

FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit

Cat: FATGK 000 (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

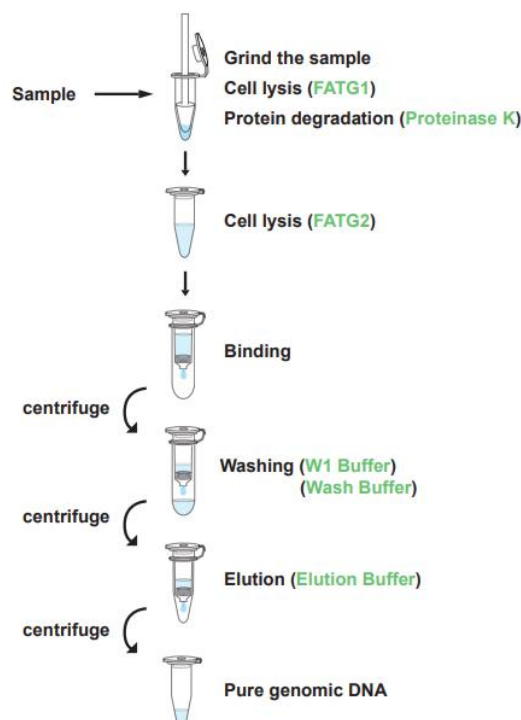
v 221212

📌 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	1.5 ml	15 ml	30 ml	70 ml
FATG2 Buffer	1.5 ml	15 ml	30 ml	70 ml
Proteinase K*	1 mg	11 mg	11 mg×2	11 mg×6
W1 Buffer**	1.3 ml	22 ml	44 ml	124 ml
Wash Buffer**	1 ml	10 ml	20 ml	55 ml
Elution Buffer	1 ml	15 ml	30 ml	90 ml
FATG Mini Column	4 pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
Collection Tube	8 pcs	100 pcs	200 pcs	600 pcs
Elution Tube	4 pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
Micropestle	4 pcs	50 pcs	100 pcs	300 pcs
*添加する ddH ₂ O 量 (Proteinase K (10 mg/ml) 溶液を調製する)				
Proteinase K	0.1 ml	1.1 ml	1.1 ml×2	1.1 ml×6
**添加する 96-100%エタノール量				
W1 Buffer	0.5 ml	8 ml	16 ml	45 ml
Wash Buffer	4 ml	40 ml	80 ml	220 ml

📌 基本情報

構成	スピナラム (シリカメンブレン)
サンプル量	動物組織: <25 mg マウスの尾: 1.2 cm 培養細胞: <1 × 10 ⁷
所要時間	30~60 分
収量	15~35 µg/prep
結合量	60 µg DNA/column
最小溶出量	50 µl
方法	遠心法 もしくは 吸引法



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 はお客様の手に届き次第、-20℃で保存してください。滅菌済の ddH₂O を Proteinase K へ加えてボルテックスでよく混和し 10 mg/ml に調製します。調製後は 4℃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ご準備ください。
①60℃（ステップ 4 にて使用）、②70℃（ステップ 6 にて使用）
5. Elution Buffer は 70℃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（～18,000 × g）で行ってください。

操作 ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

<動物組織>

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

ヒント: 操作を始める前に 60℃、70℃のドライバスまたは、ウォーターバスをご準備ください。

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。もしく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 10 mg 以下のサンプル量を使用してください。
2. 200 µl 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 µl の Proteinase K（10 mg/ml）をサンプルに加え、ボルテックスで混和します。
4. 60℃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. <オプション>RNA-free genomic DNA を抽出する場合
4 µl の RNase A（100 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。
6. 200 µl の FATG2 Buffer をサンプル溶液に加えパルスボルテックスをし、70℃で 10 分間インキュベートします。
7. 200 µl 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（沈殿物を含む）を FATG Mini Column にアプライし、最大速度（ $\sim 18,000 \times g$ ）で 1 分間遠心分離します。ろ液を捨て、FATG Mini Column を新しい Collection tube に付けます。
10. 400 μ l の W1 Buffer を FATG Mini Column へ加え、最大速度（ $\sim 18,000 \times g$ ）で 1 分間遠心分離し、ろ液を捨てます。
* W1 Buffer にエタノール（96-100%）が添加されていることを確認してください。
11. 750 μ l の Wash Buffer を FATG Mini Column へ加え、1 分間最大速度（ $\sim 18,000 \times g$ ）で遠心分離し、ろ液を捨てます。
* Wash Buffer にエタノール（96-100%）が添加されていることを確認してください。
12. さらに、最大速度（ $\sim 18,000 \times g$ ）で 3 分間遠心分離し Column を乾燥させます。
重要ステップ！：この操作は酵素処理を阻害する物質を取り除くために重要です。
13. 100 μ l の予熱した Elution Buffer または、ddH₂O（pH 7.5-9.0）を FATG Mini Column の膜中央に加え、3 分間静置します。
重要ステップ！ 効率よく溶出させるため、Elution Buffer を完全に吸着させてください。
* 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 50 μ l に減らしてください。
ただし 50 μ l より少ない容量で溶出しないでください。収量の低下につながります。
14. 最大速度（ $\sim 18,000 \times g$ ）で 2 分間遠心分離し、DNA を溶出します。

<培養細胞>

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

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、60°C、70°Cのドライバスまたは、ウォーターバスをご準備ください。

