

カードマニュアルは下記アドレスからダウンロードできます。

<http://www.dojindo.co.jp/manual/gk03.html>

Technical Manual

Get *pureDNA* Kit Cell, Tissue

200 samples

はじめに	P 2
キット内容	P 2
キット以外に必要な試薬・機器類	P 2
保存方法	P 2
注意事項	P 2
操作手順		
細胞 (1x10 ⁶ ~ 3x10 ⁶ cells)	P 2
細胞 (<1x10 ⁶ cells)	P 3
細胞 (3x10 ⁶ ~ 1x10 ⁷ cells)	P 3
細胞 (1x10 ⁷ ~ 1x10 ⁸ cells)	P 3
組織 (25 ~ 30 mg)	P 4
組織 (1 g)	P 4
組織 (0.5 ~ 1 cm Tail sample)	P 5
組織 (10 cm Tail sample)	P 5
トラブルシューティング	P 5
参考データ	P 5

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

はじめに

ゲノム解析法の一つであるサザンプロット法、ゲノムライブラリーの作製、および PCR には、高純度のゲノム DNA を簡便かつ短時間に抽出することが求められます。本キットは、細胞あるいは動物組織細胞を溶解する、溶解液から RNA およびタンパク質を除く、

エタノール沈殿により DNA を回収する、という 3 ステップで培養細胞、動物組織及び全血から高純度のゲノム DNA を簡便に抽出できます。本キットは、フェノール/クロロホルムを必要としません。抽出した DNA は制限酵素反応、PCR 反応等に使用できます。

キット内容

- Lysis buffer	110 ml x 1 本
- Proteinase K solution	1.05 ml x 2 本
- RNase solution	0.5 ml x 1 本
- Precipitation solution I	22 ml x 1 本
- Precipitation solution II	22 ml x 1 本

キット以外に必要な試薬・機器類

- エタノール、70%エタノール
- PBS buffer(細胞サンプル)
- 1.5 ml マイクロチューブ
- 15 ml, 50 ml 遠心チューブ
- マイクロピペット及びチップ
- 遠心分離器
- ボルテックスミキサー
- 恒温槽
- ホモジナイザー

保存方法

本キットは 冷蔵保存 (0~5) して下さい。

[注意]

- Lysis buffer は開封後室温で保存して下さい。
- Lysis buffer は 20 以下になると 2 層に分離あるいは沈殿を生じることがあります。沈殿を生じた場合は 40~50 で加温し完全に溶かしてからご使用下さい。また開封後は室温で保存し、使用前は転倒混和して下さい。

注意事項

- Precipitation solution I は、多少濁っている場合もありますが、DNA の抽出には影響ありません。
- Precipitation solution I および Precipitation solution II は、一旦開封するとボトルの口に白い結晶が析出する場合がありますが、DNA の抽出操作には影響ありません。そのままご使用下さい。
- 遠心チューブの種類により、10,000 xg 以上の遠心が不可能な場合は、遠心時間を延長しその遠心チューブの許容最高速度で遠心分離して下さい。

操作手順 (細胞サンプル)

サンプル量により抽出回数は異なりますので御注意下さい。

細胞 1x10⁶ ~ 3x10⁶ cells

Step 1 細胞懸濁液を 1.5 ml 遠心チューブに入れる。200Xg、5 分間遠心分離後上澄みを除く。PBS 500 μ l で細胞を懸濁洗った後、200Xg、5 分間遠心分離し上澄みを除去する。*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。*

Step 2 Lysis buffer 250 μ l および Proteinase K solution 10 μ l を添加し、細胞ペレットが溶解するまでピペティングする。細胞ペレットが完全に溶解したら 65 で 10 分間インキュベートする。*ピペティング開始直後、サンプル溶液の粘性が上昇しますが、ピペティング操作を続けることで粘性は減少します。高粘度状態がなくなるまでピペティング操作を続けてください(3~5 分程度)。*

Step 3 室温に 2 分間静置後、RNase solution 2 μ l 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。

Step 4 Precipitation solution I 50 μ l を加え、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。*

Step 5 Precipitation solution II 50 μ l を加え転倒混和もしくは 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更に白濁します。*

Step 6 13,000 xg 以上で 5 分間遠心分離し、上澄みをピペットで新しい 1.5 ml チューブに移す。*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は、再度遠心操作を行って下さい。*

