

FastGene™

ゲノムDNA抽出キット (培養細胞)

Cat.No. FG-GD050C



目次

製品説明.....	2
製品内容.....	2
製品仕様	3
必要な試薬及び器具	3
スピncラム使用上の注意事項	3
DNA 抽出プロトコルの簡易フロー.....	4
トラブルシューティング.....	6
保存及びその他の注意.....	7
保証期間.....	7

製品説明

本製品は均一な連続孔を持つフィルター型シリカモノリスをチップ先端に固定したモノリス固相スピncラムで、DNAがシリカゲル（シリカは石英などの結晶性シリカと、シリカゲル・未焼成の珪藻土や生物中に存在する非結晶性シリカの2つに大別される。）に吸着する特性を利用して培養細胞からゲノム DNA の抽出を行います。本製品を使用することで、培養細胞からゲノム DNA を高効率で抽出できます。また不純物の除去率が高く、抽出したゲノム DNA 溶液中に無機塩類がないことも本製品の特徴です。本製品で抽出されたゲノム DNA で、高効率の PCR 増幅が可能であり、蛍光シーケンス法により 98%以上の精度で 190 塩基以上の解析が可能であると確認されています。FastGene™ ゲノムDNA抽出キット（培養細胞）の性能を十分に発揮させるため、本取扱説明書をよくお読みの上、正しくお使いください。

製品内容

本製品を受け取りましたら、梱包内容、スピncラムの外観、数量、Buffer等に異常がないか確認してください。内容違い、数量違い、スピncラムの外観等に異常がありましたら、すみやかに弊社へご連絡ください。

内容	容量
スピncラム (FastGene Cell Column)	50本×1袋
Cell Buffer C1 (細胞溶解・吸着)	55 mL
Cell Buffer C2 (洗浄) ^{*1}	28 mL
Cell Buffer C3 (溶出) ^{*2}	6 mL
Proteinase K (20 mg/mL)	0.5 mL

* 溶出液を回収するチューブは付属しておりません。別途 1.5 mL~2.0 mL の滅菌済み遠心チューブを用意してください。

※1 Cell Buffer C2には、揮発性の高いエタノールが含まれています。ご使用後は、蒸発を防ぐために必ず蓋を閉めてください。

※2 Cell Buffer C3は、10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA (pH 8.5)です。

製品仕様

	ヒト培養細胞からの抽出
操作時間	15 分間～
最大 DNA 結合量	～ 50 µg
溶出量	20～ 100 µL
推奨処理量	～1×10 ⁷ 細胞
DNA の純度	A260/A280≒1.7～ 2.3 A260/A230≒1.7～ 2.2

必要な試薬及び器具

- ① FastGene™ ゲノムDNA抽出キット (培養細胞)
- ② イソプロパノール (特級)
- ③ 1.5 mL～2.0 mL 滅菌済み遠心チューブ
- ④ 高速マイクロ遠心機 (20,000 × g (15,000 rpm)の遠心が可能なもの) *
- ⑤ ドライバスと 1.5 mL または 2.0 mL チューブ用ヒートブロックまたはウォーターバス (70℃で使用可能なもの)
- ⑥ ボルテックスミキサー (2,500 rpm 程度の攪拌ができるもの)
- ⑦ マイクロピペット、マイクロピペット用チップ

* 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。

また本書での以下の基本計算式をもとに相対遠心加速度 (× g) と回転数 (rpm) を算出しております。

ローターの回転半径は、遠心機によって変わりますので、遠心機取扱説明書のローター仕様ページをご確認ください。

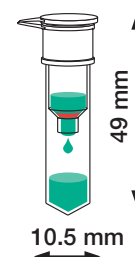
基本計算式

$$RCF = 1.118 \times R \times N^2 \times 10^{-6}$$

RCF : 相対遠心加速度 (× g) R : 回転半径 (mm) N : 回転数 (rpm)

