

FastGene™

ゲノムDNA抽出キット (組織)

Cat.No. FG-GD050T



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нка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нкаラムで、DNAがシリカゲルに吸着する特性を利用してヒトや動物組織からゲノムDNA抽出を行います。本製品を使用することで、様々な組織からゲノム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（組織）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нкаラムの外観、数量、Buffer液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нка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нкаラム（FastGene Tissue Column）	50本×1袋
Tissue Buffer T1（懸濁、消化） ^{※1}	22 mL
Tissue Buffer T2（組織溶解・吸着）	28 mL
Tissue Buffer T3（洗浄1） ^{※2}	28 mL
Tissue Buffer T4（洗浄2） ^{※2}	28 mL
Tissue Buffer T5（溶出） ^{※3}	6 mL
Proteinase K（20 mg/mL）	1 mL

* 溶出液を回収するチューブは付属していません。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 Tissue Buffer T1に析出物がみられる場合には、約40℃で再溶解してから使用してください。

※2 Tissue Buffer T3とTissue Buffer T4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。

※3 Tissue Buffer T5は、10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA (pH 8.5)です。

製品仕様

	ヒト・動物組織からの抽出
操作時間	30分間～
最大DNA結合量	～50 µg
推奨処理量	～30 mg
溶出量	10～100 µL
DNAの純度	A260/A280≒1.7～2.3

必要な試薬及び器具

- ① FastGene™ ゲノムDNA抽出キット (組織)
- 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。

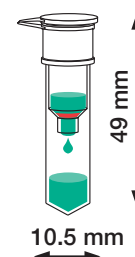
基本計算式

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

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

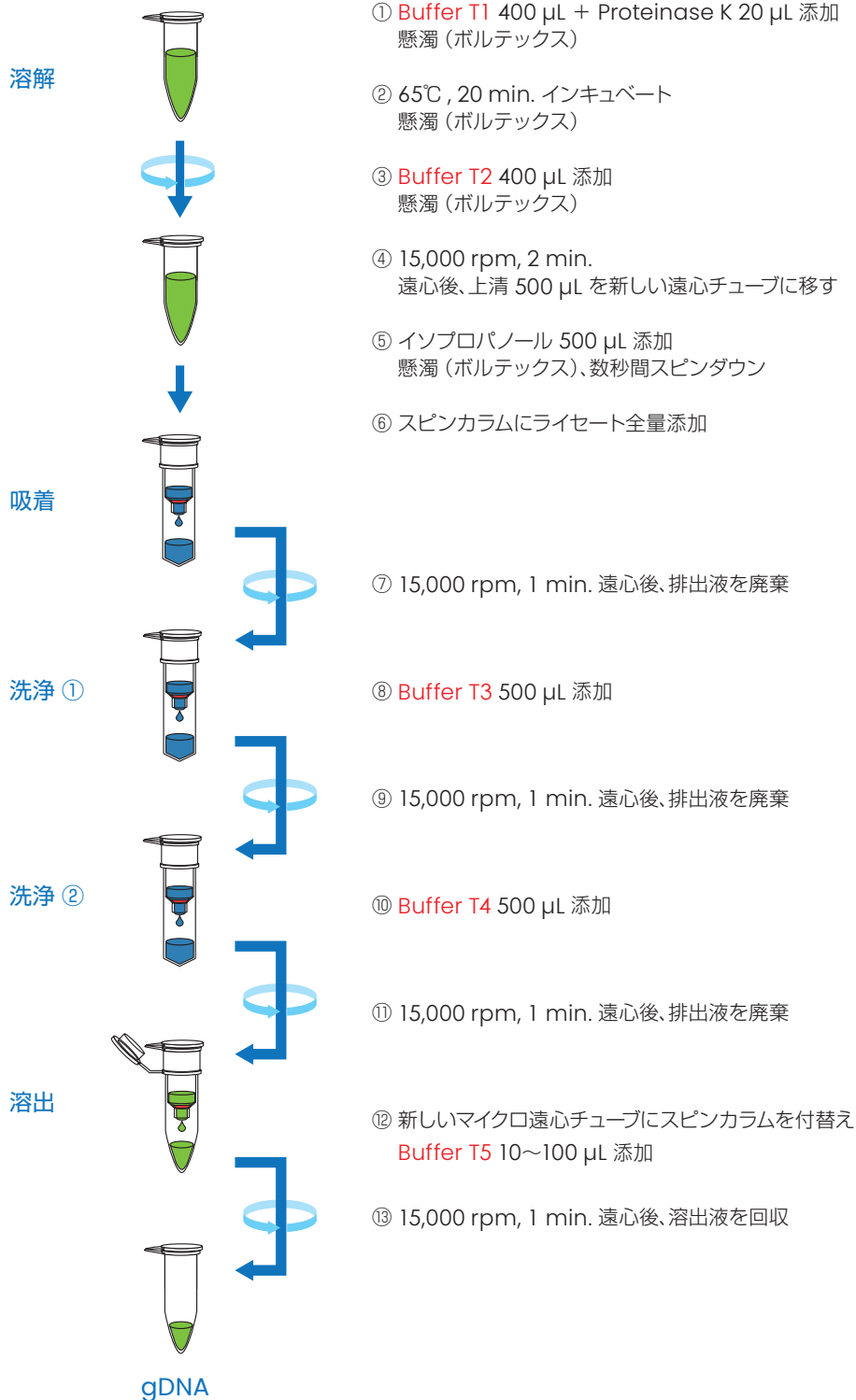
スピнкаラム使用上の注意事項

- 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ノ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。
- ご所属の機関の倫理委員会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

