2023 年 11 月作成

取 扱 説 明 書 シカジーニアス® トータルDNAプレップキット(組織用)

Cica Geneus® Total DNA Prep Kit (for Tissue)

1. はじめに

本製品は、細胞培養液、全血細胞、動物組織など、様々なサンプルから簡便にトータル DNA を精製するためのキットです。本製品は、最適化したバッファーシステムとシリカベースのメンブレンのスピンカラムを組み合わせることで、様々なアプリケーションに適用可能な精製 DNA を調製することができます。

2. 製品形態

製品名	シカジーニアス® トータル DNA プレップキット(組織用) (Cica Geneus® Total DNA Prep Kit (for Tissue))
製品番号	08088-97
容量	250 回分
保管温度	室温 (15 ℃～25 ℃)

3. 構成試薬 (250 回)

個別名称	容量	用途
SV Column type G (コレクションチューブ付)	10 個×25	核酸結合
コレクションチューブ	250 個×2	ろ液回収
①Buffer CL	60 mL×1	細胞溶解(動物組織)
②Buffer BL	60 mL×1	細胞溶解
③Buffer BW **※1**	90 mL×1	カラム洗浄
④Buffer TW **※2**	50 mL×1	カラム洗浄
⑤Buffer AE	60 mL×1	DNA 溶出
⑥Proteinase K ※3	120 mg×1	タンパク質分解
⑦Storage Buffer	7 mL×1	溶解バッファー

4. 製品仕様

製品タイプ	スピンカラム
最大サンプル量	液状の場合:200 µL (細胞の場合 5×10^6個) 固形の場合:20 mg
カラムへの最大ローディング量	750 µL
最小溶出液	30 µL
カラムの最大 DNA 結合量	50 µg

5. 使用上の注意

①Buffer CL、②Buffer BL に沈殿が生じた場合には 56 ℃でインキュベートし、沈殿をよく溶かしてからご使用下さい。

本製品の試薬は、皮膚や眼、気道に対して有害な刺激物を含んでいます。本製品を扱う際は十分に注意し、手袋や保護メガネを着用して下さい。万が一試薬が付着した場合は、速やかに大量の水で洗い、医師の診察を受けて下さい。

②Buffer BL はカオトロピック塩を含んでいます。カオトロピック塩は漂白剤と混ざると反応性の高い化合物を生じる可能性があります。本製品に漂白剤や酸性溶液が混入しないように十分注意して下さい。

6. 必要な試薬・機器類

100 %エタノール、1×PBS、1.5 mL チューブ、ボルテックスミキサー、2 mL チューブ用遠心機、マイクロピペット、マイクロピペット用チップ、ウォーターバス

7. プロトコール

【重要】 実験を始める前の注意事項

※1:③Buffer BW には、初回使用前に<u>エタノール(分子生物学用)(別売)</u>を<u>130 mL</u>加え、合計 220 mL としてからご使用下さい。

※2:④Buffer TW には、初回使用前に<u>エタノール(分子生物学用)</u>(別売)を<u>200 mL</u>加え、合計 250 mL としてからご使用下さい。

※3:⑥Proteinase K (凍結乾燥品)を使用する際は、6 mL の⑦Storage Buffer を加え溶解し、Proteinase K 溶液(20 mg/mL)を調製して下さい。溶解した Proteinase K 溶液は 4 ℃以下で保管して下さい。一度に使用しきれない場合は、小分けして-20 ℃で保管することを推奨します。

＊細胞培養液、動物組織以外のサンプル(血液・毛髪等)から DNA を精製する際は、サンプルに合わせた個別のプロトコール資料をご用意しております。詳しくは関東化学までお問い合わせ下さい。

(細胞培養液)

