

# Genomic DNA Extraction Kit Mini (Blood / Bacteria / Cultured Cells)



Cat. No. YGB50  
50 ミニプレップ

Cat. No. YGB100  
100 ミニプレップ

RBC Lysis Buffer: 100ml

RBC Lysis Buffer: 200ml

GB Buffer: 15ml

GB Buffer: 30ml

GT Buffer: 15ml

GT Buffer: 30ml

W1 Buffer: 25ml

W1 Buffer: 50ml

Wash Buffer (conc.): 25ml \*

Wash Buffer (conc.): 25ml \*

Elution Buffer: 30ml

Elution Buffer: 30ml

Proteinase K: 11mg \*\*

Proteinase K: 11mg\*2本 \*\*

GD Column: 50本

GD Column: 100本

2ml Collection Tube: 50本

2ml Collection Tube: 100本

対象サンプル (プロトコール掲載): 全血 300µl~1ml、培養細胞 10<sup>7</sup>、バクテリア (グラム陽性/陰性) 10<sup>9</sup>、酵母 10<sup>7</sup>

平均収量: 全血 300µl から 6µg、軟膜 200µl から 50µg、リンパ液・培養細胞 5×10<sup>6</sup> から 50µg

\* 初めにご使用になる前に、Wash Bufferに4倍量のエタノールを加えてください。

\*\* Proteinase K (11mg) のチューブに ddH<sub>2</sub>O を 1.1ml 加えた後、ボルテックスにかけてください。溶解した Proteinase K (10mg/ml) は 4°C で保存してください。長期間保存する場合は、いくつかに分けて -20°C で保存してください。

追加で用意いただくもの: エッペンチューブ、エタノール、RNase A (10mg/ml)

1

## 新鮮血用プロトコール

※ RBC Lysis Buffer は、無核赤血球を除去し、ヘモグロビン混入量を低減するためのものです。ただし、血液サンプルが 50µl 以下の場合や、サンプルが有核血球から成る場合は、細胞用プロトコールに従って DNA 精製を行ってください。

### 新鮮血の赤血球の溶解

- 新鮮血を EDTA-Na<sub>2</sub> 処理した採血管で集める。(あるいは他の抗凝剤を混ぜてください。)
- 血液 300µl までを 1.5ml エッペンチューブに注入する。血液サンプルが 300µl 以上 (1ml まで) の場合は、滅菌済みの 15ml 遠心管を使用してください。
- サンプル量の 3 倍の RBC Lysis Buffer を加え、チューブをひっくり返す方法で混ぜ合わせる。ボルテックスにはかけないでください。
- 室温で 5 分間インキュベートする。
- 遠心分離機に 3,000xg で 2 分間かけ、上澄み液を捨てる。
- RBC Lysis Buffer 200µl を加え、細胞ペレットを再懸濁させる。

### 細胞の溶解

- GB Buffer 200µl と Proteinase K (10mg/ml) 20µl を加え、ボルテックスにかけて混ぜ合わせる。
  - サンプル溶解液が透明になるまで、60°C で 20 分間インキュベートする。インキュベーション中 3 分毎に、チューブをひっくり返す方法で混ぜ合わせる。
- ※ この時点で Elution Buffer (1 サンプルあたり 200µl) を 60°C のウォーターバスで温めてください。

### 付加処理: RNA 分解

- RNA フリーのゲノミック DNA が必要な場合は、次の付加処理を行ってください。
- サンプル溶解液に RNase A (10mg/ml) 5µl を加え、ボルテックスにかけて混ぜ合わせる。(RNase A は本製品の付属品ではありません。)
  - 室温で 5 分間インキュベートする。

### DNA 結合

- サンプル溶解液にエタノール 200µl を加え、ボルテックスに 10 秒間かけて混ぜ合わせる。沈殿が見られる場合は、ピペティングにより溶解させる。
- GD Column を Collection Tube 内に設置する。
- 9 の溶液を全て (沈殿物も含む) GD Column に加える。蓋をして、遠心分離機に 10,000xg (13,000rpm) で 5 分間かける。
- 排液を捨て、GD Column を Collection Tube 内に戻す。

3

## Genomic DNA Extraction Kit Mini (Blood)

### 概要

Genomic DNA Extraction Kit (Blood / Bacteria / Culture Cells) は、全血や血漿、血清、軟膜、その他の体液、リンパ球、培養細胞などから、全 DNA (ゲノミック DNA、ミトコンドリア DNA、ウイルス DNA を含む) を時間やコストをかけずに精製できるキットです。また、本製品は、バクテリアや培養細胞からの全 DNA の精製にも適しています。

