

## FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit

Cat: FATGK 000 Mini(4 回分)/FATGK 001(50 回分)/FATGK 001-1(100 回分)/FATGK 001-2(300 回分)

本製品は研究用です

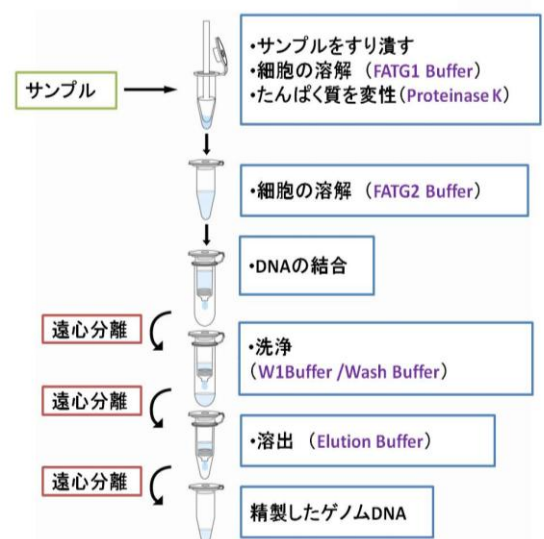
Vol.1115

### 🌈 キットの内容

	FATGK 000 (4 preps_sample)	FATGK 001 (50 preps)	FATGK 001-1 (100 preps)	FATGK 001-2 (300 preps)
FATG1 Buffer	1.5ml	15ml	30ml	70ml
FATG2 Buffer	1.5ml	15ml	30ml	70ml
Proteinase K *	1mg	11mg	11mg × 2	11mg × 6
W1 Buffer**	1.3ml	22ml	44ml	124ml
Wash Buffer***	1ml	10ml	20ml	55ml
Elution Buffer	1ml	15ml	30ml	90ml
FATG Mini Column	4 pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
Collection Tube	8pcs	100 pcs	200 pcs	600 pcs
Elution Tube	4 pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
Micropestle	4pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
添加する ddH <sub>2</sub> O 量				
Proteinase K*	0.1ml	Proteinase K(11mg) 1本につき 1.1ml		
添加する 96-100%エタノール量				
W1 Buffer**	0.5ml	8ml	16ml	45ml
Wash Buffer***	4ml	40ml	80ml	210ml

### 🌈 基本情報

構成	スピナラム(シリカメンブレン)
操作時間	30~60 分
結合量	60μ g/column
収量	15~35μ g/prep
方法	遠心・吸引
最小溶出量	50μ l
サンプル量	動物細胞: <25mg マウスの尾: 1.2cm 培養細胞: <10 <sup>7</sup>



### 重要事項

1. 作業はゴム手袋、白衣を着用して行ってください。
2. Proteinase K はお客様の手元に届き次第、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存してください。滅菌済の ddH<sub>2</sub>O を Proteinase K へ加えてボルテックスでよく混和し 10mg/ml に調整します。調製後は  $4^{\circ}\text{C}$ で保管してください。
3. W1 Buffer と Wash Buffer は開封時にエタノール(96-100%)を加えてください。
4. 操作を始める前にドライバス又はウォーターバスを 2 台ご準備ください。:1 台目  $60^{\circ}\text{C}$ (ステップ 4 にて使用)、2 台目  $70^{\circ}\text{C}$ (ステップ 7 にて使用)。
5. Elution Buffer は  $70^{\circ}\text{C}$ に温めてください。ステップ 13 で使用します。
6. 遠心分離は、最大速度( $\sim 18,000 \times g$ )で行ってください。

### 操作

**<動物細胞> ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。**

必要なもの: RNase A(オプション)、96-100%エタノール

ヒント: 操作を始める前にドライバス又はウォーターバスを 2 台設定してください。:1 台目  $60^{\circ}\text{C}$ (ステップ 4 にて使用)、2 台目  $70^{\circ}\text{C}$ (ステップ 7 にて使用)。