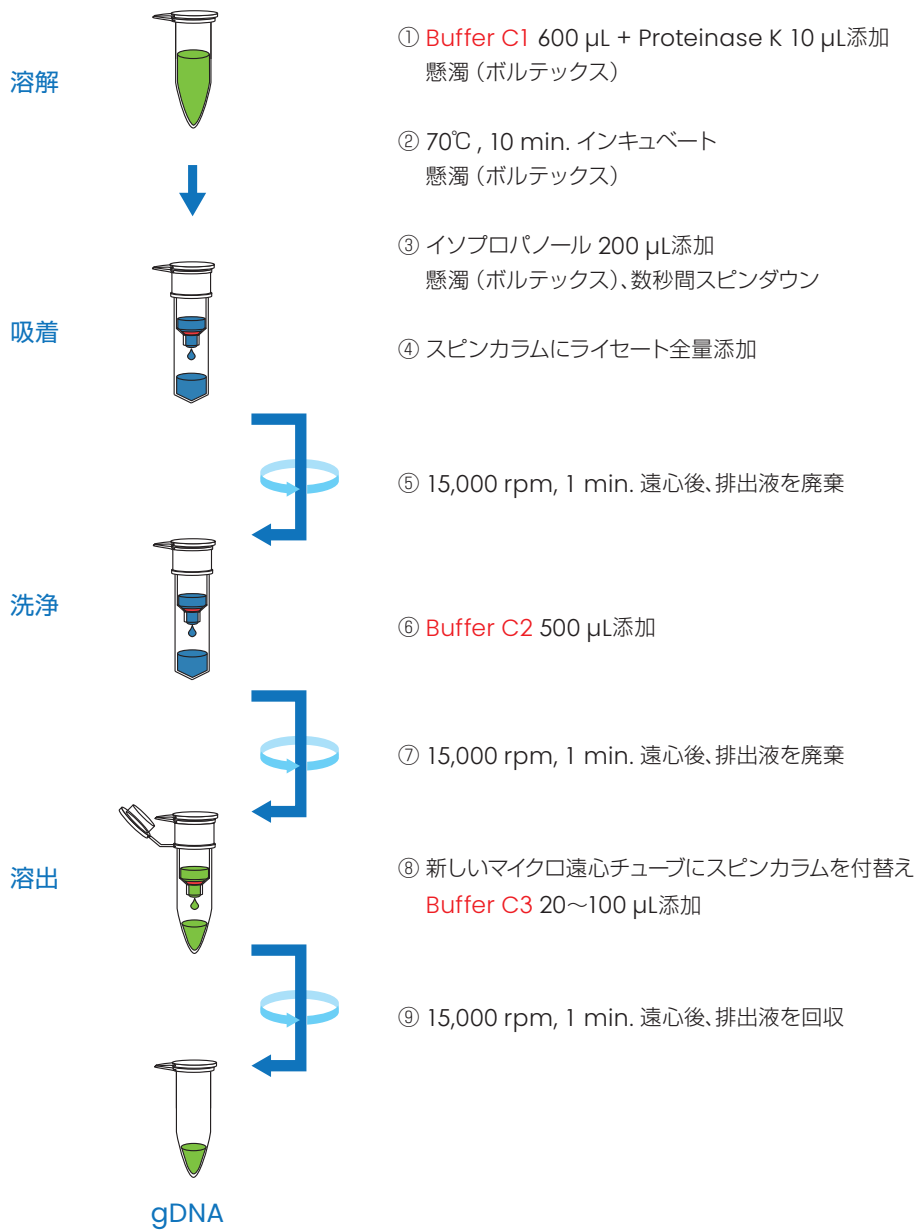
スピнкаラム使用上の注意事項

- スピнкаラムを落としたり、ぶつけたりしないでください。強い衝撃を与えるとシリカモリスが割れることがあります。
- オートクレーブ処理を行う場合には 110℃以下、20 分以内で行ってください。
- スピнкаラムは従来のタイプより通液抵抗が小さくなっておりますので、液の流出を止める場合にはスピнкаラムの蓋を閉めてください。
- 遠心機を用いる場合はチューブ類が装置の蓋などに接触しない事を確認の上で使用ください。サイズは右図をご参照ください。
- 遠心操作は、すべて室温 (15℃ ~ 25℃)で行ってください。
- 遠心操作時はチューブの蓋を閉めた状態で使用してください。蓋を閉めた状態では、スピнкаラム内が陰圧になるため、スムーズに通液されない場合には、スピнкаラムの蓋を開けてください。
- 精製 DNA を分子生物学的操作に用いる場合には、十分に滅菌された容器や滅菌水などを用いてください。
- 本製品は消耗品ですので再使用はできません。
- ご所属の施設の規定に従い作業してください。また、スピнкаラムの廃棄の際には、遺伝情報が残らないことと、感染症への配慮を考慮してください。
- 余ったBufferの廃棄方法は、安全データシート (SDS)に記載された通り廃棄ください。



DNA 抽出プロトコルの簡易フロー

培養細胞をPBS希釈 ~200 μL ($\sim 1 \times 10^7$ 細胞)



<注意事項>

- 工程①：新鮮培養細胞又は凍結培養細胞を準備してください。培養細胞をPBSで希釈し、 1×10^7 Cells/200 μ L PBSとなるように調製後、Cell Buffer C1 を 600 μ L 加えてボルテックスミキサーなどで激しく攪拌してください。
- 注 1) 培養細胞量が多すぎた場合、スピнкаラムの目詰まり、回収量減少、精度低下の可能性があります。目詰まりした場合は、細胞量を減らして検討してください。DNA が分解するため、室温で細胞を放置しないでください。
- 注 2) 凍結細胞を使用する場合は、室温にしてから直ちにPBSで希釈し、その後Cell Buffer C1 を加えてください。新鮮な細胞を使用する場合は、所定量の細胞へ Cell Buffer C1 を加えてください。
- 注 3) Cell Buffer C1 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。
- 工程②：70℃で 10 分間加熱します（インキュベーション）。加温しながら時々ボルテックスしてよく溶解してください。
- 注) ボルテックスしない場合、所定量の細胞でも完全に溶解しない場合があります。溶解しにくい場合は、加温時間を延長してください。
