

for Tissue

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

- 1) 動物組織25~30 mgを秤量し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(photo 1)。
- 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(photo 3)。30分毎にサンプル溶液をピペティングもしくはvortexする。
* 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、またはvortexすることにより溶解時間を短縮できます。

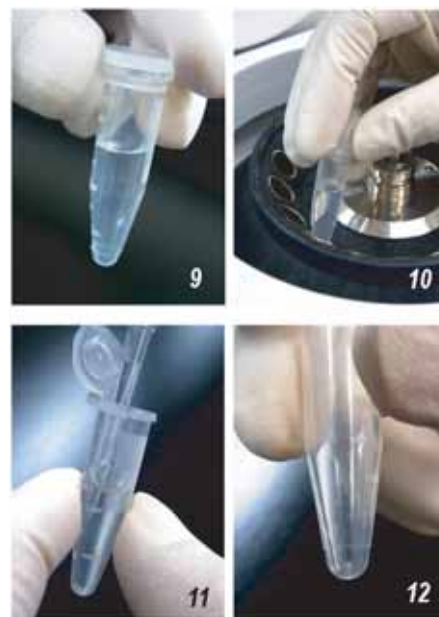
ホモジナイザーを使用する場合は、Step1でサンプルにLysis buffer 400 μ lおよびProteinase K solution 10 μ lを添加後ホモジナイズし(photo 2)、65°C、10分間インキュベートする(photo 3)。

- 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(photo 4)。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 80 μ lを加え(photo 5)、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 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さらに白濁します(photo 6)。

- 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(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際は、再度遠心操作を行ってください。



- 7) 取り出した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 \times 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。
- 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。
* 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。
- 10) DNAペレットを、TE buffer等に溶解する(photo 12)。

TROUBLE SHOOTING

- 1) DNAが回収できない、または回収率が低い。
 - ・ Step 2で組織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ご注意ください。
- 2) Step 2で組織が溶解しにくい
 - ・ 組織をチューブに入れる前に細かく切り刻んで下さい。
 - ・ インキュベーション中、30分毎にvortexあるいはピペティングを行ってください。
- 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 soln. I, II添加後、均一になるよう転倒混和(vortex)を行ってください。
 - ・ 13,000 \times g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。
- 5) 取り出したDNAが分解/切断されている。
 - ・ 新鮮な組織を用いてください。
 - ・ DNaseの混入を避けるため、autoclave処理したbuffer(TE buffer等)をご使用ください。