1. 最大 25 mg の組織サンプルをチューブ(お客様でご用意ください)に移します。キットに含まれる Micropestle ですり潰してください。または液体窒素下で組織を乳鉢で粉末化し、粉末をチューブ(お客様でご用意ください)へ移します。  
\* 細胞量の多い組織(脾臓など)は 10mg 程度のサンプル量を使用してください。
2. 200 $\mu$ l の FATG1 Buffer を加え、Micropestle もしくはピペットのチップ先を使用して、よくホモジナイズします。
3. 20 $\mu$ l の Proteinase K(10mg/ml)をサンプルに加え、ボルテックスで混和します。
4.  $60^{\circ}\text{C}$ で組織が溶解するまでインキュベートします。(サンプルにより異なりますが、通常は 1~3 時間程度インキュベートします。)インキュベート中は、数回ボルテックスでサンプルを混和してください。  
\* サンプルは一晚インキュベートするとよく溶解します
5. <RNA-free genomic DNA を抽出する場合のオプションステップ>  
4 $\mu$ l の RNaseA (100mg/ml)をサンプルに加えます。ボルテックスでよく混和し、室温で 2 分間インキュベートします。

6. 200μ l の FATG2 Buffer をサンプル溶液に加え、パルスボルテックスし、70°Cで 10 分間インキュベートします。
7. 200μ l のエタノール(96-100%)をサンプル溶液に加えパルスボルテックスでよく混和します。
8. 数秒間スピンドウンし、蓋の内側についた溶液を回収します。
9. FATG Mini Column を 2.0ml Collection Tube へ取り付けます。サンプル溶液(沈殿物も含めます。)を FATG Mini Column にアプライし、1 分間遠心分離(~18,000 × g)します。ろ液を捨て、**FATG Mini Column を新しい Collection tube に付けます。**
10. 400μ l の W1 Buffer を FATG Mini Column へ加え、1 分間遠心分離し、ろ液を捨てます。  
\* W1 Buffer が開封時にエタノールが添加されていることを確認してください。
11. 750μ l の Wash Buffer を FATG Mini Column へ加え、1 分間遠心分離し、ろ液を捨てます。  
\* Wash Buffer が開封時にエタノールが添加されていることを確認してください。
12. さらに、3 分間遠心分離し Column を乾燥させます。  
\* **重要なステップ:**この操作は酵素処理を阻害する物質を取り除くためのステップです。
13. 100μ l の Elution Buffer または、ddH<sub>2</sub>O(pH7.5-9.0)を FATG Mini Column 膜の中央にアプライし、3 分間静置します。  
\* **重要なステップ:**効率よく溶出させるため、Elution Buffer をカラム膜中央へ加え、完全に吸着させて下さい。  
\* サンプル量が少ない場合は、DNA 濃度を上げるために Elution Buffer を 50μ l に減らして下さい。ただし 50μ l より少ない容量で溶出ししないでください。収量の低下につながります。
14. 2 分間遠心分離し、DNA を溶出します。

**<培養細胞> ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。**

必要なもの: RNase A(オプション)、96-100%エタノール、トリプシンもしくはセルスクレーパー(単層細胞用)、PBS

ヒント: 操作を始める前にドライバス又はウォーターバスを 2 台設定してください。: 1 台目 60°C、2 台目 70°C。

1. 以下の方法で細胞を回収してください。

a) 液体培養(Cells grown in suspension)の場合

- a-1. チューブに適量のサンプル( $1 \times 10^7$  cell)を移します。
- a-2.  $300 \times g$  で 5 分間遠心分離します。上清を取り除きます。

b) 単層培養(Cells grown in monolayer)の場合

- b-1. トリプシンまたはスクレーパーを使用し、フラスコやシャーレから細胞を剥離させます。チューブに適量のサンプル( $1 \times 10^7$  cell)を移します。
- b-2.  $300 \times g$  で 5 分間遠心分離します。上清を完全に取り除きます。

2. ペレットを PBS で再懸濁し、 $200 \mu l$  に調整します。
3. <動物細胞>プロトコルのステップ 2 へ進んでください。

**<血液> ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。**

必要なもの: RNase A (オプション)、96-100%エタノール、PBS

ヒント: 操作を始める前にドライバス又はウォーターバスを 2 台設定してください。: 1 台目  $60^\circ\text{C}$  (ステップ 3 にて使用します。)、2 台目  $70^\circ\text{C}$  (ステップ 4 にて使用します。)

