

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

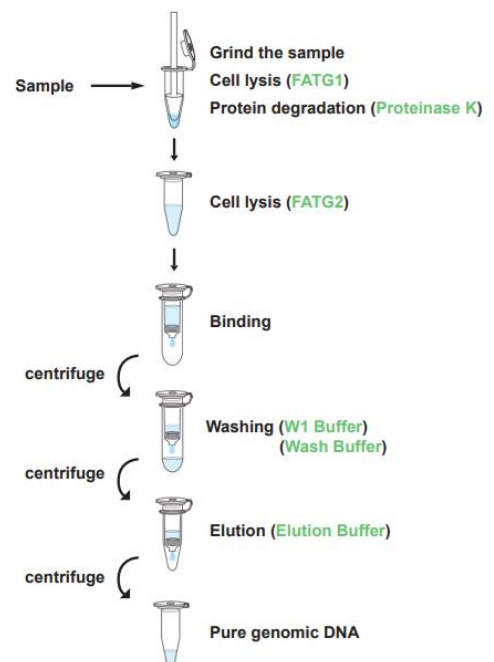
v 230401

📦 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 (Liquid) | 100 μ l | 1050 μ l | 1050 μ l \times 2 | 1600 μ l \times 4 |
| 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 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 \times 10 ⁷ cells |
| 所要時間 | 30~60 分 |
| 収量 | 15~35 μ g/prep |
| 結合量 | 60 μ g DNA/column |
| 最小溶出量 | 50 μ l |
| 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. 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。
3. 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）
4. Elution Buffer は 70℃に温めてください。ステップ 13 で使用します。
5. 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 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 cells）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 cells）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) を推奨

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. ペレットに 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&S 903) 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、37°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. 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. 1 ml 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. 1 ml 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 を直接 FATG2 Buffer へ加えないでください。 反応温度と時間が正しいか確認してください。 |
| 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 を直接 FATG2 Buffer へ加えないでください。 反応温度と時間が正しいか確認してください。 |
| 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 | Proteinase K を直接 FATG2 Buffer へ加えないでください。 反応温度と時間が正しいか確認してください。 |
| 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。 |

| | |
|---|---|
| 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 | 常に新鮮または保存状態の良い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、サザンブロットリ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。 |