細かく切断した組織～30 mgを遠心チューブに入れる



<注意事項>

- 工程①：新鮮または凍結組織を準備します。400 μ L Tissue Buffer T1、20 μ L Proteinase Kを加えて激しく混和（ボルテックス）します。Tissue Buffer T1に析出が見られる場合は、約40°Cで再溶解した後に使用してください。
- 注) 組織の量が多すぎた場合、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、組織量を減らして検討してください。また組織の量が多い場合は、組織を細かく切断し、乳鉢などで粉砕してください。凍結組織を使用する場合は、室温にしてから直ちにTissue Buffer T1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Tissue Buffer T1を加えてください。
- 工程②：混和した後、65°Cで20分間反応させます。
- 注) 65°Cにて攪拌しながら、組織を完全に溶解させてください。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。溶解しにくい場合は、加温時間を延長してください。
- 工程③：サンプルにTissue Buffer T2を400 μ L添加し、ボルテックスして激しく混和します。
- 注) Tissue Buffer T2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。
- 工程④：スピнкаラムを20,000 \times g (15,000 rpm) にて2分間遠心し、上清500 μ Lを新しい遠心チューブに入れます。
- 工程⑤：特級イソプロパノールを500 μ L添加し、ボルテックスして混和します。
- 注) 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。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⑥：ライセートを数回ピペッティングし、スピнкаラムに全量添加してください。
- 工程⑦：スピнкаラムの蓋をしっかりと閉め、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) サンプルによっては凝集物ができることがありますが、凝集物ごとすべてスピ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⑧：一回目の洗浄：注意深くスピнкаラムの蓋を開け、Tissue Buffer T3を500 μ L添加してください。
- 工程⑨：スピнкаラムの蓋を開け、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) 遠心後Tissue Buffer T3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。
- 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てください。排出液が入ったコレクションチューブを捨てます。新しい遠心チューブに付け替えます。
- 工程⑩：二回目の洗浄：スピнкаラムの蓋を開け、Tissue Buffer T4を500 μ L添加してください。
- 工程⑪：スピнкаラムの蓋を開け、20,000 \times g (15,000 rpm) にて1分間遠心します。
- 注1) Tissue Buffer T4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2) スピнкаラム内部のふちに液が残った場合はキムワイプ等でふき取ってください。
- 工程⑫：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、Tissue Buffer T5を10~100 μ Lエノリス表面の中央に添加してください。
- 工程⑬：20,000 \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。
- 以上で組織のゲノムDNA抽出は完了です。
- 注) スピнкаラムに添加した溶出Tissue Buffer T5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°C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Tissue Buffer T5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。

<組織に関する注意事項>

- ① ヒトや動物組織をすぐに使用しない場合は、冷凍保存（-20°Cまたは-80°C）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組織をオーバーロードしてしまうと、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Tissue Buffer T1を組織へ添加してください。試薬の容量は抽出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ンド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。
- ⑦ 口腔粘膜細胞、培養細胞、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)	組織とTissue Buffer T1との混和が不十分なために組織溶解が不完全	組織を細かく切断し、乳鉢乳棒などで粉碎する Tissue Buffer T1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を延長する 新しいサンプルで再度DNA精製を行う
	インキュベーション時間が不十分なためにTissue Buffer T1中での組織溶解、タンパク質変性が不完全	組織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 新しいサンプルで再度DNA精製を行う
	多量のTissue Buffer T5で溶出	100 µL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10 µLのTissue Buffer T5あるいは精製水での溶出を推奨する
	スピnc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 500 µL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Tissue Buffer T5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ncラムにTissue Buffer T5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ncラムを1分間インキュベートする
	Tissue Buffer T2とTissue Buffer T3の順番を間違えて使用	Tissue Buffer T2とTissue Buffer T3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
	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ある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、Tissue Buffer T5を溶出に使用する
	Tissue Buffer T1が沈殿している	Tissue Buffer T1を約40°Cで温めて再溶解する
精製した核酸のA260/A280比率が高い	スピncラムへ添加する前にTissue Buffer T3を添加していない	スピncラムへ添加する前に液量を確認、新しい試料で再度DNA抽出を行う
	溶出液中にTissue Buffer T4が残留、不純物が混入	溶出の前に洗浄操作を行ったことを確認する スピncラムにTissue Buffer T4 500 µLを添加後、5分間室温でインキュベートしてから遠心する
	Tissue Buffer T1とTissue Buffer T2が残っている、またはTissue Buffer T3、Tissue Buffer T4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
	RNAの残留量が多い	本キットではAmylase, RNase A処理は行わないため、糖やRNAを含まないDNAが必要な場合は、抽出後にRNase A処理を行う RNase A 溶液での処理方法: RNAを除去する場合、溶出液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

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	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、反応に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、使用した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 スピニングカラム上に残留したDNAは溶出ステップ後に、同一溶出液を再度スピニングカ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

保存及びその他の注意

- 室温 (15-25℃) で保存してください。※Proteinase Kのみ冷蔵保存 (2-8℃)
- Tissue Buffer T3とTissue Buffer T4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。
- 本製品は組織からのゲノム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℃) で18ヵ月です。※Proteinase Kのみ冷蔵保存 (2-8℃) 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