sheet→“Save Sheet As”」をクリックし「Save Sheet As 画面」を表示させる。

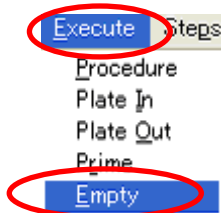


- 19) ①表示されている Drive を選択、②File Name に「FW+working ID」を入力、  
③List Files of Type は「Excel 4.0[\*.xls]」を選択する。

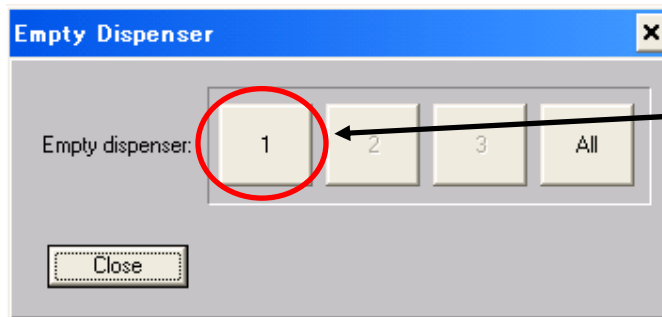


- 20) 「OK」をクリックして、ファイルを保存する。  
ファイル保存先: ¥Tgfs¥TGP2¥01-Research¥21-Experiment¥05-Fluoroscan data

- 21) Black 96 well plate をマイクロプレートリーダーから取り出す（測定が終わった時点で自動的に搬出されている）。
- 22) 分注チューブ及び吸引チューブを空のプラスチックビーカー又はディスプレイザブルチューブに入れる。「execute→empty」を選択する。



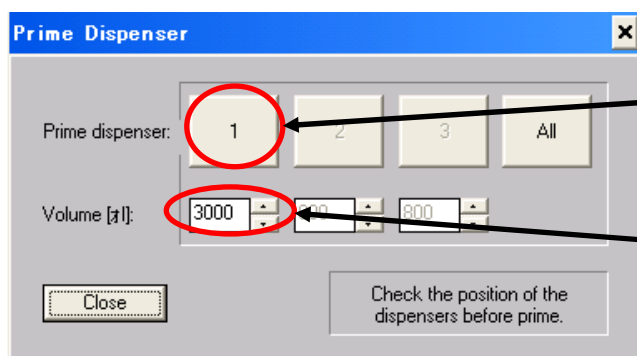
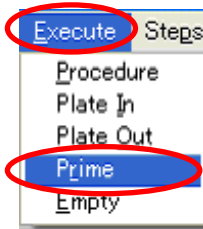
- 23) Empty dispenser: 「1」を選択し、ディスペンサー内の PicoGreen-TE 溶液を吸引チューブから排出する。



「1」をクリックすると「Empty」が始まる。

- 24) ミリ Q 水を満たした 50 mL のディスプレイザブルチューブをチューブホルダーにセットする。ディスペンサーの吸引チューブをミリ Q 水に、分注チューブを空のプラスチックビーカーに入れる。吸引チューブを手で軽く押さえ、完全にミリ Q 水に浸るようにする。

- 25) 「Execute→prime」を選択する。Prime dispenser 「1」を選択し、ディスペンサー内をミリ Q 水で洗浄する。



「1」をクリックすると Prime が始まる

Default(3000)のまま

- 26) 分注チューブ及び吸引チューブを空のプラスチックビーカーに入れる。  
「execute→empty」を選択する。
- 27) Empty dispenser 「1」を選択し、ディスペンサー内のミリ Q 水を吸引チューブから排出する。
- 28) Empty をもう一度行う（26 及び 27 の操作をもう一度繰り返す）。
- 29) “Plate in”のアイコン（下記に示す）をクリックして、プレートホルダーを本体に収納させる。



- 30) Fluoroskan 本体の電源を切る。
- 31) コンピューターの電源を切る。

#### 4 添加 Spike Cocktail 量の計算

- 1) 実験管理マクロあるいはエクセルシートを用いて、添加 Spike Cocktail 量を計算する。
- 2) Spike Cocktail 添加量の計算に関連する計算式を以下に記載する。

$$\text{Spike Cocktail添加量}(\mu\text{L}) = \frac{\text{Std. Sample重量}(\text{mg})}{\text{組織片重量}(\text{mg})} \times \text{ホモジナイズ液量}(\mu\text{L}) \times \text{DNA濃度}(\text{ng/mL}) \times \frac{1}{1000} \times \text{希釈倍率} \times \text{Spike Factor}$$

★Spike Factor

肝組織 ; 0.02 (Lot. 2 の場合)

腎組織 ; 0.01 (Lot. 2 の場合)

これは肝臓の場合、DNA 1 ng 当たり Spike Cocktail を 0.02  $\mu\text{L}$  を添加することを意味する。

注) Spike Cocktail の Lot 毎に Spike Factor が異なる。

★Std.Sample 重量(mg) :

ロボット抽出の場合

肝組織 ; 21 mg

腎組織 ; 25 mg

手抽出の場合

肝および腎組織 ; 10 mg

★ホモジナイズ液量:ホモジナイズの際に添加した RLT buffer の液量(通常は 400  $\mu\text{L}$ )

