



Cica Geneus[®] Total DNA Prep Kit (for Tissue)

プロトコールとトラブルシューティング

下記サンプルからのトータルDNA精製

血液または体液
口腔スワブ
唾液と口腔清潔剤
毛髪
精子
吸引法を用いた血液または体液
動物組織
パラフィン包埋組織
アルコールまたはホルマリン固定組織
乾燥血液班
グラム陰性菌
グラム陽性菌
肺炎球菌



Kanto Kagaku

血液または体液用 Protocol

実験を始める前に、本キット付属の取扱説明書記載の「【重要】 実験を始める前の注意事項」をご確認ください。

- 20 μL の Proteinase K 溶液を 1.5 mL チューブの底に加えます。
*細胞濃度が低い場合、サンプル量は最大 400 μL まで使う事が出来ます。
その場合は、サンプル量とともに Proteinase K の量を増やしてください。
— サンプル量 400 μL あたりに 40 μL の Proteinase K 溶液が必要です。
- 下記の初期サンプル量表を参考にサンプルを調整後、200 μL のサンプルを 1. のチューブに加えます。初期サンプル量が 200 μL 以下である場合は、1×PBS を使ってサンプル量を 200 μL に希釈します。

サンプル	最大の量	用意
哺乳類の全血	200 μL	直接使用できます
体液	200 μL	直接使用できます
バフィーコート(白血球層)	200 μL	直接使用できます
鳥類, 魚類, 爬虫類, 両生類の有核血液	10 μL	10 μL の血液を 1x PBS にて、 200 μL に希釈して下さい。
培養細胞やリンパ細胞	5×10^6	5×10^6 個の細胞を 1xPBS にて、 200 μL に希釈して下さい。
ウイルス	200 μL	ウイルスを含む培地 200 μL を 使用できます。

- (オプション) RNase A 溶液(別売)を使用することによって RNA を除去した DNA を精製することができます。その場合は、RNase A 溶液(20 mg/mL) 20 μL をサンプルに加え 2~3 回ピペティングしてから室温で 2 分間インキュベートします。
- 200 μL の②Buffer BL をチューブに加え、すぐにボルテックスミキサーで攪拌し懸濁します。56 $^{\circ}\text{C}$ のウォーターバスで 10 分間インキュベートし、スピンドウンで内壁についた液を落とします。
— Buffer BL 量は、初期サンプル量と 1:1 となるように混合してください。初期サンプル量が 200 μL を超えた場合は、Buffer BL 量も初期サンプル量と等量加えて下さい。
— Buffer BL を加えた後に、サンプルを十分に混合してください。混合が不十分の場合は結果に悪影響が見られることがあります。
— 長時間のインキュベートが DNA 抽出に影響を及ぼすことはありません。

5. 4.のチューブに 200 μL の 100% エタノールを加え、すぐにボルテックスミキサーで攪拌し懸濁します。懸濁後にスピンドウンし、チューブ内壁についた液を落とします。すぐにボルテックスミキサーで攪拌し懸濁します。懸濁後にスピンドウンし、チューブ内壁についた液を落とします。
 - エタノール量は、初期サンプル量と 1:1 となるように混合してください。初期サンプル量が 200 μL を超えた場合は、エタノール量も初期サンプル量と等量加えて下さい。
 6. 5. の混合液をピペットで SV Column type G に加えます。室温で 1 分間 6,000 \times 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。
 - サンプル量が 200 μL 以上である場合は混合液を 2 回に分けて SV Column type G に加えてください。方法としては、まず混合液 700 μL を SV Column type G に加え、遠心分離し、ろ液を捨ててください。その後、空の収集チューブに再セットし、残りの混合液を加え、繰り返し遠心分離を行って下さい。
 - 混合液が完全にフィルター膜を通過しない場合には、全ての溶液が通過するまで最大速度(>13,000 \times g) にて遠心分離を繰り返してください。最大速度での遠心分離は、特にバフィーコート、リンパ球、培養細胞などのように細胞密度の高いサンプルに使用する時には、膜詰まりを防止するために推奨されます。
 7. 600 μL の③Buffer BW を SV Column type G に加え、室温で 1 分間 6,000 \times 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。
 - SV Column type G 内の残渣に着色が見られる場合には、着色が見られなくなるまで遠心分離を繰り返して下さい。詳しくはトラブルシューティングをご覧ください。
 8. 700 μL の④Buffer TW を SV Column type G に加え、室温で 1 分間 6,000 \times 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 \times 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。
 - Buffer TW のキャリーオーバーを防ぐために念入りに遠心分離を行い、SV Column type G を新しい 1.5 mL チューブに移す前までに、Buffer TW を除去して下さい。また、遠心分離は必ず最大速度 (13,000 \times g 以上) にて行って下さい。
 10. 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。その後、1 分間 13,000 \times g 以上で遠心し、ろ液 (DNA 溶液) を回収します。
 - 体液やウイルスといった低細胞密度のサンプルには 50-150 μL の溶出バッファーを用いて下さい。溶出バッファーの種類は、スタートサンプルの状態またはその後の実験における条件に基づいて選択して下さい。
-

