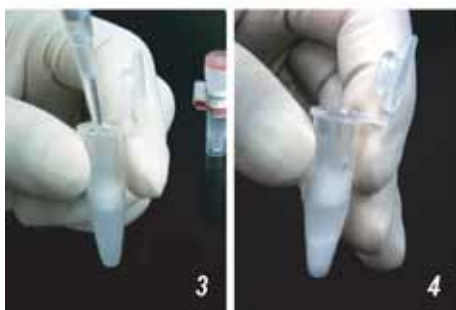


for Cell

このGeneral Protocolを使用する前に
Technical manualをよくお読みください。



1) 細胞懸濁溶液を1.5 ml遠心チューブに入れる。
200×g、5分間遠心分離後上澄みを除く。
PBS 500 μlで細胞を懸濁洗った後、200×g、
5分間遠心分離し上澄みを除去する(photo 1)。
* 細胞ペレットを一旦vortex (5秒間) する
と次の溶解操作が容易になります。



2) Lysis buffer 500 μlおよびProteinase K solution
10 μlを添加し、細胞ペレットが溶解するま
でピペッティングする(photo 2)。
細胞ペレットが完全に溶解したら65°Cで10
分間インキュベートする。
* ピペッティング開始直後、サンプル溶液
の粘度が上昇しますが、ピペッティング
操作を続けることで粘度は減少します。
高粘度状態がなくなるまでピペッティ
ング操作を続けてください(3~5分程度)。

3) 室温に2分間静置後、RNase solution 2 μlを
加える。直ちに10秒間vortexもしくは転倒
混和し、室温に2分間静置する。

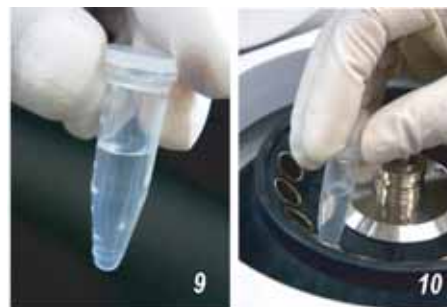


4) Precipitation solution I 100 μlを加え(photo 3)、
転倒混和もしくは5秒間vortexする。
* Precipitation solution Iを添加すると溶液
は白濁します。

5) Precipitation solution II 100 μlを加え(photo 4)、
転倒混和もしくは5秒間vortex後、室温に2分
間静置する。
* Precipitation solution IIを添加すると溶液
はさらに白濁します(photo 5)。

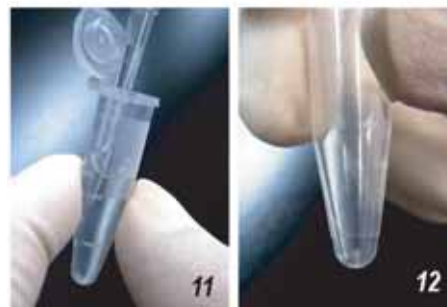


6) 13,000×g以上で5分間遠心分離し(photo 6)、
上澄みをピペットで新しい1.5 mlチューブ
に移す(photo 7)。
* 不溶物をピペットで吸引しないようご注
意ください。上澄みに沈殿物が混入して
いる場合、再度遠心操作を行って下さい。



7) 上澄みと同量のエタノールを加え(photo 8)、
転倒混和もしくは5秒間vortexする。
白色の沈殿(genomic DNA)が直ちに析出して
くる(photo 9)。

8) 2,500×gで2分間遠心分離し(photo 10)、上
澄みをピペットで除去する(photo 11)。
* 高回転、長時間の遠心は、DNAペレット
の溶解に長時間を要しますのでご注意下
さい。上澄みをピペットで除去する際に、
DNAペレットを吸い込まないように注意
ください。



9) DNAペレットに70% エタノールを1 ml加え
転倒混和もしくはvortex後、2,500×gで2分
間遠心分離し上澄みをピペットで除去する。
* 上澄みをピペットで除去する際に、DNAペ
レットを吸い込まないようにご注意下さい。

10) DNAペレットをTE buffer等に溶解する(photo 12)。

TROUBLE SHOOTING

- DNAが回収できない、または回収率が低い。**
 - ピペッティングおよびvortexを行い、細胞を完全に溶解してください。
 - 遠心操作後、使用するチューブによってはDNAペレットがチューブ壁面にしっかりと付着していない場合があります。上澄み除去の際に、DNAペレットを吸い込まないようにご注意ください。
- Lysis bufferに細胞が溶けにくい。**
 - 細胞ペレットが固まり溶解しづらい場合があります。Lysis bufferを添加する前に、vortexにより細胞ペレットを攪拌すると溶解しやすくなります。
 - 1x10⁷cells以上の細胞(~1x10⁸cells)から抽出する際は、試薬の添加量が異なります。Technical Manualをご参照ください。
- 取り出したDNAの純度が低い。**
 - Step 6で不溶物をピペットで吸いこまないようご注意ください。
 - Step 7で、加えるエタノールは上澄みと同量使用して下さい。過剰のエタノール使用により、RNA断片が混入することがあります。また、RNase solution添加後は、2分間室温で静置して下さい。
- 取り出したDNAが分解/切断されている。**
 - 新鮮な細胞を用いてください。
 - DNaseの混入を避けるため、オートクレーブ処理したbuffer(TE buffer等)をご使用ください。