

ハンドブック

DNA 組織キット(スピン法)  
QuickGene SP kit DNA tissue  
(SP-DT)

---

## Contents

1. はじめに.....	4
2. キット内容物と保存条件.....	4
2 - 1. キット内容物.....	4
2 - 2. 保存条件.....	4
3. キット以外にご準備いただくもの.....	6
4. 取扱上の安全注意事項.....	6
5. 使用上の注意事項.....	7
6. 品質管理.....	9
7. 製品説明.....	9
8. プロトコール.....	10
8 - 1. 試薬の準備.....	10
8 - 2. 分離フローおよびプロトコール詳細.....	10
9. トラブルシューティング.....	20
10. オーダーリング・インフォメーション.....	25
付録 1 QuickGene SP kit DNA tissueデータ例.....	26

### ご注意

本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。  
診断および臨床用試薬として使用しないでください。

---

# 1. はじめに

薄さ 100  $\mu\text{m}$  以下の多孔質フィルターを用い、スピン法による核酸分離システムを実現しました。

このキットの特徴は以下のとおりです。

- このキットをご使用いただくことにより、簡単に 5 mg 動物組織からゲノム DNA を分離することができます。
- ライセート調製から約 30 分で分離操作が完了します(8 サンプルを処理した場合)。
- タンパク質やカオトロピック塩を含まない、高純度のゲノム DNA が得られます。得られた高品質のゲノム DNA は PCR、制限酵素処理、サザンブロットリングなどのアプリケーションに適しています。

このキットをご使用になる際は、本ハンドブックをよくお読みください。

## 2. キット内容物と保存条件

### 2-1. キット内容物

以下の内容物が入っていますので確認してください。

キットには 96 処理分のゲノム DNA 分離用試薬が含まれています。

<input type="checkbox"/> Proteinase K	EDT	2.5 ml
<input type="checkbox"/> Tissue Lysis Buffer	MDT	25 ml
<input type="checkbox"/> Lysis Buffer	LDT	30 ml
<input type="checkbox"/> Wash Buffer	WDT	125 ml
<input type="checkbox"/> Elution Buffer	CDT	100 ml
<input type="checkbox"/> Cartridges(カートリッジ)	CAS	96 個
<input type="checkbox"/> Waste Tubes(廃液容器)	WTS	192 個

### 2-2. 保存条件

指定の温度(15~28°C)で保存してください。有効期限は外箱に表示しています。より安定に保つため EDT は開梱後、冷蔵(2~8°C)で保存することをお勧めします。

### 3. キット以外にご準備いただくもの

#### ①試薬

- 特級エタノール(>99%) (ライセート調製時および WDT の調製に使用)

※必要に応じて用意していただく試薬

- RNase A

[推奨品]

- Ribonuclease A 

{	SIGMA-ALDRICH Cat. No. R5125 <sup>1*, 2*</sup>
	R5500 <sup>1*, 2*</sup>
	R6513 <sup>1*</sup>
	R4642
- Ribonuclease A (MP Biomedicals Cat. No. 101076 <sup>1\*, 2\*</sup>)
- RNase A (AMRESCO Cat. No. 0675 <sup>1\*, 2\*</sup>)
- RNase A (QIAGEN Cat. No. 19101)
- RNase A (Life Technologies Cat. No. 12091)

1\*: 10mM Tris HCl pH7.5、15mM NaCl を用いて 100mg/ml 溶液を調製してください。

2\*: R5125、R5500、101076、0675 は 100°C 15 分処理をして DNase 活性を失活してから使用してください。

#### ②器具・機材

- マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ
- 1.5ml マイクロチューブ (前処理および DNA 溶出時に使用)
- チューブスタンド
- チューブミキサー (2,500rpm 程度の攪拌ができるもの)
- マイクロ遠心機 (6,000xg (8,000rpm) の遠心が可能なもの)\*  
\* 遠心機によっては使用できないケースがありますので、遠心機の仕様をご確認の上、  
使用してください。
- シェーカー (55°C でシェーキングできるもの)
- ヒートブロックまたはウォーターバス (70°C で使用可能なもの)

---

## 4. 取扱上の安全注意事項

### ◆ EDT(Proteinase K)

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

● 目、皮膚および衣服についたときは、水で十分に洗ってください。

### ◆ MDT(Tissue Lysis Buffer)

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

● 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

● この薬品を扱う場合は適切な保護手袋および保護めがねを着用してください。

### ◆ LDT(Lysis Buffer)

薬品の特性： ● 飲むと有害の可能性があります。

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

● 目、皮膚および衣服についたときは、水で十分に洗ってください。

● この薬品を扱う場合は、適切な保護手袋および保護めがねを着用してください。

### ◆ WDT(Wash Buffer)

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

● 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

### ◆ CDT(Elution Buffer)

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

● 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ LDT は、温度の高い場所での使用、保存は避けてください。

◆ LDT を含む溶液やフロースルーは、絶対に漂白剤と混合しないでください。

◆ 感染性のおそれのあるサンプルを使用する場合

感染性のおそれのあるサンプルを扱う場合は、適切な保護具を着用してください。

◆ 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、廃棄する場合

感染性産業廃棄物に該当しますので、関連する法に従い、焼却、溶解、滅菌、消毒などの処理をしてください。なお、処分業者に委託する場合は、特別管理産業廃棄物処分の許可を受けた業者へ、特別管理産業廃棄物管理票(マニフェスト)を添えて処理を委託してください。

◆ 参考情報

各試薬の性状および取り扱いに関する詳細情報は、SDS(安全データシート)をお読みください。SDS は弊社ホームページ(<https://www.kurabo.co.jp/bio/>)からダウンロードできます。