- 最適な DNA 溶出結果を得るために、Buffer AE または滅菌水を SV Column type G の膜の就寝に直接分注して下さい。新しい溶出バッファー200 μL を用いて 2 回まで溶出を繰り返すことによって DNA の回収量を高めることができますが、3 回目以降の溶出における効果はわずかです。また、SV Column type G が溶出液に触れてしまうために、300 μL 以上の溶出液は 1.5 mL チューブには回収できません。
 - 高濃度の DNA 溶液が必要な場合や、初期サンプル量が非常に少ない場合は、2 回目の溶出において新しい溶出バッファーではなく、1 回目の溶出バッファーを用いることもできます。また、高濃度を得るために溶出液を 50 μL まで減らすことができます。しかし、溶出バッファーを減らすことは、DNA の回収総量を減少させます。
 - 溶出バッファーを長期保存する際には Buffer AE での溶出をお勧めします。しかし、Buffer AE に含まれる EDTA はその後の実験、例えば酵素反応に悪影響を及ぼす場合があります。この問題を防ぐためには、蒸留脱イオン水 ($>\text{pH}7.0$)、あるいは Tris HCl ($>\text{pH}8.5$) を使用して下さい。
 - 溶出バッファーに水を使う場合には、溶出の前に水の pH を確認して下さい。
-

口腔スワブ用 Protocol

実験を始める前に、本キット付属の取扱説明書記載の「【重要】 実験を始める前の注意事項」をご確認ください。

- 口腔スワブ検体用の場合 ②Buffer BL がキット付属の量では不足する場合があります。その場合は関東化学株式会社までお問い合わせ下さい。
1. 頬の内側を綿棒で5~6回以上強く掻きます。
 - ー 他物質によるコンタミを避けるために、サンプル提供者はサンプル採集の30分前からは何も口にしないで下さい。
 2. 2 mL チューブに綿棒を入れます。滅菌された刃、またはワイヤーカッターにてスワブを柄からはずします。その後、1×PBS 400 μ L をチューブに加えます。
 - ー サンプル間の汚染を防ぐ為にカッターは70%エタノールで洗浄して下さい。
 3. (オプション) RNase A 溶液(別売)を使用することによってRNAを除去したDNAを精製することができます。その場合は、RNase A 溶液(20 mg/mL) 20 μ L をサンプルに加え 2~3回ピペティングしてから室温で2分間インキュベートします。
 4. 20 μ L の Proteinase K 溶液と 400 μ L の②Buffer BL をサンプルに加えます。その後、ボルテックスミキサーにて攪拌して溶液を混合させます。
 - ー 効率的に細胞を溶解するため、サンプルを完全に混合させてください。
 5. 56 °Cのウォーターバスで10分間インキュベートし、スピンドウンで内壁についた液を落とします。
 6. 5.のチューブに400 μ L の100% エタノールを加え、すぐにボルテックスミキサーで攪拌し懸濁します。懸濁後にスピンドウンし、チューブ内壁についた液を落とします。
 7. 6.の混合液を最大で700 μ L SV Column type Gに移します。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。
 - ー SV Column type Gの淵を濡らさないように注意して下さい。
 8. 残りの6.の混合液がすべてなくなるまでステップ7.を繰り返し行います。その後、新しいコレクションチューブにSV Column type Gを再度セットします。
 9. 血液または体液用 Protocol におけるステップ7以降の作業を行って下さい。
-

