

# 骨 (ヒト)

## ヒトの骨からの DNA 抽出

本プロトコルは関西医科大学法医学講座 橋谷田真樹先生のご協力のもと作成したものです。

抽出物	DNA
サンプル種	ヒトの骨 (第二次世界大戦頃のもの)
生物種	ヒト
サンプル量	100 mg (粉末)
使用キット	Bone DNA Extraction Kit (Cat.# DC6051), Maxwell® FSC DNA IQ™ Casework Kit (Cat.# AS1550)
解析	—

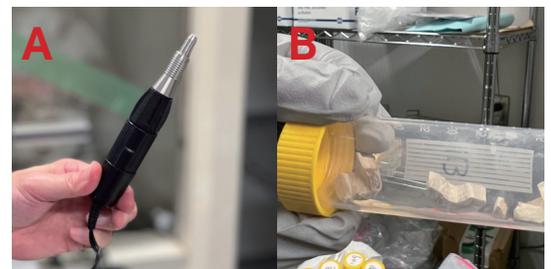
### 用意するもの

- 歯科用ドリル
- マルチビーズショッカー (安井器械)
- Bone DNA Extraction Kit (Cat.# DC6051)
- Maxwell® RSC Instrument (Cat.# AS4500)
- Maxwell® FSC DNA IQ™ Casework Kit (Cat.# AS1550)
- ボルテックスミキサー
- 1.5 ml 遠心チューブ
- 56°Cに設定されたヒートブロックシェーカー
- 高速遠心機

### プロトコール

#### 【検体の前処理】

1. 骨を洗剤で洗浄した後、歯科用ドリル (A) で 2 cm 程度の大きさに切断する (B)。



2. 骨片をマルチビーズショッカーで粉末化する (C)。



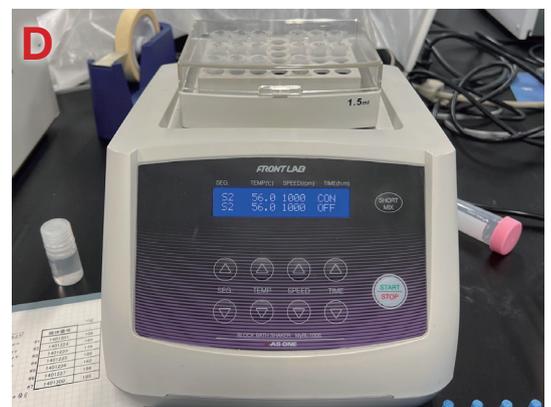
3. 粉末 100 mg を 1.5 ml 遠心チューブに移す。

#### 【脱灰処理】

1. 下記に従い、検体数 +2 本分の骨溶解カクテル A を調製する。

試薬	1 検体分量
Demineralization Buffer	400 μl
Proteinase K (PK) Solution	40 μl
1-Thioglycerol	10 μl

2. 骨溶解カクテル A を骨粉の入った遠心チューブに 400 μl ずつ加え、ボルテックスで 10 秒間で攪拌する。
3. ヒートブロックシェーカーで 2.5 時間、56°C で加熱しながら 1000 rpm で振盪する (D)。



## ヒトの骨からの DNA 抽出 (続き)

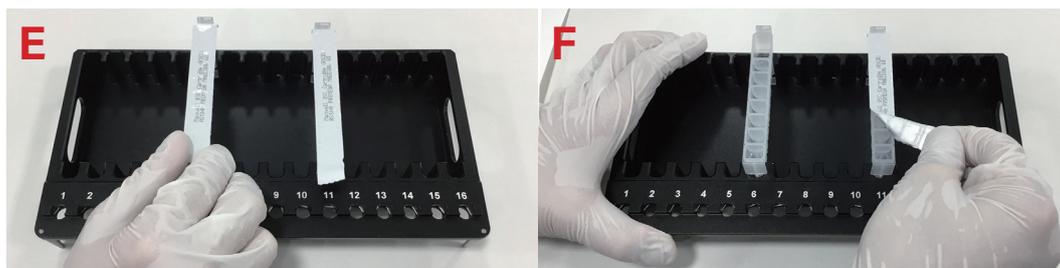
4. 検体をヒートブロックシェーカーから取り出しボルテックスで 10 秒攪拌する。
5. 13,000 x g で 5 分間遠心した後に上清を新しいチューブに移す。骨粉のペレットは廃棄してよい。
6. 下記に従い、検体数 +2 本分の骨溶解カクテル B を調製する。