## 5. 使用上の注意事項

### ◆サンプルに関する注意事項

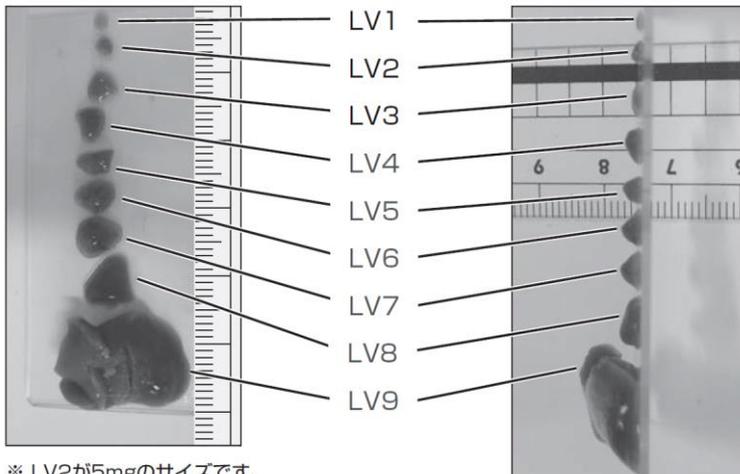
- 本キットで初めて分離されるサンプルの場合は、組織量 5 mg から分離をスタートし、予備実験を行ってください。
- 処理可能量を超えた組織量をオーバーロードしてしまうと、性能が顕著に低下し、最悪の場合カートリッジ(CAS)が目詰まりを起こす可能性があります。
- 図1にマウス正常組織(肝臓)の重量とサイズの対応例を実寸大で示します。組織重量の参考にしてください。

図1: マウス正常組織(肝臓)の重量とサイズの対応例

Balb/c マウス(メス、7週齢)正常組織での例です。

肝臓

No.	実測値	長軸	短軸	高さ	
LV1	2.3 mg	1.5 mm	1.5 mm	0.5 mm	} 処理可能範囲
LV2	5.0 mg	2.0 mm	2.0 mm	1.0 mm	
LV3	11.6 mg	4.0 mm	4.0 mm	1.0 mm	
LV4	16.2 mg	5.0 mm	4.0 mm	2.0 mm	} 適用外
LV5	21.7 mg	5.0 mm	3.5 mm	2.5 mm	
LV6	25.6 mg	6.0 mm	5.0 mm	2.5 mm	
LV7	30.7 mg	7.0 mm	5.0 mm	2.5 mm	
LV8	56.7 mg	8.0 mm	7.0 mm	2.5 mm	
LV9	850.2 mg	20.0 mm	14.0 mm	8.0 mm	



※ LV2が5mgのサイズです。

### ◆試薬に関する注意事項

- 
- MDTは保存中に析出物を生じることがあります。その場合、55℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。
  - LDTは保存中に析出物を生じることがあります。その場合、37℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。
  - LDTは、温度の高い場所での使用、保存は避けてください。
  - LDTを含む溶液やフロースルーは、絶対に漂白剤と混合しないでください。

◆操作に関する注意事項

- すべての操作は室温(15 ~ 30℃)で行ってください。低温または高温でご使用の場合、キットの性能が発揮されないことがあります。
- 遠心する際はカートリッジ(CAS)の蓋をしっかりと閉めてください。
- カートリッジ(CAS)を廃液容器(WTS)にセットするときはしっかりと押し込んでください。
- 遠心機内の温度が上昇するのを防ぐため、遠心機の連続運転は避けてください。分離性能に悪影響を及ぼすことがあります。
- 遠心機は、指定された遠心条件(回転数、時間など)で使用してください。

## 6. 品質管理

- 品質管理基準を設け、全てのロットで品質に問題のないことを確認しています。
- ゲノム DNA の収量や品質は 260 nm の吸光度、260 nm/280 nm の吸光度比によって確認しています。

## 7. 製品説明

QuickGene SP kit DNA tissue (SP-DT) は、動物組織からのゲノム DNA の分離・精製に対応しています。基本処理可能量は 5 mg です。

表 1 処理可能最大組織量

Balb/c マウス(メス、7 週齢)正常組織での例です。

組織部位	処理可能組織量
肝臓	10 mg
尾	10 mg

- 処理可能最大組織量は組織の状態、部位などにより変動します。組織部位、状態、消化の状態によっては処理可能組織量が表 1 に示した量より少なくなることもあります。

表 2 処理可能最大組織量

Balb/c マウス(メス、7 週齢)正常組織での例です。

組織部位	5 mg あたり収量例	A260/280
肝臓	4.5 $\mu$ g	1.86
尾	4.0 $\mu$ g	1.92

- 収量はサンプルの状態により変動します。
- 凍結サンプルで、凍結、融解を繰り返した場合、DNA 収量や分子量が低下することがあります。
- ゲノム DNA と共に RNA が精製されます。RNA の混入が好ましくない場合は、RNase 処理を行ってください。
- 肝臓など RNA を多く含む組織の処理量が多い場合、標準条件にて RNase 処理しても RNA を充分分解できないことがありますので、RNase の使用条件を検討してください。

---

## 8. プロトコール

### 8-1. 試薬の準備

#### ◆EDT(2.5ml)

EDT はより安定に保つため、冷蔵(2 ~ 8℃)で保存することをお勧めします。

#### ◆MDT(25ml)

使用前に十分に混和してください。

析出物が生じた場合は、55℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。

#### ◆LDT(30ml)

使用前に十分に混和してください。

析出物が生じた場合は、37℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。

#### ◆WDT(125ml)

濃縮状態でお届けします。

使用前に、ボトルに 125 ml の特級エタノール(>99%)を添加し、よく混和してください。エタノール添加後はボトル蓋ラベルの「ethanol added?」チェックボックスにチェックを入れてください。エタノール添加後は揮発を防ぐために、ボトルの蓋をしっかりと閉めてください。

#### ◆CDT(100ml)

核酸溶出時には必ず CDT を使用してください。

#### ◆RNase A

RNase A はキットには含まれていません。p.5 の推奨 RNase A を準備してください。

### 8-2. 分離フローおよびプロトコール詳細

QuickGene SP kit DNA tissue(SP-DT)は、基本的には 1 処理あたり動物組織 5 mg からのゲノム DNA 分離に対応しています。

#### 【分離を始める前の注意事項】

#### ◆サンプルに関する注意事項

- すぐに使用しない場合は、液体窒素で素早く凍結し、冷凍保存(-20℃または-80℃)してください。室温で放置したり、凍結、融解を繰り返すと、DNA が分解したり、収量が減少することがあります。

- 
- 本キットで初めて分離されるサンプルの場合は、組織量 5 mg から分離をスタートし、予備実験を行ってください。
  - 組織サンプルを処理する前に、表 1(p.9)を参考に、サンプル処理量を必ず確認してください。図 1 (p.7)のマウス正常組織(肝臓)の重量とサイズの対応例も参考にしてください。
  - 処理可能量を超えた組織量をオーバーロードしてしまうと、性能が顕著に低下し、最悪の場合カートリッジ(CAS)が目詰まりを起こす可能性があります。