唾液と口腔清潔剤用 Protocol

実験を始める前に、本キット付属の取扱説明書記載の「【重要】 実験を始める前の注意事項」をご確認ください。

1. 50 mL のコニカルチューブに口腔清潔剤 10 mL を採取、あるいは 50 mL コニカルチューブに 1 mL の唾液を吐いてサンプル採取します。
唾液を用いた場合は 5 mL の 1×PBS 5 mL を加え、ボルテックスミキサーにて攪拌、混合します。
 - ー 他物質によるコンタミを避けるために、サンプル提供者はサンプル採集の 30 分前からは何も口にしないで下さい。
 2. 室温で 5 分間 2,000×g で遠心分離を行い、細胞をペレット状にします。その後、ペレット状の細胞が崩れないように素早く慎重に上清を除去します。さらに 200 μ L の 1×PBS を加え、ペレット状の細胞を完全に懸濁させます。
 - ー 上清除去する際に、ペレット状の細胞が崩れた時は再度遠心を行って下さい。
 3. (オプション) RNase A 溶液(別売)を使用することによって RNA を除去した DNA を精製することができます。その場合は、RNase A 溶液(20 mg/mL) 20 μ L をサンプルに加え 2~3 回ピペティングしてから室温で 2 分間インキュベートします。
 4. 2.(もしくは 3.)のチューブに 20 μ L の Proteinase K 溶液と 200 μ L の②Buffer BL を加えます。その後、ボルテックスミキサーにて攪拌して溶液を混合させます。
 - ー 効率的に細胞を溶解するため、サンプルを完全に混合させて下さい。
 5. 血液または体液用の Protocol におけるステップ 4 以降の作業を行って下さい。
-

毛髪用 Protocol

実験を始める前に、本キット付属の取扱説明書記載の「【重要】 実験を始める前の注意事項」をご確認ください。

- Buffer H を下記終濃度になるように調製して下さい。1 サンプルにつき約 180 μ L の Buffer H が必要となります。
 - 10 mM Tris-HCl, pH8.0,
 - 10 mM EDTA,
 - 100 mM NaCl,
 - 2% SDS,
 - 40 mM DTT(Dithiothreitol)

* DTT は水溶液中にて急速に酸化する為、使用の直前に加えて下さい。

1. 毛髪のサンプルを 1.5 mL チューブに採取します。
 - 初期サンプル量は 30 mg を超えないで下さい。抜いた毛髪のサンプルは毛根から 0.5~1 cm の部分を使う事を推奨します。
 2. 1.に 180 μ L の buffer H と 20 μ L の Proteinase K 溶液を加え、十分にボルテックスミキサーにて攪拌し、溶液を混合させます。
 3. 56°Cのウォーターバスで1時間以上、サンプルが完全に溶解するまでインキュベートします。その後、スピンドウンでチューブ内壁についた液を落とします。
 - サンプルを分散させるために、シーソー式のシェーカーにおいてインキュベートして下さい。毛包は完全に溶解する必要がありますが、毛管は完全に溶解されていなくても、DNA の回収率に影響を与えることはありません。
 4. 血液または体液用の Protocol におけるステップ 3 以降の作業を行って下さい。
-

精子用 Protocol

実験を始める前に、本キット付属の取扱説明書記載の「【重要】 実験を始める前の注意事項」をご確認ください。

- Buffer H2 を下記終濃度になるように調製して下さい。1 サンプルにつき約 100 μ L の Buffer H が必要となります。
 - 20 mM Tris-HCl, pH8.0,
 - 20 mM EDTA,
 - 200 mM NaCl,
 - 4% SDS,
 - 80 mM DTT(Dithiothreitol)

* DTT は水溶液中にて急速に酸化する為、使用の直前に加えて下さい。

1. 100 μ L の精子を 1.5 mL チューブに入れます。さらに、100 μ L の Buffer H2 と 20 μ L の Proteinase K 溶液をチューブに加え、ボルテックスミキサーにて攪拌し、溶液を混合させます。
 2. 56°C のウォーターバスで 1 時間以上、サンプルが完全に溶解するまでインキュベートします。その後に、スピンドウンでチューブ内壁についた液を落とします。
 - サンプルを分解させるために、適時にサンプルを転倒攪拌するか、シーソー式のシェーカーにおいてインキュベートして下さい。
 3. 血液または体液用の Protocol におけるステップ 3 以降の作業を行って下さい。
-

吸引法を用いた血液または体液用 Protocol

実験を始める前に、本キット付属の取扱説明書記載の「【重要】 実験を始める前の注意事項」をご確認ください。

- 20 μL の Proteinase K 溶液を 1.5 mL チューブに加えます。
細胞濃度が低い場合、サンプル量は最大 400 μL まで使う事が出来ます。
その場合は、サンプル量とともに Proteinase K の量を増やして下さい。
ー サンプル量 400 μL あたりに 40 μL の Proteinase K が必要です。
- 下記の初期サンプル量表を参考にサンプルを調整後、200 μL のサンプルを 1. のチューブに加えます。初期サンプル量が 200 μL 以下である場合は、1×PBS を使ってサンプル量を 200 μL に希釈します。

