

## ゲノムDNA抽出 クイックガイド

## DNA組織キット編

## QuickGene DNA tissue kit S (DT-S)



このシートは、動物組織からゲノムDNAを抽出する手順を、キットハンドブック・取扱説明書からダイジェストしたものです。ご使用前には、キットハンドブック・取扱説明書をよく読み、正しくご使用ください。



適切な保護手袋、および保護めがねを着用して作業を行ってください。

## step1 準備

目的のゲノムDNA抽出を行うために、下記のものをご準備ください。

## 1 準備

## QuickGene-Mini80

DNA組織キット (DT-S)



特級エタノール (>99%)

マイクロチューブ

マイクロ遠心機



手袋

ヒートブロック (マウスステール以外の組織で使用)

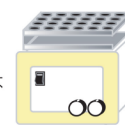
## マイクロピペット



## チューブミキサー



または



55℃のシェーカー (ない場合は、恒温槽等。ときどき攪拌する)

RNase (step1-2参照) ★オプション

## 2 試薬の準備

## ◆ 前処理酵素 (EDT)

2~8℃の冷蔵で保存してください。

## ◆ 組織溶解液 (MDT)

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℃で溶解してください。

## ◆ 溶解液 (LDT)

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℃で溶解してください。

## ◆ 洗浄液 (WDT)

未開封のWDTボトルに特級エタノール (>99%) を160ml添加・混合してください。  
エタノール添加後は、フタをきちんと閉めて室温で保存してください。

## ◆ 回収液 (CDT)

核酸溶出時には、必ずCDTを使用してください。

## ◆ RNase処理を行う場合の推奨品 ★オプション

- ・ Ribonuclease A (Sigma Cat. No. R5125 \*1 \*2  
R5500 \*1 \*2  
R6513 \*1  
R4642)
- ・ Ribonuclease A (MP Biomedicals Cat. No. 101076 \*1 \*2)
- ・ RNase A (AMRESCO Cat. No. 0675 \*1 \*2)
- ・ RNase A (QIAGEN Cat. No. 19101)
- ・ RNase A (Invitrogen Cat. No. 12091)

\*1: 10mM Tris HCl pH7.5、15mM NaClを用いて100mg/ml溶液を調製する。  
\*2: R5125、R5500、101076、0675は100℃15分処理をしてDNase活性を失活してから使用する。

続いてstep2 プロトコールを行います。

## step2 プロトコール

目的の収量を得るため、必ず下記の手順で作業を行ってください。

本キットは1処理あたり動物組織5mgに対応しています。

Balb/cマウス7週齢♀の肝臓5mgから4.5 $\mu$ g、尾5mgから4.0 $\mu$ gのゲノムDNAを抽出することができます。

回収液量初期値は、200 $\mu$ lです。回収液量は50 $\mu$ lまで下げられますが、その場合、溶出効率が低下する可能性があります。

※ 動物から切り取った組織は、所定量を直ちに組織溶解液（MDT）へ浸してください。

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。

### 1 2mlマイクロチューブを使用し、組織溶解を行います。

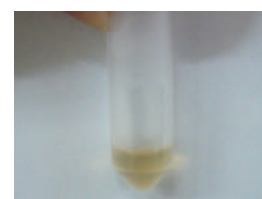
- 1) シェーカーを55℃に設定します。
- 2) 溶解しやすくするために、組織5mgを小さくカットします。  
(マウスの尻尾5mgは約5mmですが、種類、週齢などで異なります。)
- 3) 直ちに組織溶解液（MDT）180 $\mu$ l、前処理酵素（EDT）20 $\mu$ lを添加します。
- 4) 55℃で数時間から一晩、シェーカーなどを使用し、攪拌しながら組織を完全に溶解します。

溶解後に残渣分（溶け残り、ゼラチン状）ができた場合、遠心分離で取り除くか、本キットのハンドブックトラブルシューティングを参考に工程条件を変更してください。

- 5) 溶解残渣分（溶け残り、ゼラチン状）を分離除去するために、遠心します。  
(目安：8,000 $\times$ g（およそ10,000rpm）、3分、室温程度)
- 6) 溶解上清液を1.5mlマイクロチューブへ移します。