◆ 試薬に関する注意事項

- LDT を含む溶液やフロースルーは、絶対に漂白剤と混合しないでください。

◆ 操作に関する注意事項

- 動物から切り取った組織は、所定量を直ちに MDT へ浸してください。
- 試薬の液量は分離フロー(p.12、p.16)に記載された量を厳守してください。
- クロスコンタミネーションを防ぐために毎回ピペットチップを交換することをお勧めします。
- カートリッジ(CAS)内のフィルターにピペットチップが触れないように注意してください。
- 遠心後、遠心機からカートリッジ(CAS)と廃液容器(WTS)を取り出す際は、フロースルーがカートリッジに付着しないよう注意深く取り出してください。付着した場合は軽くスピンドウン(数秒)を行ってください。
- 遠心機内の温度が上昇するのを防ぐため、遠心機の連続運転は避けてください。分離性能に悪影響を及ぼすことがあります。
- すべての操作は室温(15 ~ 30°C)で行ってください。
- 分離の途中では時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用後廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので、適切な処理を行ってください。

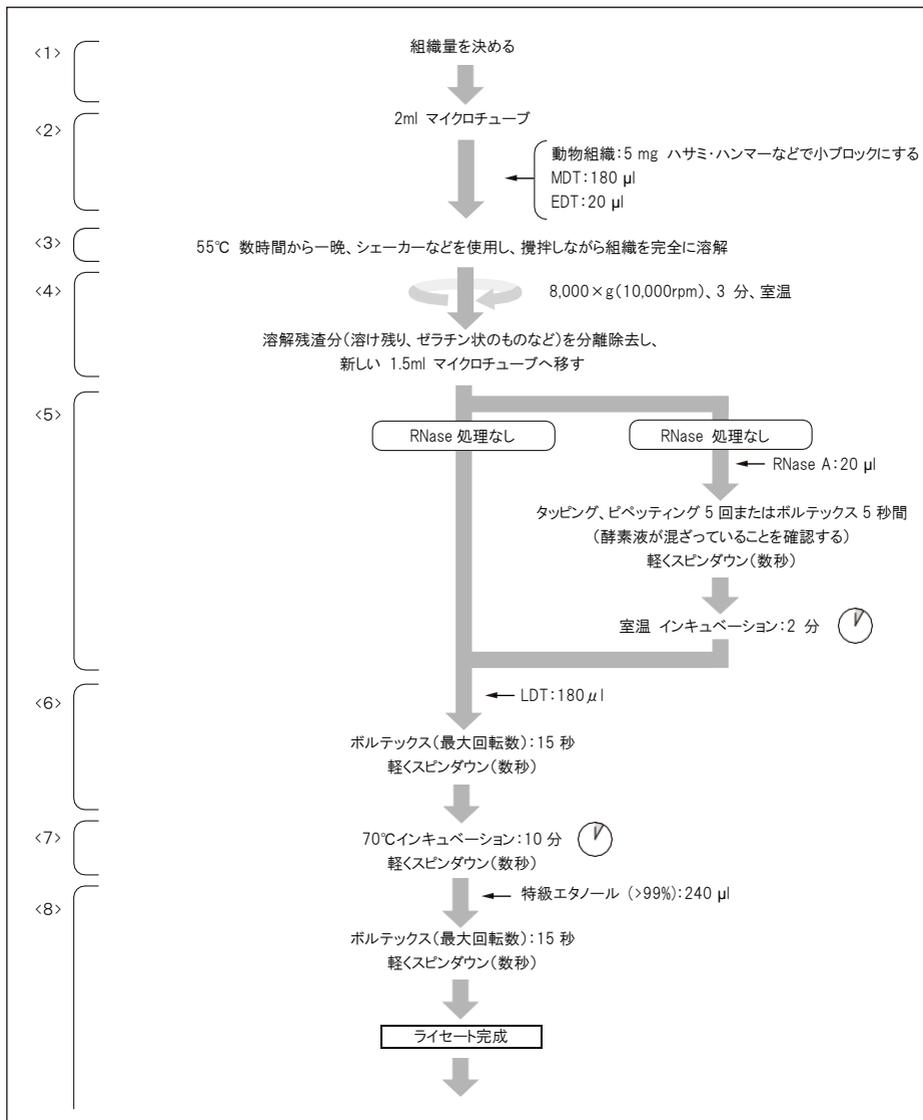
動物組織の場合とマウス尾の場合でプロトコルが異なります。所定のプロトコルをお使いください。