全血からの精製プロトコールでは、RBC Lysis Buffer、GB Buffer を使用し、急速加熱により、DNA を溶液中に放出します。カオトロピック溶液中の DNA は、スピートカラム内のガラスファイバー充填材に結合します。不純物を洗い流した後、低塩濃度の溶出緩衝液または水を加えることにより、精製された DNA が溶出されます。フェノール/クロロホルム抽出やアルコール沈殿などの処理は必要ありません。

本製品を使用して精製された約 20~30kb の DNA は、PCR やその他の酵素反応に適しています。

### 品質管理

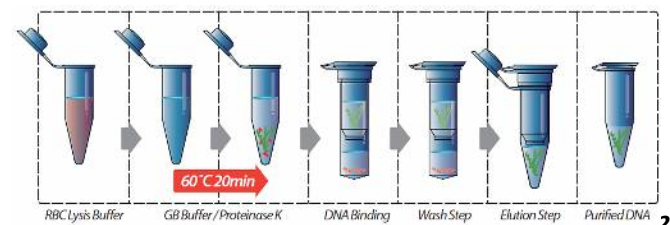
Genomic DNA Extraction Mini Kit (Blood / Bacteria / Culture Cells) はロット毎に、ヒトの全血 200µl からゲノミック DNA を抽出する方法で、品質試験を行っています。

ゲノミック DNA の収量は 4~6µg であり、A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比は 1.6~1.8 であることが分光光度計により確認されています。

参考文献 (1) Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615.

注意事項 (1) 本製品は研究用です。診断用・治療用にはご使用にならないようお願い致します。

(2) Buffer は、刺激性があり有害な塩酸グアニジン含有しています。ご使用中は必ず、白衣、使い捨ての手袋、防護用眼鏡を着用してください。



2

## Genomic DNA Extraction Kit Mini (Blood)

### 洗浄

- GD Column に W1 Buffer 400µl を加える。遠心分離機に 10,000xg (13,000rpm) で 30 秒間かける。
- 排液を捨て、GD Column を Collection Tube 内に戻す。
- GD Column に (エタノールで薄めた) Wash Buffer 600µl を加える。
- 遠心分離機に 10,000xg (13,000rpm) で 30 秒間かける。
- 排液を捨て、GD Column を Collection Tube 内に戻す。
- 再度、遠心分離機に 10,000xg (13,000rpm) で 3 分間かけて、カラム充填材を乾かす。

### DNA 溶出

標準的な溶出の液量は 100µl です。サンプル量が少ない場合は、DNA 濃度を上げるため溶液を (30~50µl まで) 減らしてください。高い DNA 収量が必要な場合、以下の DNA 溶出の処理を繰り返し行ってください。DNA 収量が向上し、溶出量は約 200µl になります。

- 乾いた GD Column を新しい 1.5ml エッペンチューブに移し入れる。(エッペンチューブは本製品の付属品ではありません。)
- カラム充填材の中央に、Elution Buffer 100µl を加える。
- Elution Buffer が充填材に吸収されるまで 3~5 分間、チューブを立てて置く。
- 遠心分離機に 10,000xg (13,000rpm) で 30 秒間かけて、精製された DNA を溶出させる。

### 冷凍保存血用プロトコール

- 血液 200µl に Proteinase K (10mg/ml) 20µl と GB Buffer 200µl を加え、60°C で 30 分間インキュベートする。
- この時点で、Elution Buffer (1 サンプルあたり 200µl) を 60°C のウォーターバスで温める。

### 付加処理: RNA 分解

- RNA フリーのゲノミック DNA が必要な場合は、次の付加処理を行ってください。
- サンプル溶解液に RNase A (10mg/ml) 5µl を加え、ボルテックスにかけて混ぜ合わせる。(RNase A は本製品の付属品ではありません。)
  - 室温で 5 分間インキュベートする。

- 新鮮血用プロトコールの DNA 結合 (9~) の処理を行う。

4

培養細胞用プロトコール

サンプルの前処理：培養動物細胞の場合

附着細胞を使用する場合、予め細胞をトリプシン処理してください。

1. 細胞 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> をエッペンチューブに移し入れ、遠心分離機に 6,000xg (8,000rpm) で 20 秒間かける。
2. 上澄み液を捨て、RBC Lysis Buffer 150μl に細胞を入れて再懸濁させる。