Step 7 上澄みと同量のエタノールを加え転倒混和もしくは 5 秒間 vortex する。

Step 8 2,500 xg で 2 分間遠心分離し上澄みをピペットで除去する。*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ください。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ご注意ください。*

Step 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 xg で 2 分間遠心分離し上澄みをピペットで除去する。*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ください。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ご注意ください。*

Step 10 DNA ペレットを TE buffer (10 mmol/l Tris、1 mmol/l EDTA) 等に溶解する。

細胞 1×10^6 cells

「細胞 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ cells」における操作に従ってください。また、Step 7 のエタノールを加える前に glycogen 水溶液(20 mg/ml)2 μ l を加えることで、DNA ペレットを失うことなく回収できます。

細胞 $3 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells

- Step 1** 細胞懸濁溶液を 1.5 ml 遠心チューブに入れる。200Xg、5 分間遠心分離後上澄みを除く。PBS 500 μ l で細胞を懸濁洗いした後、200Xg、5 分間遠心分離し上澄みを除去する。
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。
- Step 2** Lysis buffer 500 μ l および Proteinase K solution 10 μ l を添加し、細胞ペレットが溶解するまでピペティングする。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。
ピペティング開始直後、サンプル溶液の粘性が上昇しますが、ピペティング操作を続けることで粘性は減少します。高粘度状態がなくなるまでピペティング操作を続けてください(3~5 分程度)。
- Step 3** 室温に 2 分間静置後、RNase solution 2 μ l 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。
- Step 4** Precipitation solution I 100 μ l を加え、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。
- Step 5** Precipitation solution II 100 μ l を加え転倒混和もしくは 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更に白濁します。
- Step 6** 13,000 \times g 以上で 5 分間遠心分離し、上澄みをピペットで新しい 1.5 ml チューブに移す。
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は、再度遠心操作を行って下さい。
- Step 7** 上澄みと同量のエタノールを加え転倒混和もしくは 5 秒間 vortex する。
- Step 8** 2,500 \times g で 2 分間遠心分離し上澄みをピペットで除去する。
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ください。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ご注意ください。
- Step 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 \times g で 2 分間遠心分離し上澄みをピペットで除去する。
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ください。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ご注意ください。
- Step 10** DNA ペレットを TE buffer (10 mmol/l Tris、1 mmol/l EDTA) 等に溶解する。

細胞 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ cells

- Step 1** 細胞懸濁溶液を 15 ml 遠心チューブに入れる。200Xg、5 分間遠心分離後上澄みを除く。PBS 5 ml で細胞を懸濁洗った後、200Xg、5 分間遠心分離し上澄みを除去する。
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。
- Step 2** Lysis buffer 5 ml および Proteinase K solution 40 μ l を添加し、細胞ペレットが溶解するまでピペティングする。除去する。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。
ピペティング開始直後、サンプル溶液の粘性が上昇しますが、ピペティング操作を続けることで粘性は減少します。高粘度状態がなくなるまでピペティング操作を続けてください(3~5 分程度)。
- Step 3** 室温に 2 分間静置後、RNase solution 20 μ l 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。
- Step 4** Precipitation solution I 1 ml を加え、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。
- Step 5** Precipitation solution II 1 ml を加え転倒混和もしくは 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更に白濁します。
- Step 6** 10,000 \times g 以上で 5 分間遠心分離し、上澄みをピペットで新しい 15 ml チューブに移す。
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は、再度遠心操作を行って下さい。
- Step 7** 上澄みと同量のエタノールを加え転倒混和もしくは 5 秒間 vortex する。
- Step 8** 2,500 \times g で 2 分間遠心分離し上澄みをピペットで除去する。
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ください。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ご注意ください。
- Step 9** DNA ペレットに 70% エタノール 5 ml 加え転倒混和もしくは vortex 後、2,500 \times g で 2 分間遠心分離し上澄みをピペットで除去する。
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ください。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ご注意ください。
- Step 10** DNA ペレットを TE buffer (10 mmol/l Tris、1 mmol/l EDTA) 等に溶解する。

操作手順 (組織サンプル)

サンプル量により抽出回数は異なりますので御注意下さい。

動物組織 25 ~ 30 mg

Step 1 動物組織 25 ~ 30 mg を 1.5 ml 遠心チューブに入れ、Lysis buffer 400 μ l および Proteinase K solution 10 μ l を添加する。