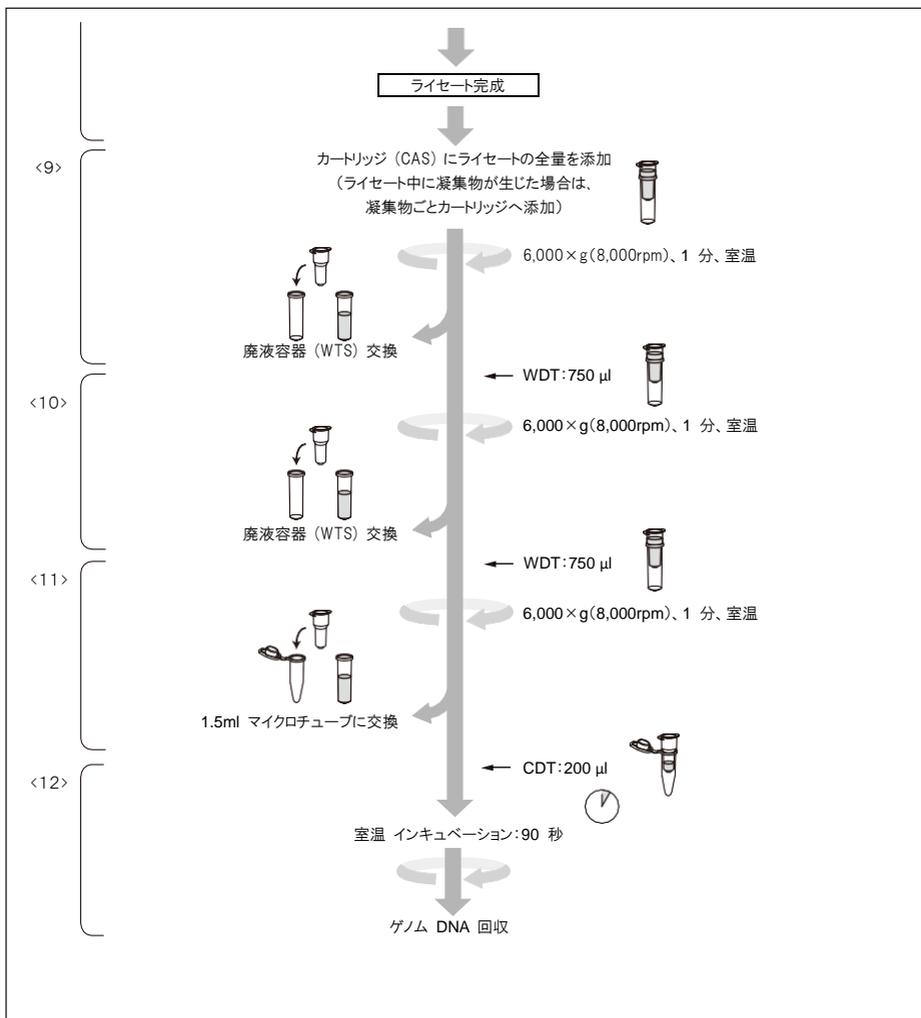
動物組織：p.12

マウス尾：p.16

## 動物組織：分離フロー

- WDT に 125 ml の特級エタノール (>99%) が添加されていることを確認してください。
- 組織溶解に使用するシェーカーを 55°C に設定してください。
- 動物組織からの分離を行う場合は、ヒートブロックまたはウォーターバスの温度を 70°C に設定してください。





## 動物組織：プロトコール詳細

- <1> 動物から切除した新鮮または凍結組織を準備してください。  
組織サンプルは所定量(基本的には 5 mg)を使用してください。  
組織量が多すぎた場合、カートリッジの目詰まり、顕著な収量減少、精度低下の可能性があります。目詰まりした場合は、組織量を減らして検討してください。室温で組織を放置しないでください。DNA が分解されてしまいます。
- <2> 組織をハサミ、ハンマーなどで 1.5~2mm 角の小ブロックにし、動物組織重量を測定します。MDT を 180  $\mu$ l、続いて EDT を 20  $\mu$ l 添加します。  
凍結組織を使用する場合、組織を室温にしてから直ちに MDT を加えてください。新鮮な組織を使用する場合は、所定量の組織へ直ちに MDT を加えてください。
- <3> 55°Cにて攪拌しながら、組織を完全に溶解させます。攪拌しなかった場合、所定量の組織でも完全に溶解しない場合があります。加温できるシェーカーなどで攪拌してください。または、加温しながら時々ボルテックスして組織をよく溶解してください。  
溶解時間は組織の種類により変わります。例えば、脳・肺・腎臓の場合は 16 時間程度、肝臓の場合は 3 時間程度を目安としてください。溶解しにくい場合は、時間を延長してください。
- <4> 不溶分を除くため、8,000  $\times$  g(およそ 10,000rpm)、3 分、室温にて遠心します。  
残渣分(溶け残り、ゼラチン状のもの)を吸い取らないように、新しい 1.5ml マイクロチューブに上清を移してください。
- <5> **RNase 処理**  
ゲノム DNA と共に RNA が精製されます。RNA の混入が好ましくない場合は、オプション の RNase 処理を行ってください。RNase 処理をしない場合は<6>に進んでください。RNase A を 20  $\mu$ l 添加してください(Cat. No. 12091(Invitrogen)の場合は 60  $\mu$ l)。  
RNase をタッピングやピペティング 5 回、または、ボルテックス 5 秒程度行うことでサンプル液とよく混ぜてください。数秒間スピンドウンして、チューブのキャップや壁についた液を収集してください。室温にて 2 分間インキュベーションします。  
RNase A は推奨品を使用し、DNase フリーでない RNase A を使用する場合は、DNase 不活化処理をしてください(3-① p.5)。  
組織の種類により RNA の含有量が違います。含有量が低い組織の場合、使用 RNase A 量を減量することができます。
- <6> サンプル液に LDT を 180  $\mu$ l 添加し、最大回転数で 15 秒間ボルテックスします。数秒間スピンドウンして、キャップや壁についた液を収集します。  
LDT の混和がボルテックスで不十分なときは、タッピング、ピペティングあるいは転倒混和などでよく混ぜてください。LDT 液添加時に混合液が白くなったり沈殿物が生じることがありますが、70°C に加温すると溶解します。
- <7> 70°Cにて 10 分間インキュベーションします。数秒間スピンドウンして、キャップや壁についた液を収集します。

---

<8> 特級エタノール(>99%)を 240  $\mu$ l 添加し、最大回転数で 15 秒間ボルテックスします。数秒間スピンドアウンして、キャップや壁についた液を収集します(ライセート完成)。ライセート完成後は、速やかに分離操作を行ってください。

混和がボルテックスで不十分なときは、タッピング、ピペッティングあるいは転倒混和などでよく混ぜてください。

<9> <ライセート添加>ライセートを数回ピペッティングし、カートリッジ(CAS)に全量添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、6,000  $\times$  g(8,000rpm)にて 1 分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器(WTS)を注意深く取り出します。新しい廃液容器(WTS、キット同梱)にカートリッジをセットし、フロースルー(ろ液)の入った廃液容器を捨てます。

試料によっては凝集物ができることがあります。すべての凝集物ごとカートリッジへ添加します。遠心後ライセートがカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

<10> <洗浄 1 回目>注意深くカートリッジ(CAS)の蓋を開け、WDT 750  $\mu$ l を添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、6,000  $\times$  g(8,000rpm)にて 1 分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器(WTS)を注意深く取り出します。新しい廃液容器(WTS、キット同梱)にカートリッジをセットし、フロースルーの入った廃液容器を捨てます。

遠心後 WDT がカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

<11> <洗浄 2 回目>注意深くカートリッジ(CAS)の蓋を開け、WDT 750  $\mu$ l を添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、6,000  $\times$  g(8,000rpm)にて 1 分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器(WTS)を注意深く取り出します。新しい 1.5ml マイクロチューブ(非同梱)にカートリッジをセットし、フロースルーの入った廃液容器を捨てます。

遠心後 WDT がカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

<12> <回収> 注意深くカートリッジ(CAS)の蓋を開け、CDT 200  $\mu$ l をカートリッジ内のフィルターに直接添加します。室温にて 90 秒間インキュベート後、6,000  $\times$  g (8,000rpm)にて 1 分間遠心し、溶出します。遠心機からカートリッジと 1.5ml マイクロチューブを注意深く取り出し、カートリッジを捨てます。