- 工程③：特級イソプロパノールを 200 μ L 添加し、ボルテックスして混和します。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。ライセート完成後は、速やかに抽出操作を行ってください。
- 工程④：ライセートを数回ピペティングし、スピнкаラムに全量添加します。
- 工程⑤：スピнкаラムを20,000 $\times g$ (15,000 rpm) にて 1 分間遠心します。遠心機からスピнкаラムとコレクションチューブを注意深く取り出します。コレクションチューブ内の排出液を捨て、スピнкаラムに再装着してください。
- 注) 試料によっては凝集物ができることがありますが、すべての凝集物ごとスピнкаラムへ添加します。遠心後ライセートがスピнкаラム内に残っている場合、最高速度で再度遠心操作を行ってください。
- 工程⑥：注意深くスピнкаラムの蓋を開け、Cell Buffer C2 を500 μ Lを添加します。
- 工程⑦：スピнкаラムを20,000 $\times g$ (15,000 rpm) にて 1 分間遠心します。遠心機からスピнкаラムとコレクションチューブを注意深く取り出します。排出液が入ったコレクションチューブを捨てます。
- 注) 遠心後 Cell Buffer C2 がスピнкаラム内に残っている場合、最高速度で再度遠心操作を行ってください。または、スピнкаラムの蓋を開けて遠心してください。
- 注) Cell Buffer C2 が残留すると回収率が悪くなる場合がありますので注意してください。また、溶出液に混入すると、PCR阻害が生じることがあります。
- 注) スピнкаラム内部のふちに液が残った場合はキムワイブ等でふき取ってください。
- 工程⑧：スピнкаラムを新しい遠心チューブにのせかえます。注意深くスピнкаラムの蓋を開け、Cell Buffer C3 を 20~100 μ L モノリス表面の中央に添加してください。
- 工程⑨：20,000 $\times g$ (15,000 rpm) で 1 分間遠心し、溶出します。遠心機からスピнкаラムと遠心チューブを注意深く取り出し、スピнкаラムを捨てます。例えば：100 μ L で溶出する場合は 50 μ L で 2 回溶出するとDNAの回収量が増加します。
- 以上で培養細胞のゲノムDNA抽出は完了です。
- 注) スピнкаラムに添加した溶出 Cell Buffer C3 は、ほぼ全量が回収されます。溶出液量を 10 μ L まで下げられますが、その場合、収量が低下します。
- * 回収したゲノム DNA をすぐに使用しない場合は、回収容器のキャップをしっかりと閉めた後、-20℃で保存することをお勧めします。
- * 本製品に同封されている Cell Buffer C3 以外に、RNase・DNase フリー滅菌水に置き換えることができます。その場合、pH により回収率が変動するため、アンモニア水や水酸化カリウムなどで pH 8.5~9.0 に調整してご使用ください。