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（最大 1×10^7 cell）を移します。
 - a-2. $300 \times g$ で 5 分間遠心分離します。上清を注意深く完全に取り除きます。
 - 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（最大 1×10^7 cell）を移します。
 - b-2. $300 \times g$ で 5 分間遠心分離し、上清を注意深く完全に取り除きます。
2. ペレットを PBS で再懸濁し、200 μ l に調整します。

3. <動物組織>のステップ 2 へ進んでください。

<血液>

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

ヒント: 操作を始める前に、60°C、70°Cのドライバスまたは、ウォーターバスをご準備ください。

1. 最大 200 μ l のサンプル (全血、血清、血漿、体液、バフィーコート) 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 μ l 以下の場合、PBS で適量に調節してください。
2. <オプション>RNA-free genomic DNA を抽出する場合
4 μ l の RNase A (100 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 μ l の Proteinase K (10 mg/ml) をサンプル溶液に加え、さらに 200 μ 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°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°Cで 10 分間インキュベートします。
5. <動物組織>のステップ 7 へ進んでください。

<細菌>

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

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

ヒント: 操作を始める前に、60°C、70°Cのドライバスまたは、ウォーターバスをご準備ください。

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. 最大速度 (~18,000 \times g) で 2 分間遠心分離して細胞を降下させ、上清を完全に除去します。
3. <動物組織>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 7,500 rpm 又は 5,000 \times g で 10 分間遠心分離して細胞を回収し、上清を完全に除去します。
2. <動物組織>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 2 ml の PBS に室温で 2-3 時間つけておきます。
2. 7,500 rpm 又は 5,000 × g で 10 分間遠心分離して細胞を回収し、上清を完全に除去します。
3. <動物組織>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: 操作を始める前に、37°C、60°C、95°Cのドライバスまたは、ウォーターバスをご準備ください。

1. 1 ml 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. 最大速度（～18,000 × g）で 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 200 μl 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. <オプション>RNA-free genomic DNA を抽出する場合
4 μl の RNase A (100mg/ml, お客様でご用意ください) をサンプルに加え、室温で 2 分間インキュベートします。
5. 20 μl の Proteinase K と 200 μl 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。その後、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ます。
6. さらに 95°Cで 15 分インキュベートします。
7. <動物組織>のステップ 7 へ進んでください。

<酵母>

必要なもの: RNase A(オプション)、エタノール (96-100%)

zymolase または lyticase: 200 U/prep

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

ヒント: 操作を始める前に、30°C、60°C、70°Cのドライバスまたは、ウォーターバスをご準備ください。

1. 3 ml の対数増殖期 (OD600 = 1) の酵母培養液をチューブ（お客様でご用意ください）へ移します。
2. 7,500 rpm 又は 5,000 × g で 10 分間遠心分離して細胞を降下させ、上清を完全に除きます。
3. ペレットを 600 μl の sorbitol buffer (1M sorbitol; 100mM EDTA; 14mM β-mercaptoethanol) で再懸濁し、200 U 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. 7,500 rpm 又は 5,000 × g で 5 分間遠心分離し、上清を除去してください。
5. <動物組織>のステップ 2 へ進んでください。

<乾燥血液のスポット>

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

ヒント: 操作を始める前に、85°C、60°C、70°Cのドライバスまたは、ウォーターバスをご準備ください。

1. 乾燥血液の付着したフィルター紙 (例: S&S903) 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。200 μ l の FATG1 Buffer を加え 85°C で 10 分間インキュベートします。
2. 20 μ 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。
3. <動物組織>のステップ 6 へ進んでください。

<固定組織>

I) パラフィン包埋組織

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

ヒント: 操作を始める前に、60°C、70°Cのドライバスまたは、ウォーターバスをご準備ください。

1. パラフィン包埋組織試料を 25 mg まで切り出し、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 ($\sim 18,000 \times g$) し、上清を除去してください。
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. 最大速度 ($\sim 18,000 \times g$) で 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、残留エタノールを完全に蒸発させます。
8. 組織を付属の Micropestle または 液体窒素で粉末にします。
9. <動物組織>のステップ 2 へ進んでください。

II) ホルマリン固定組織

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

ヒント: 操作を始める前に、60°C、70°Cのドライバスまたは、ウォーターバスをご準備ください。

1. 25 mg の組織を 1 ml 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 または 液体窒素で粉末にします。
3. <動物組織>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	サンプル量を増やすか、200 μ 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 ₂ O の pH が不適応	ddH ₂ 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 ₂ O がカラムに完全に吸着されていない	Elution Buffer または、ddH ₂ O を加えた後、FATG 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 Proteinase K を使用してください。 Proteinase K を直接 FATG2 Buffer へ加えないでください。
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。

A260/A280 の値が高い	
RNA がコンタミしている	<動物組織>ステップ 5 にしたがって RNA を取り除いてください。
RNase A を加える前に FATG2 Buffer をサンプルに加えている	FATG2 Buffer は RNase A を加える前に入れしないでください。(オプションステップ参照)
DNA の溶出量が少ない	
サンプルが古い	新鮮なサンプルを使用してください。
	パラフィン包埋組織から抽出されたゲノム DNA は、通常分解されています。PCR 反応には適していますが、サザンブロットティングや制限酵素による解析には推奨できません。
アガロースゲル電気泳動用バッファが 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を再度調整してください。