1. 最大  $200 \mu l$  のサンプル(全血、血清、血漿、体液、 Buffy coat)をチューブ(お客様でご用意ください)に移します。  
\* サンプルが  $200 \mu l$  以下の場合、PBS で適切な量に調節してください。
2. <RNA-free genomic DNA を抽出する場合のオプションステップ>  
 $4 \mu l$  の RNaseA ( $100 \text{mg/ml}$ : お客様でご用意ください。)をサンプルに加えます。ボルテックスでよく混和し、室温で 2 分間インキュベートします。
3.  $20 \mu l$  の Proteinase K ( $10 \text{mg/ml}$ )をサンプル溶液に加え、さらに  $200 \mu l$  の FATG2 Buffer を加えます。パルスボルテックスでよく混和し、 $60^\circ\text{C}$  で 30 分間インキュベートします。インキュベート中、数回ボルテックスで混和します。
4.  $70^\circ\text{C}$  で 10 分間インキュベートします。
5. <動物細胞>のステップ 7 へ進んでください。

**<細菌> ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。**

必要なもの: RNase A (オプション)、96-100%エタノール

グラム陽性細菌の場合 lysozyme reaction solution ( $20 \text{mg/ml}$  lysozyme;  $20 \text{mM}$  Tris-HCl, pH8.0;  $2 \text{mM}$  EDTA; 1.2% Triton)

ヒント:操作を始める前にドライバス又はウォーターバスを2台設定してください。:1台目 60°C(ステップ4にて使用します。)、2台目 70°C(ステップ6にて使用します。)

### I 細菌の培養液

1. 1mlの細菌培養液をチューブ(お客様でご用意ください)に移します。
2. 2分間遠心分離し、上清を完全に除去します。
3. <動物細胞>のステップ2へ進んでください。

### II 生体試料中(Biological fluids)の細菌

1. サンプルを7,500rpm又は5,000×gで10分間遠心分離し、上清を完全に除去します。
2. <動物細胞>のステップ2へ進んでください。

### III 目、鼻、咽頭又は他のスワブ中の細菌

1. スワブを2mlのPBSに室温で2-3時間つけておきます。
2. 7,500rpm又は5,000×gで10分間遠心分離し、上清を完全に除去します。
3. <動物細胞>のステップ2へ進んでください。

### IV グラム陽性の細菌

ヒント:ドライバスまたはウォーターバスを37°C、60°C、95°Cに設定してください。

1. 1mlの細菌培養液をチューブ(お客様でご用意ください)に移します。
2. 2分間遠心分離し、上清を完全に除去してください。
3. ペレットを200µlの **lysozyme reaction solution** (20mg/ml lysozyme; 20mM Tris-HCl, pH8.0; 2mM EDTA; 1.2% Triton) を加え、再懸濁します。37°Cで30~60分インキュベートします。
4. <RNA-free genomic DNAを抽出する場合のオプションステップ>  
4µlのRNase A (100mg/ml)をサンプルに加え、室温で2分間インキュベートしてください。
5. 20µlのProteinase Kと200µlのFATG 2 Bufferをサンプルに加え、パルスボルテックスで混和します。60°Cで30分インキュベートします。インキュベート中、数回ボルテックスで混和してください。
6. さらに95°Cで15分インキュベートしてください。
7. <動物細胞>のステップ8へ進んでください。

### <酵母> ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

必要なもの: RNase A(オプション)、96-100%エタノール  
zymolase または lyticas: 200U/prep

**sorbitol buffer** (1M sorbitol; 100mM EDTA; 14mM β-mercaptoethanol)

ヒント:操作を始める前に、ドライバスまたは、ウォーターバスを30°C、60°C、70°Cに設定してください。

1. 3ml の酵母培養液(OD600=10)をチューブ(お客様でご用意ください)へ移します。
2. 7,500rpm 又は 5,000 × g で 10 分間遠心分離し、上清を完全に除きます。
3. ペレットを 600μ l の sorbitol buffer (1M sorbitol; 100mM EDTA; 14mM β -mercaptoethanol)で再懸濁し、200U の zymolase または lyticase を加え、30°Cで 30 分インキュベートします。
4. 7,500rpm 又は 5,000 × g で 5 分間遠心分離し、ピペットで上清を完全に除きます。
5. <動物細胞>のステップ 2 へ進んでください。

### <乾燥血液のスポット> ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

必要なもの: RNase A(オプション)、96-100%エタノール

ヒント: 操作を始める前に、ドライバスまたは、ウォーターバスを 85°C、60°C、70°Cに設定してください。

1. 乾燥血液の付着したフィルター紙を細かく切り、チューブ(お客様でご用意ください)へ加えます。200μ l の FATG1 Buffer を加え 85°Cで 10 分間インキュベートします。
2. 20μ l の Proteinase Kをサンプル溶液に加え、ボルテックスで混ぜます。60°Cで1時間インキュベートします。インキュベート中、数回ボルテックスでサンプルを混和します。
6. <動物細胞>のステップ 6 へ進んでください。