<培養細胞に関する注意事項>

- ① 培養細胞をすぐに使用しない場合は、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、溶解を繰り返すと、DNA が分解したり、回収量が減少することがあります。
- ② 処理可能量を超えた培養細胞をロードすると、性能が低下し、最悪の場合、スピнкаラムの目詰まりを引き起こします。

<操作に関する注意事項>

- ① 所定量の Cell Buffer C1 を培養細胞へ添加してください。試薬容量はプロトコルに記載された量を厳守してください。
- ② 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してください。
- ③ 遠心後、遠心機からスピнкаラムとコレクションチューブを取り外す際は、排出液がスピнкаラム先端に付着しないよう注意深く取り外してください。付着した場合は、軽くスピндаウンを行ってください。
- ④ 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。
- ⑤ 抽出の途中では時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- ⑥ 感染性のおそれのあるサンプルを使用した場合、使用后廃棄する場合は、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。
- ⑦ 動物組織、口腔粘膜細胞、植物組織の場合で試薬とプロトコルが異なります。所定の試薬とプロトコルをお使いください。

トラブルシューティング

トラブル	予想原因	対処法
DNA回収量が少ない (ない)	培養細胞とCell Buffer C1との混和が不十分なために細胞溶解が不完全	培養細胞に加えたCell Buffer C1の量を確認 Cell Buffer C1に添加後、ボルテックスで完全に溶解させる
	インキュベーション時間が不十分なためにCell Buffer C1中での細胞溶解、タンパク質変性が不完全	新しいサンプルで再度DNA精製を行う 培養細胞サンプルが完全に溶解したかを確認し、溶解が不完全な場合にはインキュベーション時間を延長する
	スピнкаラムにロードする前にライセートにイソプロパノールを添加していない	イソプロパノール 200 μ Lを正確に添加したか確認する メタノールやメチルエチルケトンのような物質を含んだ変性アルコールは使用しない 新しいサンプルで再度DNA精製を行う
	DNAの溶出が効率的でない	モノリス表面の中央部分にCell Buffer C3を添加して全体が馴染むようにする 溶出効率を高めるため、スピнкаラムにCell Buffer C3あるいは精製水をピペットで添加後、遠心操作前に室温でスピнкаラムを1分間インキュベートする
	溶出BufferのpHが適正でない (酸性)	DNAは10 mMのTris-HCl, pH 8.5~9.0或いは精製水のみで溶出させる 溶出効率はpHに依存し、pH 7.0~8.5で効率が最も高く、低いpHではDNA収量を低下させることがある 精製水で溶出したい場合はpHが7.0以下でないことを確認するか、Cell Buffer C3を溶出に使用する
	Cell Buffer C2とCell Buffer C3の順番を間違えて使用	Cell Buffer C2とCell Buffer C3をプロトコルの順序に従って使用したか確認 新しいサンプルで再度DNA精製を行う
	多量のCell Buffer C3で溶出	100 μ L以下で溶出を行う場合は、溶出液中のDNA濃度は増加するが、トータルのDNA収量が多少低下する 微量DNAを含むサンプルには20 μ LのCell Buffer C3あるいは精製水での溶出を推奨する
	溶出液が適切でない	Cell Buffer C3 あるいはアンモニア水や水酸化カリウムなどでpH 8.5~8.8に調整した水を使用する
精製した核酸のA260/A280比率が高い	スピнкаラムにロードする前にライセートにイソプロパノールを添加していない	新しいサンプルで再度DNA精製を行う
	Cell Buffer C1が残っている、またはCell Buffer C2による洗浄が不十分	DNA溶液をエタノール沈殿法で精製する

