

FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit

Cat. No. : FATG1020 (4 回分) / FATG1023 (50 回分) / FATG1024 (100 回分) / FATG1026 (300 回分)

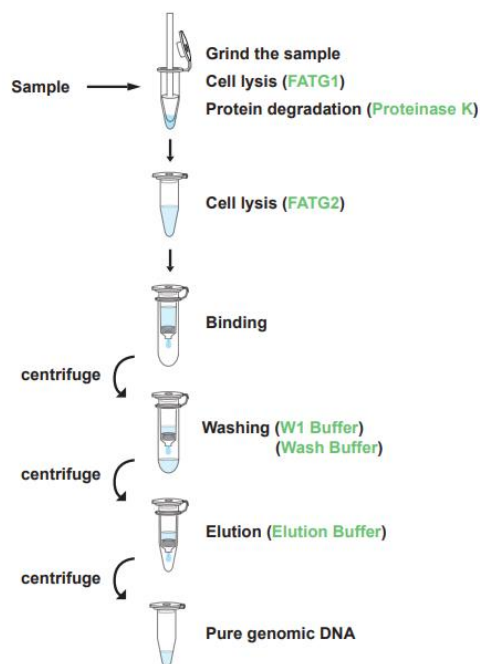
本製品は研究用です v 202508

● キットの内容

	FATG1020 (FATGK 000) (4 preps)	FATG1023 (FATGK 001) (50 preps)	FATG1024 (FATGK 001-1) (100 preps)	FATG1026 (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 (Concentrate)*	1.3 ml	22 ml	44 ml	124 ml
Wash Buffer (Concentrate)*	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	スピニングカラム (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	最大 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. 作業中はゴム手袋、白衣を着用してください。
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またはウォーターバスをご準備ください。
① 60℃(ステップ 4 で使用) ② 70℃(ステップ 6 で使用)
4. Elution Buffer は 70℃に予熱してください。(ステップ 13 で使用)
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)、96~100%エタノール

ヒント) ドライバスまたはウォーターバスを 60℃(ステップ 4)と 70℃(ステップ 6)に設定してください。

1. 最大 25 mg の組織サンプルを遠心チューブ(非付属品)に移します。Micropestle(付属品)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、粉末を遠心チューブに移します。
・ 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 μ l の FATG1 Buffer を加え、Micropestle またはピペットチップを使用して、十分に混和します。
3. 20 μ l の Proteinase K を加え、ボルテックスで十分に混和します。
4. 60℃で組織が溶解するまで(1~3 時間)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します。
・ 一晩インキュベートすると十分に溶解します。
5. <オプション>RNA-free genomic DNA を抽出する場合
4 μ l の 100 mg/ml RNase A(非付属品)を加えます。ボルテックスで十分に混和し、室温で 2 分間インキュベートします。
6. 200 μ l の FATG2 Buffer を加えます。パルスボルテックスで十分に混和し、70℃で 10 分間インキュベートします。
7. 200 μ l のエタノール(96~100%)を加え、パルスボルテックスで十分に混和します。
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 に取り付けます。混合液(沈殿物を含む)を慎重に移し、最大速度(~18,000 × g)で 1 分間遠心分離します。FATG Mini Column を新しい Collection tube に取り付けます。
10. 400 μ l の W1 Buffer を FATG Mini Column に加えます。最大速度で 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%)が加えら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 に加えます。最大速度で 1 分間遠心分離し、ろ液を捨てます。
・ Wash Buffer にエタノール(96~100%)が加えられていることを確認してください。
12. 最大速度で 3 分間遠心分離し、カラムを乾燥させます。
重要! この操作は残留液がその後の酵素処理を阻害することを防ぎます。
13. 100 μ l の予熱した Elution Buffer または ddH₂O (pH 7.5~9.0) を FATG Mini Column のメンブレンの中央に加え、3 分間静置します。
重要! 効率よく溶出させるため、Elution Buffer または ddH₂O を完全に吸着させてください。

- ・ サンプル量が少ない場合、DNA 濃度を上げるため、Elution Buffer または ddH₂O を 50 μ l に減らしてください。ただし、50 μ l 未満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)、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) 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。

- 以下の方法で細胞を回収してください。
 - 液体培養(Cells grown in suspension)の場合
 - 遠心チューブに適量のサンプル(最大 1×10^7 cells)を移します。
 - 300 $\times$ g で 5 分間遠心分離します。上清を慎重にすべて取り除きます。
 - 単層培養(Cells grown in monolayer)の場合
 - 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。遠心チューブに適量のサンプル(最大 1×10^7 cells)を移します。
 - 300 $\times$ g で 5 分間遠心分離します。上清を慎重にすべて取り除きます。
- ペレットを PBS で再懸濁し、200 μ l に調整します。
- <動物組織>のステップ 2 に進みます。

<血液>

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

ヒント) ドライバスまたはウォーターバスを 60°C (ステップ 3) と 70°C (ステップ 4) に設定してください。

- 最大 200 μ l のサンプル(全血、血清、血漿、体液、 Buffy Coat)を遠心チューブ(非付属品)に移します。
 - ・ サンプル量が 200 μ l 以下の場合、PBS を適量加えてください。
- <オプション> RNA-free genomic DNA を抽出する場合

4 μ l の 100 mg/ml RNase A(非付属品)を加えます。ボルテックスで十分に混和し、室温で 2 分間インキュベートします。
- 20 μ l の Proteinase K を加えた後、200 μ l の FATG2 Buffer を加えます。パルスボルテックスで十分に混和し、60°C で 30 分間インキュベートします。インキュベート中は数回ボルテックスで混和します。
- 70°C で 10 分間インキュベートします。
- <動物組織>のステップ 7 に進みます。