サンプル	最大の量	用意
哺乳類の全血	200 μL	直接使用できます
体液	200 μL	直接使用できます
バフィーコート(白血球層)	200 μL	直接使用できます
鳥類, 魚類, 爬虫類, 両生類の有核血液	10 μL	10 μL の血液を 1x PBS にて、 200 μL に希釈して下さい。
培養細胞やリンパ細胞	5×10^6	5×10^6 個の細胞を 1xPBS にて、 200 μL に希釈して下さい。
ウイルス	200 μL	ウイルスを含む培地 200 μL を 使用できます。

- (オプション) RNase A 溶液(別売)を使用することによって RNA を除去した DNA を精製することができます。その場合は、RNase A 溶液(20 mg/mL) 20 μL をサンプルに加え 2~3 回ピペティングしてから室温で 2 分間インキュベートして下さい。
- 200 μL の②Buffer BL をチューブに加え、ボルテックスで攪拌し完全に懸濁します。56°C のウォーターバスで 10 分間インキュベートし、スピンドウンでチューブ内壁についた液を落とします。
ー Buffer BL 量は、初期サンプル量と 1:1 となるように混合して下さい。初期サンプル量が 200 μL を超えた場合は、Buffer BL 量も初期サンプル量と等量加えて下さい。
Buffer BL を加えた後に、サンプルを十分に混合させて下さい。混合が不十分の場合は結果に悪影響が見られることがあります。インキュベート時間の変化が DNA 抽出に影響を及ぼすことはありません。

5. 4.のチューブに 200 μ L の 100%エタノールを加え、すぐにボルテックスミキサーで攪拌し完全に懸濁します。攪拌後にスピンドウンし、チューブ内壁についた液を落とします。
 - エタノール量は、初期サンプル量と 1:1 となるように混合して下さい。初期サンプル量が 200 μ L を超えた場合は、エタノール量も初期サンプル量と等量加えて下さい。
 6. SV Column type G をバキュームマニホールドのポットに強く固定させます。バキュームアダプターを使用することによって、サンプル間の汚染を防ぐことができます。
 - ルアーコネクターがある市販バキュームマニホールドのほとんどはこの方法で使用できます。
 7. 5. のチューブ内の混合液を SV Column type G に移し、真空ポンプによって溶液を吸引します。
 - 初期のサンプル量が 200 μ L 以上である場合は混合液を複数回に分けて加え、吸引を繰り返して下さい。混合液による膜透過が不十分の場合、遠心分離による精製工程(血液または体液用 Protocol、ステップ 6~)に切り替える事ができます。
 8. 600 μ L の③Buffer BW を SV Column type G に加え、真空ポンプによって溶液を吸引します。
 - SV Column type G 内の残渣に着色が見られる場合には、着色が見られなくなるまで、この作業を繰り返して下さい。詳しくはトラブルシューティングを参照ください。
 9. 700 μ L の④Buffer TW を SV Column type G に加え、真空ポンプによって溶液を吸引します。その後、コレクションチューブに SV Column type G を再度セットします。
 10. 血液または体液用 Protocol におけるステップ 10 以降の作業を行って下さい。
-

動物組織用 Protocol

実験を始める前に、本キット付属の取扱説明書記載の「【重要】 実験を始める前の注意事項」をご確認ください。

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 チューブに入れます。200 μ L 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 チューブに入れ、200 μ L の①Buffer CL を加えて 15 秒間ボルテックスミキサーで攪拌します。

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 チューブに入れ、200 μ L の①Buffer CL を加えて 15 秒間ボルテックスミキサーで攪拌します。

— 組織のサンプルは 卓上（ロースループレット）ホモジナイザーやビーズ式ホモジナイザー等の道具を用いてもサンプルを粉砕することができます。

2. 20 μ L 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攪拌し、サンプルが完全に溶解するまで 56 °C 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）ボルテックスして攪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. (オプション) RNase A 溶液(別売)を使用することによって RNA を除去した DNA を精製することができます。その場合は、RNase A 溶液(20 mg/mL) 20 μ L をサンプルに加え 2～3 回ピペッティングしてから室温で 2 分間インキュベートして下さい。