★希釈倍率 : RNase、Proteinase K 処理を行った際の希釈倍率

肝組織 ; 5 倍希釈

腎組織 ; 10 倍希釈

注) 腎組織片が 80 mg 以上の場合は 20 倍、150 mg 以上の場合は 30 倍希釈を目安とする



## 5 DNA 測定プログラム

### 5-1 DNA 測定プログラム

(1) Dispense1: Volume : 100  $\mu$ L Interval : 0 分 Step time : 0 分

(2) Incubate1: Incubation time : 15 秒 Temperature : 30°C

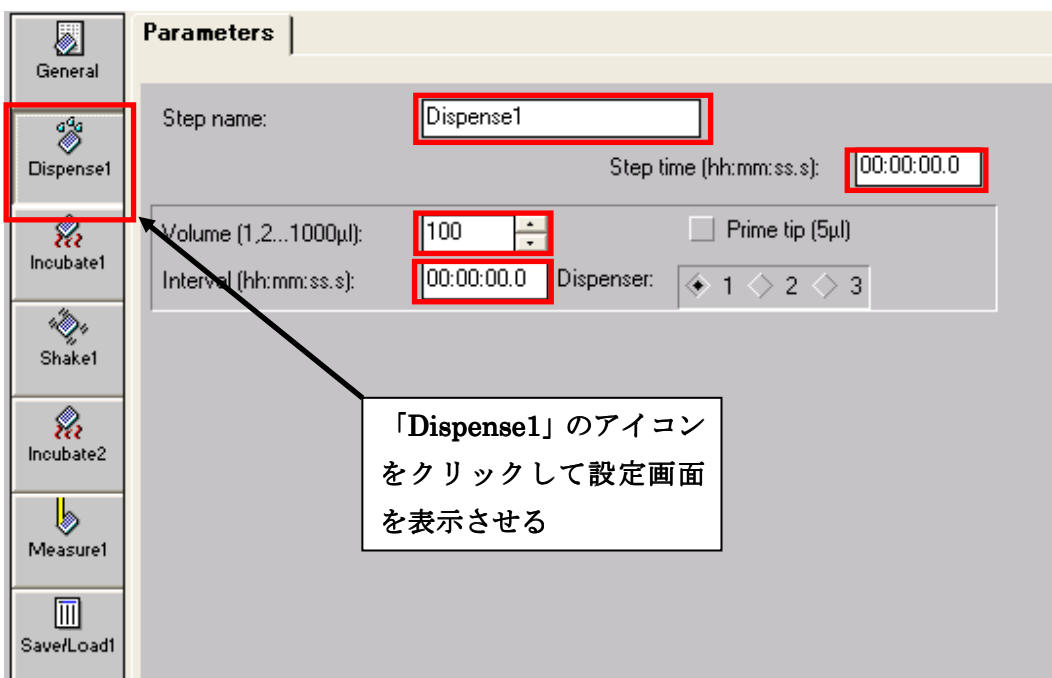
“Incubate1”はフルオロスキャン本体のカバーを閉めるための時間であり、測定そのものには関係しない。

(3) Shake1: Total time : 1 分 ON time : 10 秒 OFF time : 5 秒  
Diameter : 1mm Speed : 1200 rpm

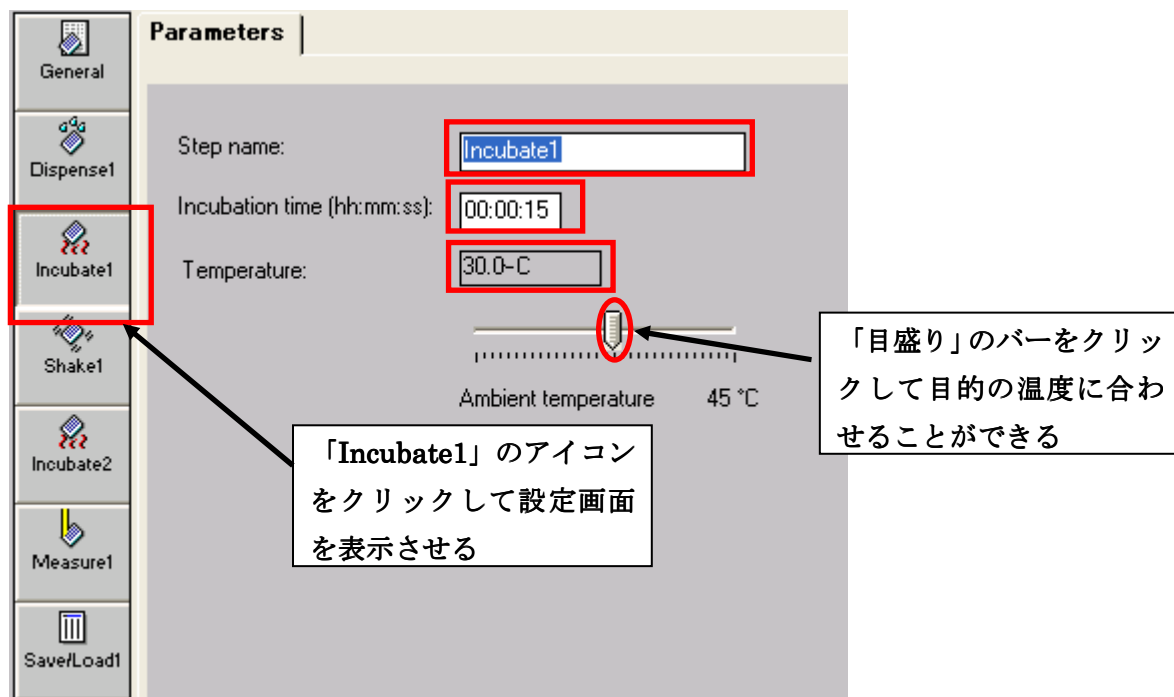
(4) Incubate2: Incubation time : 1 分 45 秒 温度 : 30°C