Step 2 55 °C で組織が完全に溶解するまでインキュベートする。30 分毎にサンプル溶液をピペティングもしくは vortex する。
完全に溶解するのに 2 ~ 3 時間要します。溶解時間は使用する組織により異なりますが、通常 2 ~ 3 時間です。30 分毎にサンプル溶液をピペティング、あるいは vortex することにより、溶解時間を短縮できます。

ホモジナイザーを使用する場合は、Step1 でサンプルに Lysis buffer 400 μ l および Proteinase K solution 10 μ l を添加後ホモジナイズし、65 °C、10 分間インキュベートする。

Step 3 サンプル溶液を室温に 2 分間静置後、RNase solution 2 μ l 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。

Step 4 Precipitation solution I 80 μ l を加え、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。

Step 5 Precipitation solution II 80 μ l を加え、転倒混和もしくは 5 秒間 vortex し、室温に 2 分間静置する。
Precipitation solution II を添加すると溶液は更に白濁します。

Step 6 13,000 \times g 以上で 5 分間遠心分離し上澄みをピペットで新しい 1.5 ml 遠心チューブに移す。
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際は、再度遠心操作を行って下さい。

Step 7 取り出した上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは 5 秒間 vortex する。

Step 8 2,500 \times g で 2 分間遠心分離し、上澄みをピペットで除去する。
高回転、長時間の遠心は、DNA ベレットの溶解に長時間を要しますのでご注意ください。上澄みをピペットで除去する際に、DNA ベレットを吸い込まないようにご注意ください。

Step 9 DNA ベレットに 70% エタノールを 1 ml 加え転倒混和もしくは 5 秒間 vortex 後、2,500 \times g で 2 分間遠心分離し上澄みをピペットで除去する。
高回転、長時間の遠心は、DNA ベレットの溶解に長時間を要しますのでご注意ください。上澄みをピペットで除去する際に、DNA ベレットを吸い込まないようにご注意ください。

Step10 DNA ベレットを、TE buffer (10 mmol/l Tris、1 mmol/l EDTA) 等に溶解する。

動物組織 1 g

Step 1 動物組織 1g を 50 ml 遠心チューブに入れ、Lysis buffer 15 ml および Proteinase K solution 250 μ l を添加する。

Step 2 ホモジナイザーでホモジナイズし、65 °C、10 分間インキュベートする。

Step 3 チューブを水浴で 2 分間冷やし、RNase solution 70 μ l 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。

Step 4 Precipitation solution I 3 ml を加え、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。

Step 5 Precipitation solution II 3 ml を加え、転倒混和もしくは 5 秒間 vortex し、室温に 2 分間静置する。
Precipitation solution II を添加すると溶液は更に白濁します。

Step 6 10,000 \times g 以上で 5 分間遠心分離し上澄みをピペットで新しい 50 ml 遠心チューブに移す。
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際は、再度遠心操作を行って下さい。

Step 7 取り出した上澄みと同量のエタノールを加え、転倒混和もしくは 5 秒間 vortex する。

Step 8 2,500 \times g で 2 分間遠心分離し、上澄みをピペットで除去する。
高回転、長時間の遠心は、DNA ベレットの溶解に長時間を要しますのでご注意ください。上澄みをピペットで除去する際に、DNA ベレットを吸い込まないようにご注意ください。

Step 9 DNA ベレットに 70% エタノールを 20 ml 加え転倒混和もしくは 5 秒間 vortex 後、2,500 \times g で 2 分間遠心分離し上澄みをピペットで除去する。
高回転、長時間の遠心は、DNA ベレットの溶解に長時間を要しますのでご注意ください。上澄みをピペットで除去する際に、DNA ベレットを吸い込まないようにご注意ください。

Step10 DNA ベレットを、TE buffer (10 mmol/l Tris、1 mmol/l EDTA) 等に溶解する。

マウス尾 0.5~1 cm

Step 1 マウス尾の場合、1 サンプルあたり 0.5~1 cm を切り 1.5 ml 遠心チューブに入れ、Lysis buffer 400 μ l および Proteinase K solution 10 μ l を添加する。

Step 2 55 で組織が完全に溶解するまでインキュベートする。30 分毎にサンプル溶液をピペティングもしくは vortex する。完全に溶解するのに 2~3 時間要します。骨あるいは毛髪は溶解しませんので、サンプル溶解後、滅菌したピンセット等で取り除いてください。