### <固定組織> ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

必要なもの: RNase A(オプション)、96-100%エタノール、キシレン

ヒント: 操作を始める前に、ドライバスまたは、ウォーターバスを 60°Cと 70°Cに設定してください。

#### I.パラフィン包埋組織

1. 25mg までの組織をチューブ(お客様でご用意ください。)へ移します。
2. 1ml のキシレンを加え、よく混ぜ室温で 30 分インキュベートします。
3. 5 分間遠心分離し、ピペッティングでろ液を捨てます。
4. 1ml のエタノール(96-100%)を脱パラフィン化した組織に加え、ボルテックスで緩やかに混和します。
5. 3 分間遠心分離し、上清をピペットを使用して除去します。
6. ステップ 4 と 5 を繰り返します。
7. 37°Cで 10~15 分インキュベートし、エタノールを蒸発させます。
8. 組織を付属の Micropestle ですり潰す、または液体窒素で粉末にします。<動物細胞>のステップ 2 へ進んでください。

#### II.ホルマリン固定組織

1. 25mg の組織を 1ml の PBS で 2 回洗浄し、ホルマリンを除去します。

2. 組織を付属の Micropestle ですり潰す、または液体窒素で粉末にします。＜動物細胞＞のステップ 2 へ進んでください。

### 🌈 トラブルシューティング

収量が少ない	
サンプル量が少ない	サンプルを増やし、200 $\mu$ l にサンプルを濃縮してください。
サンプル量が多すぎる	サンプル量を減らしてください。
細胞の溶解が不完全	
Proteinase K の劣化により、細胞を完全に溶解していない	Proteinase K を再度調製してください。 Proteinase K を直接 FATG2 Buffer へ加えないでください。
FATG2 Buffer がサンプルと十分に混和していない	FATG2 Buffer をサンプルへ加えたあと、すぐにパルスボルテックスで混和してください。
インキュベーション時間が短い	インキュベーション時間を延ばし、確実に細胞を溶解してください。
DNA がカラムへ吸着していない	
サンプルにエタノールを加えていない	カラムへ加える前に、サンプルにエタノールを加えてください。
サンプルとエタノールが十分に混ざっていない	サンプルを SDE Mini カラムへ加える前にエタノールと完全に混ざっているか確認してください。
Wash Buffer の調製の不備	
Wash Buffer へエタノールが加えられていない	最初に Wash Buffer を使用する時、エタノール(96-100%)を必要量加えてください。
DNA 溶出が不十分	
ddH <sub>2</sub> O の pH が不適応	ddH <sub>2</sub> O の pH を 7.5-9.0 に調整してください。または、付属の Elution Buffer を使用してください。
Elution Buffer または ddH <sub>2</sub> O がカラムに完全に吸着されていない	Elution Buffer または、ddH <sub>2</sub> O を加えた後、FABG Mini Column を 5 分間静置してください。
カラムが目詰まりを起こしている	
細胞溶解液に非溶解性断片が含まれている	遠心分離で断片(骨や毛など)を取り除いてください。
サンプルの粘性が高い	サンプル量を減らしてください。
Proteinase K が機能していない	Proteinase K を再度調製してください。 Proteinase K を直接 FATG2 Buffer へ加えないでください。
DNA の精製度が低い	
A260/A280 の値が低い	

Proteinase K が機能していない	新しい ProteinaseK を使用してください。
サンプルと FATG2 Buffer がよく混ざっていない	サンプルと FATG2 Buffer はすぐにパルスボルテックス混和してください。
インキュベートの時間が不足	インキュベーションの時間を長くし、非溶解性断片が残らないようにしてください。
<b>A260/A280 の値が低い</b>	
RNA がコンタミしている	ステップ 5 にしたがって RNA を取り除いてください。
RnaseA を加える前に FATG2 Buffer をサンプルに加えている	FATG2 Buffer は RNase A を加える前に入れないでください。(オプションステップ)
<b>DNA の溶出量が少ない</b>	
サンプルが古い	新鮮なサンプルを使用してください。
アガロースゲル電気泳動用バッファーが DNase に汚染されている	アガロースゲル電気泳動に使用するバッファーを再度調整してください。