試薬	1 検体分量
Lysis Buffer	990 $\mu$ l
1-Thioglycerol	10 $\mu$ l

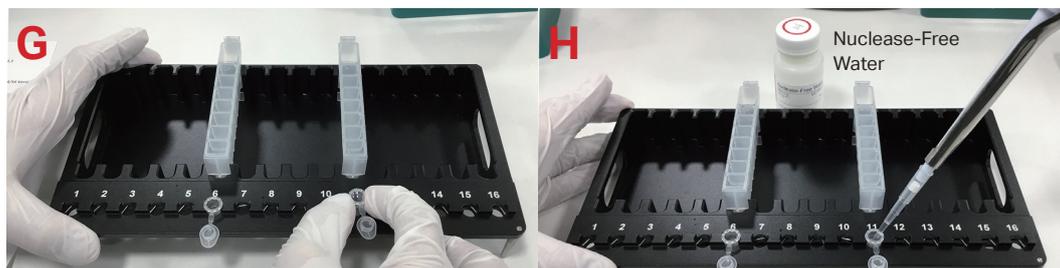
7. 骨溶解カクテル B を上清の入った遠心チューブに 800  $\mu$ l ずつ加え、ボルテックスで 10 秒間攪拌する。

### 【カートリッジの準備～ラン】

1. 検体数分の **カートリッジ** を Maxwell<sup>®</sup> RSC/CSC Deck Tray に立て、順にアルミシールを剥がす (**E, F**)。
  - ※ カートリッジの両端がカチッというまで、しっかりとセットする。

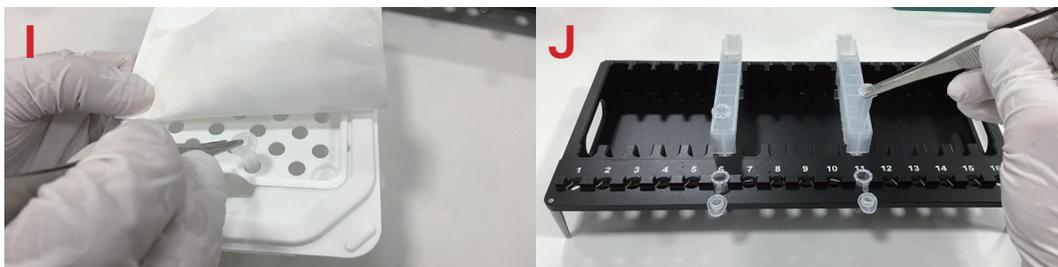


2. 同数の **Elution Tube** をセットし、**50  $\mu$ l** の **Nuclease-Free Water** を加える (**G, H**)。
  - ※ Elution Tube は下までグッと強く押し込んでください。
  - ※ Elution Tube のフタは、図のように手間側に向けてください。
  - ※ Elution Tube のフタは絶対に閉めないでください。

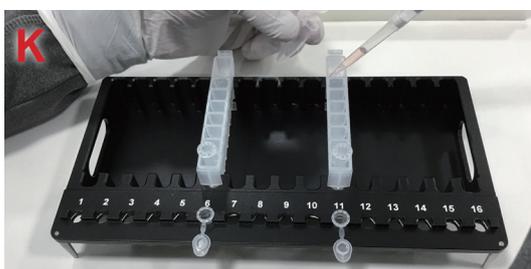


## ヒトの骨からの DNA 抽出 (続き)

3. カートリッジのウエル 8 に、プランジャーを置く (I, J)。



4. インキュベーション後のサンプルを全量 (約 1.1 ml) をカートリッジのウエル #1 に加え、3-4 回のピペッティングを行い、十分に攪拌する。(K)。



5. Maxwell® RSC に Maxwell® RSC/CSC Deck Tray をセットし、自動精製のランを開始する (L)。



### 結論

従来は EDTA を用いる脱灰処理に 2 日、スピнкаラムでの DNA 精製に半日程度の処理時間を要していたが、Bone DNA Extraction Kit と Maxwell® RSC を組み合わせることで脱灰処理を 2.5 時間、DNA 精製を 30 分に短縮でき、STR 解析が可能なレベルの DNA をその日のうちに得ることができた。精製後の DNA を用いた定量ならびに STR 解析の結果は従来法を用いた場合と同等であり、時短化に非常に有効であった。

また、汎用機器であるヒートブロックシェーカーと遠心機があれば処理でき、特別な機器を必要としないためコスト面での負担もなかった。