4. 200 μL の②Buffer BL を 2. または 3. のチューブに加え、すぐにボルテックスミキサーで攪拌し完全に懸濁します。70 $^{\circ}\text{C}$ のウォーターバスで 10 分間インキュベートし、スピンドウンで内壁についた液を落とします。
 - 次のステップに進む前に、サンプルの温度を室温まで戻してください。
 - Buffer BL を加えた後に、サンプルを十分に混合させてください。混合が不十分の場合は結果に悪影響が見られることがあります。
 5. 4. のチューブに 200 μL の 100% エタノールを加え、すぐにボルテックスミキサーで攪拌し懸濁します。懸濁後にスピンドウンし、チューブ内壁についた液を落とします。
 - サンプルとエタノールを完全に混和させてください。また、エタノールを加えた後に、白色の沈殿物が形成されることがありますが、この沈殿物を含む全ての混合物を SV Column type G に加えてください。
 6. 5. の混合液をピペットで SV Column type G に加えます。室温で 1 分間 6,000 $\times g$ 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。
 - 混合液が完全にフィルター膜を通過しない場合には、全ての溶液が通過するまで最大速度 (>13,000 $\times g$) にて遠心分離を繰り返して下さい。最大速度での遠心分離は DNA 抽出に影響を与えません。
 7. 600 μL の③Buffer BW を 6. の SV Column type G に加え、室温で 1 分間 6,000 $\times g$ 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。
 - SV Column type G 内の残渣に着色が見られる場合には、着色が見られなくなるまで遠心分離を繰り返して下さい。詳しくはトラブルシューティングをご覧ください。最大速度での遠心分離は DNA 抽出に影響を与えません。
 8. 700 μL の④Buffer TW を 7. の SV Column type G に加え、室温で 1 分間 6,000 $\times g$ 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 $\times g$ 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 チューブにセットします。
 - Buffer TW のキャリーオーバーを防ぐために念入りに遠心分離を行い、SV Column type G を新しい 1.5 mL チューブに移す前までに、Buffer TW を除去して下さい。
また、遠心分離は必ず最大速度 (13,000 $\times g$ 以上) にて行って下さい。
 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 分間最大速度で遠心し、ろ液 (DNA 溶液) を回収します。
-

- 体液やウイルスといった低細胞密度のサンプルには 50-150 μL の溶出バッファーを用いて下さい。溶出バッファーの種類は、スタートサンプルの状態またはその後の実験における条件に基づいて選択して下さい。
 - 最適な DNA 溶出結果を得るために、Buffer AE または滅菌水を SV Column type G の膜に直接分注して下さい。新しい溶出バッファー 200 μL を用いて 2 回まで溶出を繰り返すことによって DNA の回収量を高めることができますが、3 回目以降の溶出における効果はわずかです。また、SV Column type G が溶出液に触れてしまうために、300 μL 以上の溶出液は 1.5 mL チューブには回収できません。
 - 高濃度の DNA 溶液が必要な場合や、初期サンプル量が非常に少ない場合は、2 回目の溶出において新しい溶出バッファーではなく、1 回目の溶出液を用いることもできます。また、高濃度を得るために溶出液を 50 μL まで減らすことができます。しかし、溶出バッファーを減らすことは、DNA の回収総量を減少させます。
 - 溶出バッファーを長期保存する際には Buffer AE での溶出をお勧めします。しかし、Buffer AE に含まれる EDTA はその後の実験、例えば酵素反応に悪影響を及ぼす場合があります。この問題を防ぐためには、蒸留脱イオン水 (>pH7.0)、あるいは Tris HCl (>pH8.5) を使用して下さい。
 - 溶出バッファーに水を使う場合には、溶出の前に水の pH を確認して下さい。
-

パラフィン包埋組織用 Protocol

実験を始める前に、本キット付属の取扱説明書記載の「**【重要】 実験を始める前の注意事項**」をご確認ください。

1. 細かく刻んだパラフィン処理組織(最大 25 mg)を、2 mL チューブへ加えます。
 - 組織を細かく刻んだ方が効率的に脱パラフィン化されます。
 2. 1. のチューブに 1,200 μ L のキシレンを加え、パラフィンが完全に溶解するまでボルテックスミキサーにて攪拌します。その後、室温で 5 分間 最大速度(>13,000 \times g)で遠心し、上清を除去します。
 - 沈殿物を吸い込まないように注意して下さい。
 3. キシレン残渣を除去するため、2. のチューブに 1,200 μ L の 100% エタノールを加え、ボルテックスミキサーにて攪拌します。室温で 5 分間最大速度 (>13,000 \times g) で遠心し、上清を除去します。
 - 沈殿物を吸い込まないように注意して下さい。
 4. ステップ 3.~4.を 1~2 回繰り返します。
 5. 5. のチューブ蓋を開け、室温で 10~15 分間インキュベートし、チューブ中のエタノール残渣を蒸発させます。
 6. 6. のチューブに 180 μ L の①Buffer CL を加え、ボルテックスミキサーにて攪拌し、沈殿物を完璧に溶解させます。
 7. 「動物組織用 Protocol」におけるステップ 2 以降の作業を行って下さい。
-