トラブル	予想原因	対処法
精製した核酸のA260/A280比率が高い	溶出液中にエタノールが残留、不純物が混入	溶出の前に洗浄ステップを行ったことを確認する 洗浄工程の追加又はDNA吸着後、スピнкаラムにCell Buffer C2を500 µL添加して、5分間室温でインキュベートしてから、遠心する
	RNAの残留量が多い	プロトコルに記載されているRNase Aなしでの精製でなく、RNAフリーを求める場合、精製後のDNA溶液をRNase Aで処理すること RNase A溶液での処理方法 PCRの前にテンプレートDNA溶液に含まれるRNAを除去する場合、溶出DNA 200 µLに対し0.5 µLのRNase A (20 mg/mL) 溶液を入れ、37°Cで15分間インキュベーションする
	サンプル中のDNA量が不十分	溶出液中にDNAが少ない場合は、添加する溶出液量を増やす必要に応じて、DNAを真空濃縮するか、使用するサンプル量を増やして、再度精製を行う 精製したDNA量が相変わらず少ない場合には、溶出量を50 µLに減少する溶出量を減少するとトータルDNA量はわずかに低下するが、溶出液中の核酸濃度は増加する スピнкаラム上に残留したDNAは溶出ステップ後に、同一溶出液を再度スピнкаラムにアプライし溶出ステップを繰り返して回収できる
ライセートがスピнкаラムを完全に通過しない	細胞量が多く、完全に溶解されていない	プロトコル通りの細胞量で使用する 最高速度で1分間あるいは全ライセートがモノリスを通過するまで遠心分離する

保存及びその他の注意

- 室温 (15-25°C) で保存してください。*Proteinase Kのみ冷蔵保存 (2-8°C)
- Cell Buffer C2には、揮発性の高いエタノールが含まれています。ご使用後は、蒸発を防ぐために必ず蓋を閉めてください。
- ゲノムDNA抽出・精製キットは温度変化が小さく、湿気の少ない涼しく清浄な暗所に保管してください。
- ゲノムDNA抽出・精製キットは厳しい品質管理のもとで製造、検査、包装、出荷しておりますが、万一不具合がありましたら弊社までご連絡ください。
- 本製品は培養細胞からのゲノムDNA抽出・精製の目的で製造しております。それ以外の目的での使用および本取扱説明書に基づかない方法では使用しないでください。
- 本試薬キットを使用前に、安全データシート (SDS) の記載内容をご一読ください。
安全データシート (SDS) の詳細は弊社 HP (URL <https://www.n-genetics.com/>) よりダウンロードして入手願います。

保証期間

- 各種 Buffer の保証期間は未開封、室温保存 (15-25°C) で18ヵ月です。*Proteinase Kのみ冷蔵保存 (2-8°C) で18ヵ月です。

ゾルーゲル法によるシリカモノリスは、国立大学法人京都大学 曾我直弘先生、中西和樹先生により開発されました。この技術と、ジーエルサイエンス株式会社が所有する製品商標及び特許のライセンスを受けて開発・製造しています。



日本ジェネティクス株式会社 〒112-0004 東京都文京区後楽1-4-14 後楽森ビル18階
<https://n-genetics.com> ☎ info@genetics-n.co.jp ☎ 03 (3813) 0961 ☎ 03 (3813) 0962