<細菌>

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> 反応毎に 200 μ l の lysozyme reaction solution を以下の手順で調製
20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、2 mM EDTA、1.2% Triton を含む緩衝液で lysozyme を 2 mg/ml に希釈
してください。

ヒント) 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. 細菌の培養液

1. 1 ml の細菌培養液を遠心チューブ(非付属品)に移します。
2. 最大速度で 2 分間遠心分離し、細胞を降下させます。上清を完全に取り除きます。
3. <動物組織>のステップ 2 に進みます。

II. 生体試料中 (Biological fluids) の細菌

1. 7,500 rpm (5,000 × g) で 10 分間遠心分離し、細胞を回収します。上清を完全に取り除きます。
2. <動物組織>のステップ 2 に進みます。

III. 目、鼻、咽頭または他のスワブ中の細菌

1. 2 ml の PBS に室温で 2~3 時間漬けます。
2. 7,500 rpm (5,000 × g) で 10 分間遠心分離し、細胞を回収します。上清を完全に取り除きます。
3. <動物組織>のステップ 2 に進みます。

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 と 60°C と 95°C に設定してください

1. 1 ml の細菌培養液を遠心チューブ(非付属品)に移します。
2. 最大速度で 2 分間遠心分離し、上清を完全に取り除きます。
3. ペレットに 200 μ l の lysozyme reaction solution を加え、再懸濁します。37°C で 30~60 分間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
5. 4 μ l の 100 mg/ml RNase A (非付属品) を加え、ボルテックスで十分に混和し、室温で 2 分間インキュベートします。
6. 20 μ l の Proteinase K を加えた後、200 μ l の FATG2 Buffer を加えます。パルスボルテックスで十分に混和し、60°C で 30 分間インキュベートします。インキュベート中は数回ボルテックスで混和します。
7. 95°C で 15 分インキュベートします。
8. <動物組織>のステップ 7 に進みます。

<酵母>

必要なもの: RNase A (オプション)、96~100% エタノール

反応毎に 500 μ l の lyticase または zymolyase reaction solution を以下の手順で調製

1M sorbitol、100mM EDTA、0.1% β -メルカプトエタノールを含む緩衝液で lyticase または zymolyase を 400U/ml に希釈してください。

ヒント) ドライバスまたはウォーターバスを 37°C と 60°C と 70°C に設定してください。

1. 3 ml の対数増殖期 (OD600 = 1) の酵母培養液を遠心チューブ(非付属品)に移します。
2. 7,500 rpm (5,000 × g) で 10 分間遠心分離し、細胞を降下させます。上清を完全に取り除きます。
3. ペレットを 500 μ l の lyticase または zymolyase reaction solution で再懸濁し、37°C で 30 分間インキュベートします。
4. 7,500 rpm (5,000 × g) で 5 分間遠心分離し、上清を取り除きます。
5. <動物組織>のステップ 2 に進みます。

＜乾燥血液のスポット＞

必要なもの) RNase A(オプション)、96～100%エタノール

ヒント) ドライバスまたはウォーターバスを 85℃と 60℃と 70℃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(例: S&S 903)を切り、遠心チューブ(非付属品)に移します。200 μ l の FATG1 Buffer を加え、85℃で 10 分間インキュベートします。
2. 20 μ l の Proteinase K を加え、ボルテックスで十分に混和します。60℃で 1 時間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混和します。
3. ＜動物組織＞のステップ 6 に進みます。

＜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)、96～100%エタノール、キシレン

ヒント) ドライバスまたはウォーターバスを 37℃と 60℃と 70℃に設定してください

1. 最大 25 mg のパラフィン包埋組織サンプルを切り、遠心チューブ(非付属品)に移します。
2. 1 ml のキシレンを加えます。十分に混和し、室温で 30 分インキュベートします。
3. 最大速度で 5 分間遠心分離し、上清を取り除きます。
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、ボルテックスで優しく混和します。
5. 最大速度で 3 分間遠心分離し、上清をピペットで取り除きます。
6. ステップ 4 と 5 を繰り返します。
7. 37℃で 10～15 分間インキュベートし、残留エタノールを完全に蒸発させます。
8. Micropestle または液体窒素で粉末にし、＜動物組織＞のステップ 2 に進みます。

II. ホルマリン固定組織

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

ヒント) ドライバスまたはウォーターバスを 60℃と 70℃に設定してください。

1. 25 mg の組織サンプルを 1 ml の PBS で 2 回洗浄し、ホルマリンを除去します。
2. Micropestle または液体窒素で粉末にし、＜動物組織＞のステップ 2 に進みます。

●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 FATG2 Buffer に直接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 の混和が不十分	FATG2 Buffer 添加後、直ちにパルスボルテックスで十分に混和してください。
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	
エタノールを加えていない	カラムに移す前、エタノール(96~100%)を加えてください。
エタノールの混和が不十分	カラムに移す前、サンプルとエタノールが十分に混和しているか確認してください。
Wash Buffer の調製の不備	
Wash Buffer にエタノールを加えていない	Wash Buffer は開封時に必要量のエタノール(96~100%)を加えてください。
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。
	Elution Buffer(付属品)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 の添加後、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	
ライセートが非溶解性断片を含む	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 FATG2 Buffer に直接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 FATG2 Buffer に直接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	FATG2 Buffer 添加後、直ちにパルスボルテックスで十分に混和してください。
インキュベーションの時間が不足	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 に従い、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、サザンブロットングや制限酵素による解析には推奨できません。
ゲル電気泳動用バッファーが DNase に汚染されている	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。