(5) Measure1: Step time : 0 分 Measurement type : single  
Integration time : 20 秒 Lag time : 0 秒  
Filter pair: Excitation : 485 nm Emission : 538 nm

## Dispense1



## Incubate1



### Shake1

Parameters

General

Dispense1

Incubate1

**Shake1**

Incubate2

Measure1

Save/Load1

Step name: Shake1

Total time (hh:mm:ss): 00:01:00

ON time (hh:mm:ss): 00:00:10

OFF time (hh:mm:ss): 00:00:05

Diameter (1...50mm): 1

Speed (60...1200 rpm): 1200

Background mode

「Shake1」のアイコンをクリックして設定画面を表示させる

### Incubate2

Parameters

General

Dispense1

Incubate1

Shake1

**Incubate2**

Measure1

Save/Load1

Step name: Incubate2

Incubation time (hh:mm:ss): 00:01:45

Temperature: 30.0-C

Ambient temperature 45 °C

## Measure1

**Parameters**

Step name:

Unit:  Step time (hh:mm:ss.s):

Measurement type:

Integration time (ms):

Lag time (hh:mm:ss.s):

Excitation:  Emission:  Pairs:

Filter pair:

Overwrite general step settings Beam:

## 2) Settings

**Parameters** | **Area definition** | **Layout** | **Settings**

Instrument settings:

Moving type:

Execute by 1...96 wells:

Dispense all and measure

Plate acceleration (1...10):

Settle delay (0...10000ms):

Dispenser speed settings:

Dispenser 1 (1...100):

Dispenser 2 (1...100):

Dispenser 3 (1...100):

## 6 精度チェック

蛍光プレートリーダーが均一に well を測定しているかを 4-MeU (4-Methylumelliferone) を用いてチェックする。

### 6-1 試薬

- 1) 4-Methylumelliferone (Sigma, cat.# M-1381、以下 4-MeU)
- 2) ジメチルスルホキシド (和光純薬工業、cat.# 043-07216 等)
- 3) DEPC-Treated water (Ambion, cat # 9920 等または同等品)  
室温保存  
使用期限：購入日から 1 年、開封後 3 ヶ月

### 6-2 調製方法

- 1) 100 mM 4-MeU の調製
  - ・ 4-MeU (分子量 176.2) をジメチルスルホキシド(DMSO)に 100 mM になるように溶解する。
  - ・ 例) 17.62 mg を 1 mL の DMSO で溶解する。  
注) 溶解液は、ストック溶液として  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存する。
- 2) 1 mM 4-MeU の調製
  - ・ 100 mM 4-MeU を DEPC-Treated water で 100 倍に希釈する。  
例) 100 mM 4-MeU 500  $\mu\text{L}$  + DEPC-Treated water 49.5 mL  
注) 1 mM 4-MeU は  $4^{\circ}\text{C}$ 、遮光で 3 ヶ月間使用可能。
- 3) 25  $\mu\text{M}$  4-MeU の調製 (Working Solution)
  - ・ 1 mM 4-MeU を DEPC-Treated water で 40 倍希釈する。  
例) 1 mM 4-MeU 250  $\mu\text{L}$  + DEPC-Treated water 9.75 mL  
注) 用時調製とし、残った溶液は廃棄する。

### 6-3 蛍光測定

- 1) 25  $\mu\text{M}$  4-MeU をプレートに等量ずつ(100~200  $\mu\text{L}$ )分注し、355/460 nm のフィルターで測定を行う。

## 7 その他

- 1) 本試験操作を行う際は、専用のラボスーツ（ブルー）に着替える。
- 2) 本試験操では RNase を取り扱うため、RNase の汚染を防ぐための決められたエリア内でのみ操作を行う。
- 3) RNase の混入を防ぐために、「トキシコ実験室 2」の部屋で使用したマスクや手袋は他の部屋に持ち込まない。
- 4) PicoGreen は変異原性物質と考えられるため取り扱いに気をつける。皮膚についたり、目に入ったりした場合は流水で 15 分間洗浄後、医師の診察を受ける。
- 5) PicoGreen が含まれる溶液は所定のタンク（活性炭入り）に捨てる。プレート内に分注された溶液については、実験室の排水系に廃棄し、十分に水を流す。

以下余白