「動物組織 25~30 mg」の操作 Step 3 以下を行う。

マウス尾 10 cm

Step 1 ラット尾 10 cm を切り 50 ml 遠心チューブに入れ、Lysis buffer 15 ml および Proteinase K solution 250 μ l を添加する。

Step 2 55 で 4 時間、組織が完全に溶解するまでインキュベートする。30 分毎にサンプル溶液をピペティングもしくは vortex する。完全に溶解するのに 4 時間程度要します。骨あるいは毛髪は溶解しませんので、サンプル溶解後、滅菌したピンセット等で取り除くか、一旦遠心分離 (2500 xg, 2 分間、室温以下) し上澄みを新しい 50 ml 遠心チューブに移してください。

「動物組織 1 g」の操作 Step 3 以下を行う。

参考データ

表. DNA 回収量とその純度

Sample	回収量 (μ g)	A_{260}/A_{280}
HeLa cell (1×10^7 cells)	80-120 μ g	1.7-1.9
HeLa cell (1×10^8 cells)	1-1.5 mg	1.7-1.9
HL60 cell (1×10^7 cells)	40-60 μ g	1.7-1.9
HL60 cell (1×10^8 cells)	500-900 μ g	1.7-1.9
Mouse liver (25-30 mg)	40-100 μ g	1.7-1.9
Mouse brain (25-30 mg)	20-40 μ g	1.7-1.9
Mouse kidney (25-30 mg)	50-60 μ g	1.7-1.9
Mouse heart (25-30 mg)	20-25 μ g	1.7-1.9
Mouse tail (0.5-1 cm)	40-60 μ g	1.7-1.9
Rat liver (1 g)	2-2.5 mg	1.7-1.9
Rat brain (1 g)	600-800 μ g	1.7-1.9
Rat kidney (1 g)	1.8-2.3 mg	1.7-1.9
Rat heart (0.8-0.9 g)	600-800 μ g	1.7-1.9
Rat tail (10 cm)	2.5-3.5 mg	1.7-1.9

<開発元>

Dojindo Molecular Technologies, Inc.
30 W Gude Dr, Suite 260, Rockville, MD 20850
Phone : +1-301-987-2667
Fax : +1-301-987-2687
URL : <http://www.dojindo.com/>

トラブルシューティング

- 1) DNA が回収できない、または回収率が低い。
 - ピペティングおよび vortex を行い、試料を完全に溶解してください (トラブルシューティング 2) を参照)。
 - 遠心操作後、使用するチューブによっては DNA ベ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 ベレットを吸い込まないようにご注意ください。
- 2) Lysis buffer に細胞が溶けにくい。
 - 細胞ベ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 により細胞ベレットを攪拌すると溶解しやすくなります。
 - 1×10^7 cells 以上の細胞 ($\sim 1 \times 10^8$ cells) から抽出する際は、Lysis buffer、Proteinase K solution、RNase solution、Precipitation solution I および Precipitation solution II を各々 4 ml、20 μ l、20 μ l、800 μ l、800 μ l ご使用下さい。この時、15 ml もしくは 50 ml サイズの遠心チューブを用い、遠心分離はチューブの許容最高遠心速度で行ってください。
 - ピペティングにはチップの先端を 2~3 mm 切って径を大きくした広口径のものを用い、液の吸引 / 吐出をゆっくりと行ってください。
 - 組織サンプルをチューブに入れる際、あらかじめ細かく刻むか、もしくは Lysis buffer を加えた後ホモジナイザーを用いてホモジナイズしてください。
 - 加温溶解の際、数回サンプル溶液をピペティングもしくは vortex してください。
- 3) Step 6 の遠心分離後の沈殿物が固くバックされていない。
 - 試料を十分に溶かして Precipitation solution I を加えてください。
 - Precipitation solution I 及び II を加えた後、均一になるよう転倒混和または vortex を行ってください。
 - 13,000Xg 以上の遠心が困難な場合は、遠心時間を長くし沈殿物が完全にバックされるまで遠心して下さい。
- 4) 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。
- 5) 取り出した DNA が分解 / 切断されている。
 - 新鮮な試料を用いてください。
 - 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。

<委託製造元>

株式会社同仁化学研究所
Tel: 096-286-1515(代表) Fax: 096-286-1525
ドージン・イースト(東京)
Tel: 03-3578-9651(代表) Fax: 03-3578-9650