1) 20 µL の Proteinase K 溶液を 1.5 mL チューブ(別売)の底に加えます。
2) 200 µL のサンプルを 1)のチューブに加えます。サンプル量が 200 µL より少ない場合、1×PBS で容量を調節して下さい。
3) 200 µL の②Buffer BL を 2)のチューブに加え、すぐにボルテックスミキサーで撹拌し懸濁します。56 ℃のウォーターバスで 10 分間インキュベートし、スピンダウンで内壁についた液を落とします。
4) 3) のチューブに 200 µL のエタノール(別売)を加え、すぐにボルテックスミキサーで撹拌し懸濁します。懸濁後にスピンダウンし、チューブ内壁についた液を落とします。
5) 4)の混合液をピペットで SV Column type G に加えます。
6) 室温で 1 分間 6,000×*g* で遠心し、ろ液を捨て新しいコレクションチューブに SV Column type G をセットします。
7) 600 µL の③Buffer BW を 6) の SV Column type G に加え、室温で 1 分間 6,000×*g* で遠心します。ろ液を捨て、新しいコレクションチューブに SV Column type G をセットします。
8) 700 µL の④Buffer TW を 7) の SV Column type G に加え、室温で 1 分間 6,000×*g* で遠心し、SV Column type G をコレクションチューブにセットします。
9) 室温で 1 分間 13,000×*g* 以上で遠心し、④Buffer TW を完全に除去した後、SV Column type G を新しい 1.5 mL チューブ(別売)にセットします。
10) 9) の SV Column type G のメンブレンの中心に 200 µL の⑤Buffer AE または滅菌水を加え、室温で 1 分間静置します。
11) 1 分間 13,000×*g* 以上で遠心し、ろ液(DNA 溶液)を回収します。

(動物組織)

1) サンプルの種類に応じて、手順 1a), 1b), 1c)を選択して下さい。
1a) 肝臓や脳などの柔らかい組織サンプルの場合、20 mg の組織サンプルを 1.5 mL チューブ(別売)に入れます。200 µL の①Buffer CL を加え、マイクロホモジナイザーでサンプルを均一化します。
1b) 硬い組織サンプルの場合、乳棒と乳鉢を用いて液体窒素中で粉末状になるまですり潰します。20 mg の粉末状のサンプルを 1.5 mL チューブ(別売)に入れ、200 µL の①Buffer CL を加えて 15 秒間ボルテックスミキサーで撹拌します。
1c) 上記の方法が使用できないサンプルの場合、20 mg の組織サンプルをできるだけ細かくミンチします。ミンチ状のサンプルを 1.5 mL チューブ(別売)に入れ、200 µL の①Buffer CL を加えて 15 秒間ボルテックスミキサーで撹拌します。
2) 20 µL の Proteinase K 溶液を 1) のチューブに加え、1 分間ボルテックスミキサーで撹拌し、サンプルが完全に溶解するまで 56 ℃のウォーターバスでインキュベートします。
＊溶解時間はサンプルや 1)の処理方法により異なりますが、通常 10 分～3 時間、溶解液が半透明になるまでインキュベートを行なって下さい。インキュベーション中に時々(1 時間に 2～3 回)ボルテックスして撹拌するとより溶解が進みます。また、一晩インキュベートしても問題はありません。
3) 200 µL の②Buffer BL を 2)のチューブに加え、すぐにボルテックスミキサーで撹拌し完全に懸濁します。70 ℃のウォーターバスで 10 分間インキュベートし、スピンダウンで内壁についた液を落とします。
4) サンプルを室温に戻し、細胞培養液のプロトコール 4)以降の操作を行ないます。

関東化学株式会社 試薬事業本部 〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 (03)6214-1090 https://www.kanto.co.jp

取 扱 説 明 書

シカジーニアス® トータルDNAプレップキット(組織用)
Cica Geneus® Total DNA Prep Kit (for Tissue)

◇本取扱説明書の補足資料として、本製品の操作方法を簡潔にまとめたプロトコールシートを当社 HP にて公開しております。こちらの資料もご活用下さい。

https://products.kanto.co.jp/uploads/pj46_m_pdf/760/pdf1.pdf

8. トラブルシューティング

現象	考えられる原因	対策
DNA の回収量が少ない	サンプルが適切に保存されていない	サンプルはフレッシュなものを使用して下さい。
	サンプル量が多すぎる	サンプル量は最大 200 µL にして下さい(液状の場合)。
	サンプル中の細胞数が少ない	サンプル量を増やし、プロトコール 5)でカラムへの通液回数を増やして下さい。
	サンプル中の細胞の懸濁が不十分	プロトコール 3)を参照して下さい。
	Proteinase K 溶液の活性が低下	活性を維持するために、Proteinase K 溶液は 4 ℃以下で保存して下さい。
回収した DNA 溶液を用いた酵素反応がうまくいかない	DNA 溶液の塩濃度が高い	洗浄ステップ(プロトコール 7)～9))を確認し、手順通りに操作して下さい。

9. その他

1) 本製品は試験研究用です。医療や臨床診断の目的には使用しないで下さい。
2) 試薬及び器具等を廃棄する場合には、関係法令に従って処理して下さい。

関東化学株式会社 試薬事業本部 〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 (03)6214-1090 https://www.kanto.co.jp