アルコールまたはホルマリン固定組織用 Protocol

実験を始める前に、本キット付属の取扱説明書記載の「【重要】 実験を始める前の注意事項」をご確認ください。

1. 固定組織を清潔な吸収紙上に取り出し、余分な固定液を除去します。その後、固定組織（最大 20mg）を細かく刻み、1.5 mL チューブに加えます。
 - 組織を細かく刻んだ方が効率的に溶解できます。
 2. 1. のチューブに 400 μ L の 1×PBS を加えます。その後、ボルテックスにて攪拌し、沈殿物を吸い込まないように注意しながら上清を除去します。
 - 上清を除去にはマイクロピペットを使用することをお勧めします。
 3. ステップ 2. を 1~2 回繰り返します。
 4. 3. のチューブに 180 μ L の①Buffer CL を加えます。
 5. 「動物組織用 Protocol」におけるステップ 2 以降の作業を行って下さい。
-

乾燥血液班用 Protocol

実験を始める前に、本キット付属の取扱説明書記載の「**【重要】 実験を始める前の注意事項**」をご確認ください。

本プロトコルはろ紙にスポットし、乾燥した未処理血液および抗凝固剤で処理した血液からのトータル DNA 精製用です。

1. 乾燥血液班から打ち抜いたディスク 3~4 枚を 1.5 mL チューブに入れ、200 μ L の①Buffer CL を加えます。
 - 一穴式の紙パンチを使用し、直径 3 mm (1/8 インチ) の乾燥血液班を打ち抜いて下さい。
 2. 85°Cで 10 分間インキュベートします。その後スピンドウンし、チューブ内壁についた液を落とします。
 - 15 分以上のインキュベートは避けてください。
 3. 20 μ L の Proteinase K 溶液を 1.5 mL チューブに加え、56°Cのウォーターバスで 1 時間インキュベートします。インキュベート後にスピンドウンし、チューブ内壁についた液を落とします。
 4. 3. のチューブに 200 μ L の②Buffer BL を加え、ボルテックスミキサーにて攪拌し溶液を完全に混合させます。さらに 70°Cのウォーターバスで 10 分間インキュベートした後、スピンドウンを行い、チューブ内壁についた液を落とします。
 - サンプルと Buffer BL は十分に混合させてください。完全に均一な溶液を形成することが重要です。Buffer BL との混合後に白色の沈殿物が形成されることがありますが、ほとんどの場合、70°Cのインキュベート中に溶解します。また、この沈殿物が DNA の回収量に影響を与えることはありません。
 5. 「動物組織用 Protocol」におけるステップ 5 以降の作業を行って下さい。
-

グラム陰性菌用 Protocol

実験を始める前に、本キット付属の取扱説明書記載の「【重要】 実験を始める前の注意事項」をご確認ください。

1. 1.5 mL チューブに集めた細胞 (2×10^9 cells まで) を室温で1分間最大速度にて遠心分離し、上清を捨てます。
 - 一晩培養された細胞培養液 1~2 mL から $1 \sim 2 \times 10^9$ 個の細胞が回収できます。
 2. 200 μ L の①Buffer CL を 1. のチューブに加え、再懸濁します。
 3. 20 μ L の Proteinase K 溶液を 2. のチューブに加え、56°Cのウォーターバスで15分間インキュベートします。
 - 完全に溶解すると溶液は透明になります。インキュベート後に濁りが見られる場合には、溶液が透明になるまで引き続きインキュベートを行ってください。細胞種や数により完全に溶解するまでの時間は異なります。インキュベート時間を延ばすことにより DNA の回収量に影響することはありません。
 4. インキュベート後、スピンドウンでチューブ内壁についた液を落とします。
 5. 「動物組織用 Protocol」におけるステップ3以降の作業を行ってください。
-

グラム陽性菌用 Protocol

実験を始める前に、本キット付属の取扱説明書記載の「【重要】 実験を始める前の注意事項」をご確認ください。

- Buffer GP を下記終濃度になるように調製して下さい。1 サンプルにつき約 180 μ L の Buffer GP が必要となります。
20 mM Tris-HCl, pH 8.0,
2 mM EDTA,
1.2% Triton X-100, pH 8.0

■ 酵素溶液の準備

使用する直前に酵素（リゾチームまたはリゾスタフィン）を Buffer GP に溶解させ、下記濃度の酵素溶液を調製して下さい。溶解した酵素溶液を一度に使用しきれない場合は、小分けして -20 $^{\circ}$ C で保管することを推奨します。