以上でゲノム DNA 分離は完了です。

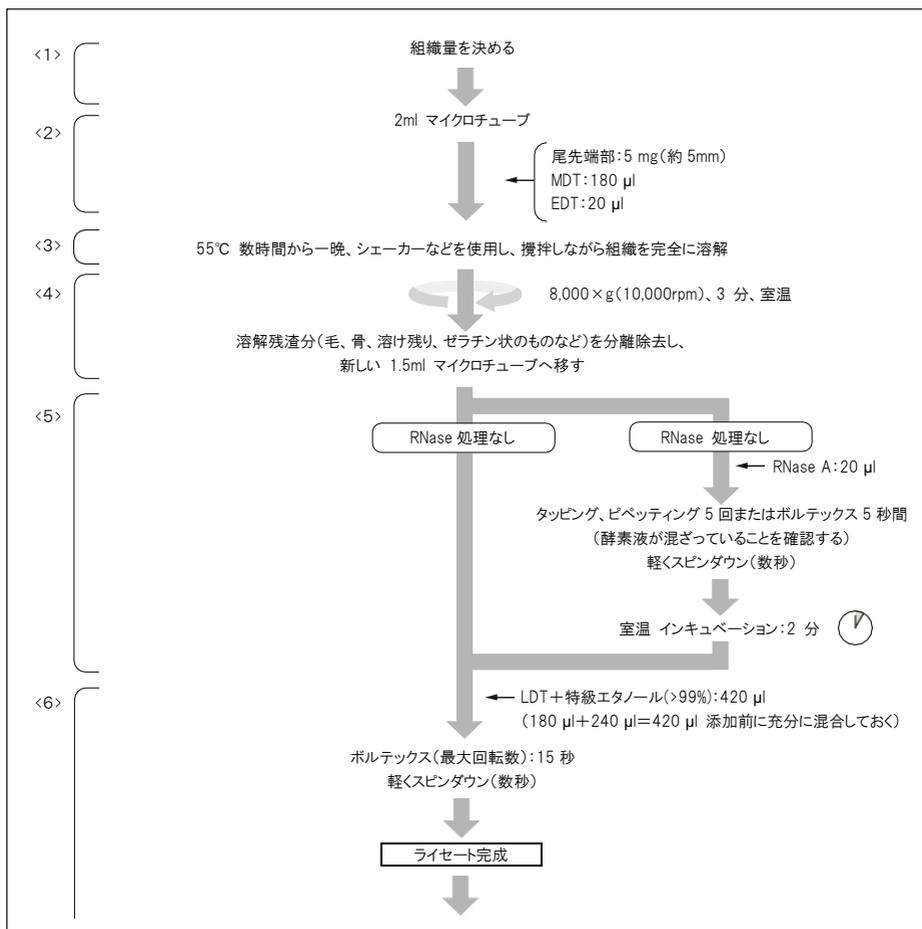
溶出液量を 50  $\mu$ l まで下げられますが、その場合、収量が 20 ~ 30%低下します(付録 1 図 4 p.25 参照)。

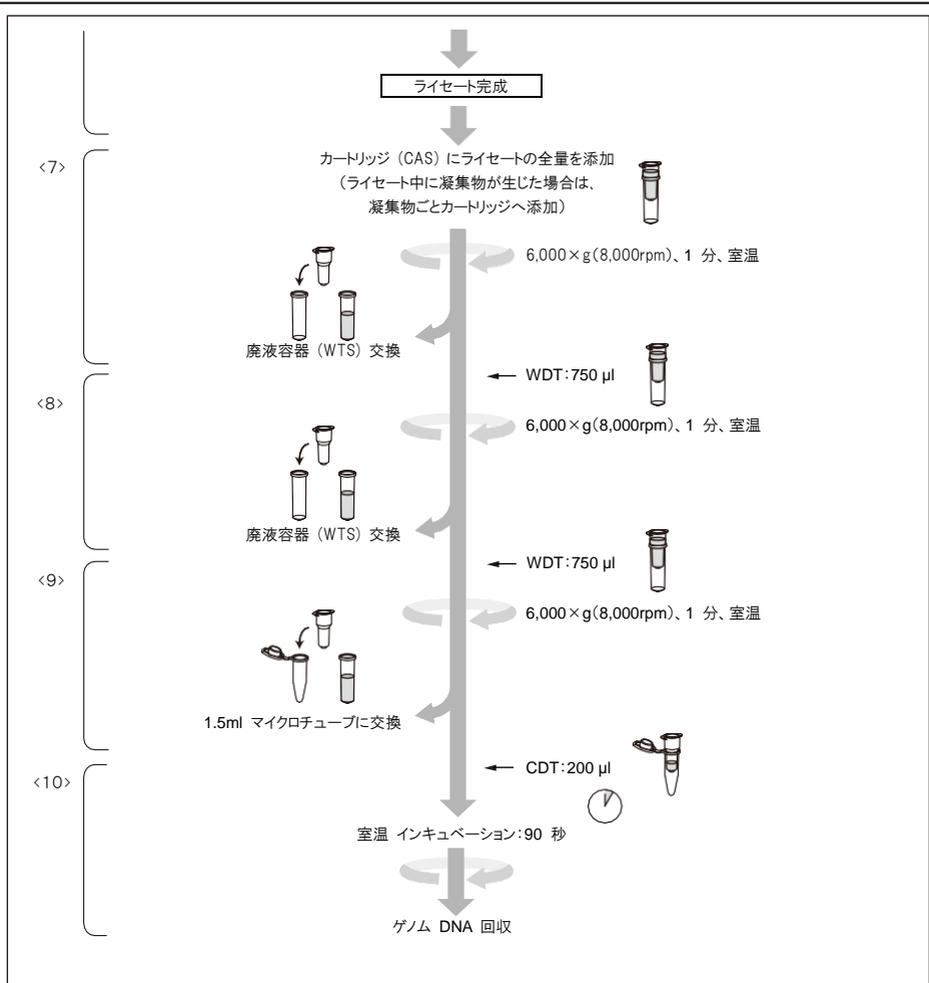
遠心後 CDT がカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

回収したゲノム DNA をすぐに使用しない場合は、1.5ml マイクロチューブのキャップをしっかりと閉めた後、4°Cに保存してください。長期間保存する場合には、-20°Cで保存することをお勧めします。

## マウス尾:分離フロー

- WDT に 125 ml の特級エタノール(>99%)が添加されていることを確認してください。
- 組織溶解に使用するシェーカーを 55°C に設定してください。