酵素反応前



酵素反応後

### 2 ヒートブロックを70℃に設定します。（マウステール以外の組織の場合）

### 3 RNase処理 ★オプション

(step1 試薬の準備を参照)

- 1) 濃度100mg/mlのRNaseを20 $\mu$ l添加します。（Cat. No. 12091は60 $\mu$ l使用します。）

DNaseフリーでないRNaseを使用する場合は、DNase不活化処理をしてください。

組織の種類によりRNAの含有量が異なります。含有量が低い場合、使用RNase量を減量することができます。

- ・ 100mg/mlに調製したRNaseを20 $\mu$ l使用することで、マウス5mgの肝臓に混入するRNAを分解できます。
- ・ 100mg/mlに調製したRNase Cat. No. R5125を20 $\mu$ l使用することで、7週齢のBalb/cマウス5mgの尾に混入するRNAを分解できます。

- 2) タッピングまたはピペティング5回を行い、RNaseをサンプル液とよく混ぜます。
- 3) 数秒スピンドウンして、チューブのキャップや壁についた液を収集します。
- 4) 室温で2分間、インキュベーションします。

## 組織ゲノムDNA抽出の場合

4 LDTを添加後、ボルテックス：15秒  
(最大回転数で充分混合)

- 1) 溶解液 (LDT) 180 $\mu$ lを添加し、サンプル液と混合します。  
ボルテックスを15秒間最大回転数で行います。
- 2) 混和が不十分なときは、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ます。
- 3) その後、数秒間スピンドウンしてチューブのキャップや壁に付着した溶液を収集します。  
LDT液添加時に混合液が白くなることがありますが、70 $^{\circ}$ Cに加熱すると溶解します。
- 4) 70 $^{\circ}$ Cにて10分間インキュベーションします。
- 5) 軽くスピンドウンします。

5 特級エタノール (>99%) を添加後、  
ボルテックス：15秒 (最大回転数で充分混合)

- 1) 特級エタノール240 $\mu$ lを添加し、サンプル液と混合します。  
ボルテックスを15秒間最大回転数で行います。
- 2) 混和が不十分なときは、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ます。
- 3) その後、数秒間スピンドウンしてチューブのキャップや壁に付着した溶液を収集します。  
室温が低い場合、エタノール添加後に白い沈殿ができることがまれにあります。55 $^{\circ}$ Cに加熱し沈殿を溶解後、室温に戻してから使用してください。

## マウス尻尾ゲノムDNA抽出の場合

4 溶解液 (LDT) と特級エタノール (>99%)  
の混合

1サンプルあたり溶解液 (LDT) 180 $\mu$ lと特級エタノール240 $\mu$ lをサンプル数分充分に混合し、調製します。

5 LDTを添加後、ボルテックス：15秒  
(最大回転数で充分混合)

- 1) 溶解液 (LDT) と特級エタノール (>99%) の混合液420 $\mu$ lを添加し、サンプル液と混合します。  
ボルテックスを15秒間最大回転数で行います。
- 2) 混和が不十分なときは、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ます。
- 3) その後、数秒間スピンドウンしてチューブのキャップや壁に付着した溶液を収集します。  
室温が低い場合、溶解液 (LDT) とエタノールの混合液を添加後に白い沈殿ができることがまれにあります。55 $^{\circ}$ Cに加熱し沈殿を溶解後、室温に戻してから使用してください。

## 6 ライセート完成

ライセート完成後、30分以内に抽出を行ってください。

続いてstep3 抽出を行います。

## step3 抽出

QuickGene-Mini80を使って、ゲノムDNAを抽出します。

### 1 QuickGene-Mini80抽出フロー

抽出フロー中の加圧マーク  は下記操作を意味しています。

- ① チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQuickGene-Mini80にセットする
- ② 加圧スイッチを手前に回して加圧開始
- ③ カートリッジ（CA）内に液が残っていないことを確認してから加圧スイッチを元の位置に戻す
- ④ チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQuickGene-Mini80から取り出す