リゾチーム溶液 : 30 mg/mL

リゾスタフィン溶液 : 300 μ g/mL

**Staphylococcus* の様なある特定の種については、リゾチームの代わりにリゾスタフィン（あるいはリゾチームとリゾスタフィンの混合液）処理を行うことにより、より効率的な溶解液の回収を行うことができます。しかし、リゾチームのみでも多くのグラム陽性菌については細胞壁を十分に溶解することができます。

1. 1.5 mL チューブに集めた細胞 (2×10^9 cells まで) を室温で 1 分間最大速度にて遠心分離し、上清を捨てます。
 2. 1. のチューブに 180 μ L の予め調製しておいた酵素溶液を加え、細胞を再懸濁させます。37 $^{\circ}$ C のウォーターバスにて 30 分間インキュベートします。
 - この処理により、細胞が溶解しやすくなります。
 3. (オプション) RNase A 溶液 (20 mg/mL) を使用することによって RNA を除去した DNA を精製することができます。その場合は、RNase A 溶液 20 μ L をサンプルに加え 2~3 回ピペティングしてから室温で 2 分間反応させて下さい。
 4. 20 μ L の Proteinase K 溶液と 200 μ L の②Buffer BL を加え、ボルテックスミキサーにて均一に攪拌します。
 5. 56 $^{\circ}$ C のウォーターバスで 30 分間インキュベートした後、さらに 70 $^{\circ}$ C のウォーターバスで 30 分間インキュベートします。
-

— もしサンプルが何らかの病原体に感染している場合には 70°Cのウォーターバスで 30 分間インキュベートする代わりに 95°Cで 15 分間インキュベートすることをお勧めします。95°Cで長時間インキュベートすると DNA が分解しますので、インキュベート後は速やかに室温で冷却してください。

6. インキュベート後、スピンドウンでチューブ内壁についた液を落とします。
7. 「動物組織用 Protocol」におけるステップ 5 以降の作業を行ってください。



肺炎球菌用 Protocol

実験を始める前に、本キット付属の取扱説明書記載の「【重要】 実験を始める前の注意事項」をご確認ください。

■ リゾチーム溶液の準備

使用する直前に 20 mg/mL のリゾチーム溶液を調製してください。溶解した酵素溶液を一度に使用しきれない場合は、小分けして-20 °Cで保管することを推奨します。リゾチーム濃度 (Unit/mg) はメーカーによって異なるため、添加量は各自計算し、使用してください。

1. ブレインハートインフュージョンブイヨン (製品番号 710135-5、関東化学株式会社) で培養した肺炎球菌培養液 ($A_{600}=1$) を 1.5 mL チューブに加え (2×10^9 cells まで)、室温で 10 分間 $5,000 \times g$ にて遠心します。遠心後に、細胞がペレット状になったことを確認し、上清を捨てます。
 2. 1. のチューブに 180 μ L の予め調製しておいたリゾチーム溶液を加え、ピペッティングを行い、溶液を混和させます。その後、37°Cのウォーターバスにて 30 分間インキュベートします。
 3. 2. のチューブに 20 μ L の Proteinase K 溶液と 200 μ L の②Buffer BL を加え、ボルテックスミキサーにて均一に攪拌します。その後、56°Cのウォーターバスにて 30 分間インキュベートします。
 4. 3. のチューブに 200 μ L の 100% エタノールを加え、ボルテックスミキサーにて攪拌します。
 5. 4. の混合液を SV Column type G に加えます。その後、室温で 1 分間 $6,000 \times g$ 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。
 6. 600 μ L の③Buffer BW を SV Column type G に加え、室温で 1 分間 $6,000 \times g$ 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セットします。
 7. 700 μ L の④Buffer TW を SV Column type G に加え、1 分間 $6,000 \times g$ で遠心します。ろ液を捨て、SV Column type G をコレクションチューブに再度セットします。
 8. 室温で 1 分間、最高速度で遠心し、④Buffer TW を完全に除去した後、SV Column type G を新しい 1.5 mL チューブにセットします。④Buffer TW のキャリーオーバーを防ぐために念入りに遠心分離を行い、SV Column type G を新しい 1.5 mL チューブに移す前までに、
-

- ④Buffer TW を除去して下さい。また、遠心分離は必ず最大速度 ($>13,000 \times g$) にて行って下さい。
9. 8. の SV Column type G のメンブレンの中央に 200 μL の⑤Buffer AE を加え、室温で 1 分間静置します。
10. 1 分間最大速度で遠心し、ろ液 (DNA 溶液) を回収します。
-