## マウス尾：プロトコール詳細

- <1> マウスから切除した新鮮または凍結した尾を準備してください。  
尾は所定量(基本的には 5 mg)を使用してください。  
量が多すぎた場合、カートリッジの目詰まり、顕著な収量減少、精度低下の可能性があります。目詰まりした場合は、組織量を減らして検討してください。  
マウスの尾 5 mg はおよそ 5mm ですが、マウスの種類、週齢などで異なります。室温で切断した尾を放置しないでください。DNA が分解されてしまいます。
- <2> 尾先端部の重量を測定します。MDT を 180  $\mu$ l、続いて EDT を 20  $\mu$ l 添加します。  
凍結組織を使用する場合、組織を室温にしてから MDT を加えてください。  
新鮮な組織を使用する場合は、所定量の組織へ直ちに MDT を加えてください。
- <3> 55°Cにて攪拌しながら、尾を完全に溶解させます。攪拌しなかった場合、所定量の尾でも完全に溶解しない場合があります。加温できるシェーカーなどで攪拌してください。または、加温しながら時々ボルテックスして尾をよく溶解してください。  
溶解時間はマウスの週齢により変わります。7 週齢メスのマウスの場合、16 時間程度で溶解します。溶解しにくい場合は、時間を延長してください。
- <4> 不溶分・毛などを除くため、8,000  $\times$  g(およそ 10,000rpm)、3 分、室温にて遠心します。残渣分(毛、骨、溶け残り、ゼラチン状のもの)を吸い取らないように、新しい 1.5ml マイクロチューブに上清を移してください。
- <5> RNase 処理  
ゲノム DNA と共に RNA が精製されます。RNA の混入が好ましくない場合は、オプションの RNase 処理を行ってください。RNase 処理をしない場合は<6>に進んでください。  
RNase A を 20  $\mu$ l 添加してください(Cat. No. 12091(Life Technologies)の場合は 60  $\mu$ l)RNase をタッピングやピペッティング 5 回、または、ボルテックス 5 秒程度行うことでサンプル液とよく混ぜてください。数秒間スピンドウンして、チューブのキャップや壁についた液を収集してください。室温にて 2 分間インキュベーションします。  
RNase A は推奨品を使用、DNase フリーでない RNase A を使用する場合は、DNase 不活化処理をしてください(3-③ p.5)。  
尾の状態により RNA の含有量が違います。含有量が低い場合、使用 RNase A 量を減量することができます。
- <6> あらかじめ、LDT 180  $\mu$ l と特級エタノール(>99%)240  $\mu$ l を十分に混和しておきます。サンプル液に LDT・特級エタノール混合液(420  $\mu$ l)を添加し、最大回転数にてボルテックスを 15 秒間行います。数秒間スピンドウンして、キャップや壁についた液を収集します(ライセート完成)。ライセート完成後は、速やかに分離操作を行ってください。  
混和がボルテックスで不十分なときは、タッピング、ピペッティングあるいは転倒混和などでよく混ぜてください。

---

<7> <ライセート添加>ライセートを数回ピペティングし、カートリッジ(CAS)に全量添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、 $6,000 \times g$  ( $8,000\text{rpm}$ )にて 1 分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器(WTS)を注意深く取り出します。新しい廃液容器(WTS、キット同梱)にカートリッジをセットし、フロースルー(ろ液)の入った廃液容器を捨てます。

試料によっては凝集物ができることがあります。すべての凝集物ごとカートリッジへ添加します。遠心後ライセートがカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

<8> <洗浄 1 回目> 注意深くカートリッジ(CAS)の蓋を開け、WDT  $750 \mu\text{l}$  を添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、 $6,000 \times g$  ( $8,000\text{rpm}$ )にて 1 分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器(WTS)を注意深く取り出します。新しい廃液容器(WTS、キット同梱)にカートリッジをセットし、フロースルーの入った廃液容器を捨てます。

遠心後 WDT がカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

<9> <洗浄 2 回目> 注意深くカートリッジ(CAS)の蓋を開け、WDT  $750 \mu\text{l}$  を添加します。カートリッジの蓋をしっかりと閉め、 $6,000 \times g$  ( $8,000\text{rpm}$ )にて 1 分間遠心します。遠心機からカートリッジと廃液容器(WTS)を注意深く取り出します。新しい 1.5ml マイクロチューブ(非同梱)にカートリッジをセットし、フロースルーの入った廃液容器を捨てます。

遠心後 WDT がカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

<10> <回収> 注意深くカートリッジ(CAS)の蓋を開け、CDT  $200 \mu\text{l}$  をカートリッジ内のフィルターに直接添加します。室温にて 90 秒間インキュベート後、 $6,000 \times g$  ( $8,000\text{rpm}$ )にて 1 分間遠心し、溶出します。遠心機からカートリッジと 1.5ml マイクロチューブを注意深く取り出し、カートリッジを捨てます。

以上でゲノム DNA 分離は完了です。

溶出液量を  $50 \mu\text{l}$  まで下げられますが、その場合、収量が 20~30%低下します(付録 1 図 4 p.25 参照)。

遠心後 CDT がカートリッジ内に残っている場合、再度遠心操作を行ってください。

回収したゲノム DNA をすぐに使用しない場合は、1.5ml マイクロチューブのキャップをしっかりと閉めた後、 $4^{\circ}\text{C}$ に保存してください。長期間保存する場合には、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存することをお勧めします。

## 9.トラブルシューティング

トラブルが生じた場合には、以下の対策を参照してください。

### (1)DNA の収量が低い、DNA が得られない

原因	対策
組織の保存状態が不適切	組織の種類、大きさ、量、保管期間、保存条件で DNA 収量は変わります。不適切な保存条件では収量が低下します。適切な条件でサンプルを保存してください。動物から組織を取り出したら、所定量を直ちに MDT へ浸すか、直ちに液体窒素で凍らせ、凍結 (-20℃または-80℃)保存してください。
組織の溶解が不完全	EDT を含む MDT に、組織を完全に浸して溶解してください。溶解するときに、組織を細かく切ってください。 加温できるシェーカーを用いてシェーキングを行い、よく攪拌してください。シェーカーを使用しない場合は、時々 55℃にて加温しながらボルテックスで混和してください。必要に応じて溶解インキュベーション時間を延長してください。 組織量が 5 mg 以上の場合で、本キットで初めて分離する組織の場合は、組織 5 mg あたりの EDT:MDT 比が 20 $\mu$ l: 180 $\mu$ l になるように比例計算で調整してください。LDT(動物組織の場合は 180 $\mu$ l、マウス尾の場合は LDT と特級エタノール混合液 420 $\mu$ l)と組織溶解後の遠心上清を混合するときは、遠心上清のうち 200 $\mu$ l を採取してください。
マウス尾 5 mg を MDT と EDT で一晩溶解した後、溶解物がゲル状になった溶解中の攪拌が不充分	組織溶解中に液が混ざり合うように攪拌しながらインキュベーションしてください。振とう培養器、ハイブリオープンなどを利用しサンプルチューブ栓をして横倒した状態で攪拌、混和するとよく混ざります。攪拌が不完全であった場合、透明なゲル状の物が現れますが、ボルテックスでよく混ぜてゲル状の物を溶解してから、次のステップへ進んでください。
試薬、サンプルの添加順序が不適切	ライセート調製時、マイクロチューブには、溶解した組織サンプル→LDT→エタノールの順で添加してください。尾の場合は、エタノールを加えた LDT をサンプルへ添加してください。
試薬の容量比が不適切	組織溶解後の遠心上清をロスした場合は、遠心上清量、LDT 液量およびエタノール液量を「遠心上清:LDT:特級エタノール(>99%)=200:180:240」に、マウス尾の場合は「遠心上清:LDT と特級エタノール混合液=200:420」に調節してください。
フィルターが破れてしまった	カートリッジ(CAS)内のフィルターにピペットチップが触れないように注意してください。
組織量が多すぎた	表 1(p.9)を参照して、所定量まで組織量を減らしてください。マウス尾先端部の場合約 5mm が 5 mg に相当します。

原因	対策
LDT 添加後のボルテックスが不十分	LDT 添加直後に、最大回転数で十分にボルテックス(15 秒)または転倒混和してください。
WDT に所定量のエタノールを加えていない	WDT 使用前には、必ず所定量の特級エタノール(>99%)を加えたことを確認してください。(8-1 p.10 参照)
カートリッジ(CAS)ヘライセート全量を添加しきれていない	ライセートに凝集物が見られた場合は、凝集物も含めて全量をカートリッジ(CAS)に添加してください。
試薬に析出物が生じた	(6)「試薬に析出物が生じた」参照
遠心機内の温度が高い	遠心機内の温度が上昇するのを防ぐため、遠心機の連続運転は避けてください。分離性能に悪影響を及ぼすことがあります。
核酸の溶出に CDT 以外の試薬を使った	核酸溶出時には CDT を使用してください。
遠心操作でカートリッジ(CAS)内の液が抜けた後、放置した	カートリッジの遠心操作を始めたら、途中で放置せずに最後まで続けてください。

## (2)カートリッジ(CA)が詰まった

原因	対策
組織量が多すぎた	表 1(p.9)を参照して、所定量まで組織量を減らしてください。マウス尾先端部の場合約 5mm が 5mg に相当します。
LDT 添加後のボルテックスが不十分	LDT 添加直後に、最大回転数で十分にボルテックス(15 秒)または転倒混和してください。
カートリッジ(CAS)の遠心時間が不十分	遠心時間を延長してください。
組織の溶解が不完全	EDT を含む MDT に、組織を完全に浸して溶解してください。溶解するときに、組織を細かく切ってください。 加温できるシェーカーを用いてシェーキングを行い、よく攪拌してください。シェーカーを使用しない場合は、時々 55°C にて加温しながらボルテックスで混和してください。必要に応じて溶解インキュベーション時間を延長してください。
組織の不溶解物が詰まった	MDT と EDT での組織溶解後溶け残った残渣を、遠心(8,000 × g (10,000rpm)、3 分)して取り除いてから LDT を加えてください。
遠心機内の温度が高い	遠心機内の温度が上昇するのを防ぐため、遠心機の連続運転は避けてください。
遠心時間を延長してもライセートや洗浄液が抜けきらない	「補足(p.23)」を参考に、カートリッジ(CAS)からフィルターを取り外して、DNA のリカバリーを試してください。

### (3)DNA が分解した

原因	対策
組織を室温に放置した	動物から組織を取り出したら、所定量を直ちに MDT へ浸すか、直ちに液体窒素で凍らせ、凍結(-20℃または-80℃)保存してください。

### (4)DNA の純度が低い

原因	対策
所定の洗浄条件で行っていない	洗浄は WDT 750 µl で 2 回行ってください。
試薬、サンプルの添加順序が不適切	ライゼート調製時、マイクロチューブには、溶解した組織サンプル→LDT→エタノールの順で添加してください。尾の場合は、エタノールを加えた LDT をサンプルへ添加してください。
試薬の容量比が不適切	組織溶解後の遠心上清をロスした場合は、遠心上清量、LDT 液量およびエタノール液量を「遠心上清:LDT:特級エタノール(>99%)=200:180:240」に、マウス尾の場合は「遠心上清:LDT と特級エタノール混合液=200:420」に調節してください。
LDT 添加後のボルテックスが不充分	LDT 添加直後に、最大回転数で充分にボルテックス(15 秒)または転倒混和してください。
WDTに所定量のエタノールを加えていない	WDT 使用前には、必ず所定量の特級エタノール(>99%)を加えたことを確認してください。(8-1 p.10 参照)
DNA の溶出に CDT 以外の試薬を使った	DNA 溶出時には CDT を使用してください。
遠心機の回転数が不適切	カートリッジ(CAS)遠心の際は、6,000×g(8,000rpm)で遠心を行ってください。
遠心後のフロースルーがカートリッジ(CAS)に付着した	遠心後、遠心機からカートリッジ(CAS)と廃液容器(WTS)を取り出す際は、フロースルーがカートリッジに付着しないよう注意深く取り出してください。付着した場合は軽くスピンドウン(数秒)を行って取り除いてください。

### (5)PCR など、続けて行う実験がうまくいかない

原因	対策
使用したDNA量が不適切	260 nm 吸光度から濃度を確認してください。
DNA が分解している	動物から組織を取り出したら、所定量を直ちに MDT へ浸すか、直ちに液体窒素で凍らせ、凍結(-20℃または-80℃)保存してください。
所定の洗浄条件で行っていない	洗浄は WDT 750 µl で 2 回行ってください。
原因	対策