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	使用する細胞数が少なすぎる	使用する組織や血液によっては、細胞濃度が少なくなる場合があります。その場合には、使用するサンプル量を増やすか、カラムにアプライする回数を増やしてください。または、溶出液の量を減らしてください。 細胞量が少ない場合は、キャリアを使用することをお勧めします。 (例: Poly-dN、グリコーゲン、バッファ-BL に溶解した 20-40 ug/ mL の tRNA 等)
	使用する細胞数が多すぎる	最大添加量以上のサンプルを用いると、溶解が十分にできなくなり、DNA の回収量が少なくなります。使用するサンプル量を減らすか、使用する Buffer の量を増やして下さい。
	細胞の溶解が不十分	細胞の溶解が不十分の場合、いくつかの原因が考えられます。 <ul style="list-style-type: none"> — Buffer BL を用いた攪拌が不十分 — Proteinase K が分解されている — 組織の破壊が不十分 プロトコル通りに Buffer BL を添加した後、すぐにボルテックスにより完全に攪拌して下さい。サンプルの細胞量が多い場合は、使用するサンプル量を減らすか、Buffer BL を 2 倍量まで加えてください。完全にサンプルが融解するまで攪拌を続けてください。完全に融解したサンプル溶液中には粒子が見えなくなります。 活性を維持するために、Proteinase K 溶液は必ず 4°C 以下で保存して下さい。長期保存する場合は小分けにし、-20°C で保存して下さい。
	溶出液が不適切	DNA の溶出液は、Buffer AE 以外にも使用いただけます。Buffer AE 以外の溶出液を使用する際は、塩濃度が低く、アルカリ性 (7<pH<9) のものをご使用ください。
洗浄後も残渣に色が付いている	溶解が不十分	溶解が不十分だと、SV Column 膜上に着色された残渣残ってしまう可能性があります。「DNA の回収量が少ない」の「細胞の溶解が不十分」の項目をご確認ください。

	ヘモグロビンが十分に除かれていない	動物の全血からの DNA 精製の場合、血液からヘモグロビンを除くのが難しくなります。Buffer TW を加える前に Buffer BW を追加し、十分に洗浄を行ってください。
カラムが詰まる	溶解が不十分	溶解が不十分だと、カラムが詰まってしまう。「DNA の回収量が少ない」の「細胞の溶解が不十分」の項目をご確認ください。
A260/280 値が高い	RNA のコンタミネーションが起きている	残留した RNA は精製後 DNA の下流の酵素反応を阻害する可能性があります。RNA フリーの DNA が必要になる場合、プロトコル中の RNase 処理を行ってください。
A260/280 値が低い	溶解が不十分	溶解が不十分だと、DNA の精製度が低くなります。原因としては、Buffer BL との混合が不十分。サンプルの細胞数が多すぎる、Proteinase K の活性の低下等が考えられます。
	ヘモグロビンが十分に除かれていない	動物の全血からの DNA 精製の場合、血液からヘモグロビンを除くのが難しくなります。Buffer TW を加える前に Buffer BW を追加し、十分に洗浄を行ってください。
産物の DNA 濃度が低い	サンプルの細胞数が少なすぎる(溶出バッファ量が多すぎる)	サンプルの細胞量を増やし、Buffer も追加してください。さらに、溶出液の量を 50 μ L にするか、溶出を繰り返してください。(詳細については、プロトコル中の抽出の項目をご参照ください。)
DNA が分解されている	サンプルが古すぎるか保管状況が適切ではない	状態の悪いサンプルは DNA が分解されている可能性があります。新鮮なサンプルをご使用ください。
精製した DNA をアガロースゲルにロードする際、浮かび上がってくる	Buffer TW 中のエタノールが残留している	Buffer TW の洗浄ステップがプロトコル通りに行われているかご確認ください。溶出バッファを添加する前に SV Column 膜を完全に乾燥させてください。
産物の DNA の酵素反応が阻害される	DNA の精製度が低い	「A260/280 値が低い」の項目をご確認ください。
	RNA のコンタミネーション	残留した RNA は精製後 DNA の下流の酵素反応を阻害する可能性があります。RNA フリーの DNA が必要になる場合、プロトコル中の RNase 処理を行ってください。
	ヘモグロビンが十分に除かれていない	動物の全血からの DNA 精製の場合、血液からヘモグロビンを除くのが難しくなります。Buffer TW を加える前に Buffer BW を追加し、十分に洗浄を行ってください。

	溶出液の塩濃度が高すぎる	洗浄ステップがプロトコル通りに行われているかご確認ください。Buffer TWを追加し洗浄回数を追加することで、残留した塩を溶出できます。
Buffer BL、CLに沈殿が生じている	Buffer BL、CLが冷蔵で保存されている	Buffer BL、CLを37°Cでインキュベートし、沈殿が完全に消えてからご使用ください。