DNA の純度が低い	(4)「DNA の純度が低い」参照
------------	-------------------

(6) 試薬に析出物が生じた

原因	対策
低温で保存している	指定の温度(15 ~ 28°C)で保存してください。 析出物が生じた場合は、MDT は 55°Cにて、その他の試薬は 37°Cで溶解後、室温に戻してから使用してください。

(7) LDT→エタノール添加後、あるいは LDT+エタノール添加後に白色沈殿物が発生

原因	対策
室温が低い	この沈殿物は、55°Cのインキュベーションで溶解されます。溶解後、室温に戻してから分離操作をしてください。
組織量が多かった	5 mg 以上の組織を使用した場合に白色沈殿物が出てくる場合があります。組織量が所定量(表 1 p.9 参照)より少なかったことをご確認の上、凝集物ごとカートリッジ(CAS)に添加してください。

(8) 廃液容器(WTS)が破損した

原因	対策
指定の条件(6,000×g)以上で遠心機を使用した	指定の条件(6,000×g)で遠心機を使用してください。

## 補足: 目詰まりしたカートリッジ(CAS)からのDNAリカバリー方法

### a) ライセート遠心工程で目詰まりした場合

カートリッジ(CAS)に残ったライセートを新しいカートリッジに移し、8-2<9>以降(p.15)の操作を再度行ってください。

目詰まりしたカートリッジのフィルターからのリカバリーは下記 1)以降を参照してください。

### b) 洗浄遠心工程で目詰まりした場合

カートリッジ(CAS)に残った洗浄液を捨ててください。

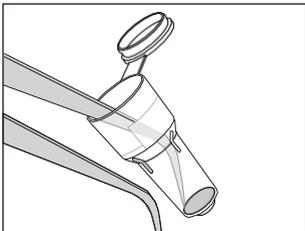
目詰まりしたカートリッジのフィルターからのリカバリーは下記 1)以降を参照してください。

## 【目詰まりしたカートリッジ(CAS)からの DNA リカバリー方法】

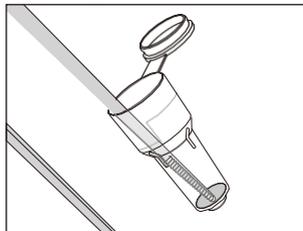
準備: 70%エタノール、先曲り先細ピンセットまたは耳鼻科用ピンセット

- 1) あらかじめ、1.5ml マイクロチューブに 200  $\mu$ l CDT を分取しておきます。
- 2) カートリッジ(CAS)を廃液容器(WTS)にセットした状態で、70%エタノールを 750 $\mu$ l 添加します。数回ゆっくりとピペティングした後、ピペットで吸うかデカンテーションして 70%エタノールを除去します。カートリッジを逆さにして残りのエタノールをキムワイブなどに吸わせませす。
- 3) 図 2、3 を参考に、ピンセットの先でフィルターの外周を押さえつけながら、フィルターをカートリッジ(CAS)より外してください。
- 4) 取り外したフィルターを 1)で準備した 1.5ml マイクロチューブ中の CDT に浸漬し、70°C にて 10 分間インキュベーションします。
- 5) 最大回転数にてボルテックスを 1 分間行ってください。数秒間スピンドウンして、キャップ や壁についた液を収集します。
- 6) フィルターを取り出し、他のチューブに入れます(リカバリー完了後、廃棄します)。
- 7) 元の動物組織、マウス尾いずれの場合でも、マウス尾プロトコルの 8-2<6>(p.18)以降へ進み、再分離してゲノム DNA を回収してください。

図 2 ピンセットをカートリッジ(CAS)に入れた様子

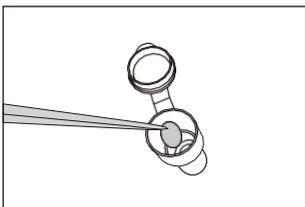


先曲り先細ピンセットの場合



耳鼻科用ピンセットの場合

図 3 フィルターを取り外したところ



---

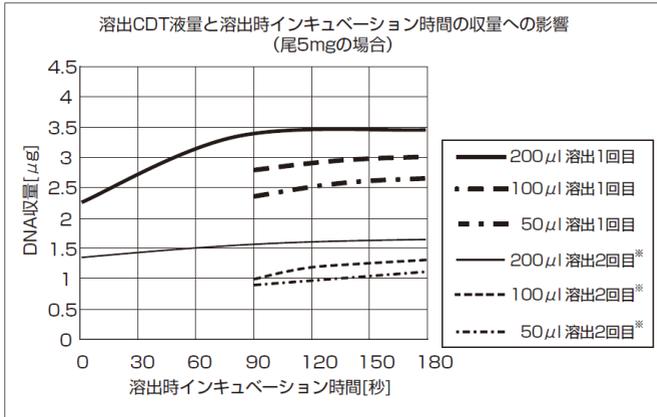
## 10. オーダーリング・インフォメーション

製 品	Cat #
QuickGene SP kit DNA tissue DNA 組織キット(スピン法)	SP-DT
QuickGene SP kit DNA whole blood DNA 全血キット(スピン法)	SP-DB

## 付録 1 QuickGene SP kit DNA tissue データ例

### ● 溶出CDT液量・溶出時インキュベーション時間・溶出回数と収量の関係

図4



※1 回溶出後に再度所定液量のCDTを加えて溶出

### ● 電気泳動

M 1 2

図5



M : 1Kb Plus DNA Ladder(Life Technologies)

1 : マウス尾 (RNase 処理あり)

2 : マウス肝臓 (RNase 処理あり)

泳動条件: 0.5%アガロースゲル/1×TAE

### ● PCR 結果

M 1

図6



M: 100bp Ladder(Life Technologies)

1: 尾 (RNase 処理あり)

テンプレート: 5 ng 回収ゲノム DNA

プライマー : G3PDH

泳動条件: 1%アガロースゲル/1×TAE

● 制限酵素(EcoRI)切断結果

M 1 2

図7



M : 1Kb Plus DNA Ladder(Life Technologies)

1 : マウス尾(EcoRI 処理前)

2 : マウス尾(EcoRI 処理後)

泳動条件:0.5%アガロースゲル/1×TAE

＊トレードマークと免責事項

本取扱説明書に記載されている登録名などは、特に表示がない場合でも法律によってその権利が保証されています。



●製造元

倉敷紡績株式会社

環境メカトロニクス事業部 バイオメディカル部

〒572-0823 大阪府寝屋川市下木田町 14-30

TEL (072) 820-3079 FAX (072) 820-3095

URL; <http://www.kurabo.co.jp/bio/>