サンプルの前処理：有核赤血球の場合

有核赤血球（鳥や魚など）を使用する場合、サンプル量を 10μl まで増やすことができます。

1. GT Buffer 150μl をエッペンチューブに入れ、血液サンプルを注入する。
2. ボルテックスにかけてサンプルを混ぜ合わせる。

溶解

3. GB Buffer 200μl を加え、ボルテックスに 5 秒間かけて混ぜ合わせる。
  4. サンプル溶解液が透明になるまで、70℃で 10 分間インキュベートする。インキュベーション中 3 分毎に、チューブをひっくり返す方法で混ぜ合わせる。
- ※ この時点で Elution Buffer (1 サンプルあたり 200μl) を 70℃に温めてください。

付加処理：RNA 分解

RNA フリーのゲノミック DNA が必要な場合は、次の付加処理を行ってください。

- a. サンプル溶解液に RNase A (10mg/ml) 5μl を加え、ボルテックスにかけて混ぜ合わせる。(RNase A は本製品の付属品ではありません。)
- b. 室温で 5 分間インキュベートする。

DNA 結合

5. サンプル溶解液にエタノール 200μl を加え、すぐに、ボルテックスに 10 秒間かけて混ぜ合わせる。沈殿が見られる場合はピペッティングにより溶解させる。
6. GD Column を Collection Tube 内に設置する。
7. 5 の溶液を全て（沈殿物も含む）GD Column に加える。
8. Collection Tube の蓋をして、遠心分離機に 10,000xg (13,000rpm) で 2 分間かける。
9. 排液を捨て、GD Column を Collection Tube 内に戻す。

洗浄

10. GD Column に W1 Buffer 400μl を加える。遠心分離機に 10,000xg (13,000rpm) で 30 秒間かける。

5

11. 排液を捨て、GD Column を Collection Tube 内に戻す。
12. GD Column に（エタノールで薄めた）Wash Buffer 600μl を加える。遠心分離機に 10,000xg (13,000rpm) で 30 秒間かける。
13. 排液を捨て、GD Column を Collection Tube 内に戻す。
14. 再度、遠心分離機にフルスピードで 3 分間かけて、カラム充填材を乾かす。

DNA 溶出

標準的な溶出の液量は 100μl です。サンプル量が少ない場合は、DNA 濃度を上げるため液量を（30~50μl まで）減らしてください。高い DNA 収量が必要な場合、以下の DNA 溶出の処理を繰り返し行ってください。DNA 収量が向上し、溶出量は約 200μl になります。

15. 乾いた GD Column を新しい 1.5ml エッペンチューブに移し入れる。(エッペンチューブは本製品の付属品ではありません。)
16. カラム充填材の中央に、Elution Buffer 100μl を加える。
17. Elution Buffer が充填材に吸収されるまで 2 分間、チューブを立てて置く。
18. 遠心分離機に 10,000xg (13,000rpm) で 30 秒間かけて、精製された DNA を溶出させる。

バクテリア用プロトコール

グラム陰性の場合：

1. バクテリア培養液（10<sup>9</sup> まで）をエッペンチューブに移し入れる。遠心分離機に 10,000xg (13,000rpm) で 1 分間かけた後、上澄み液を捨てる。
2. GT Buffer 200μl をチューブに加え、ボルテックスにかけるか、ピペッティングにより、細胞ペレットを再懸濁させる。室温で 5 分間インキュベートする。
3. 培養細胞用プロトコールの溶解（3~）の処理を行う。

グラム陽性の場合：

- リゾチーム緩衝液をご用意ください。ご使用の直前に調合してください。  
(リゾチーム 20mg/ml ; Tris-HCl 20mM ; EDTA 2mM ; 1% Triton X-100 ; pH 8.0)
1. バクテリア培養液（10<sup>9</sup> まで）をエッペンチューブに移し入れる。遠心分離機に 10,000xg (13,000rpm) で 1 分間かけた後、上澄み液を捨てる。
  2. リゾチーム緩衝液 200μl を加え、ボルテックスにかけるか、ピペッティングにより細胞ペレットを再懸濁させる。室温で 10 分間インキュベートする。インキュベーション中 2~3 分毎に、チューブをひっくり返す方法で混ぜ合わせる。
  3. 培養細胞用プロトコールの溶解以降（3~）の処理を行う。

6

酵母用プロトコール

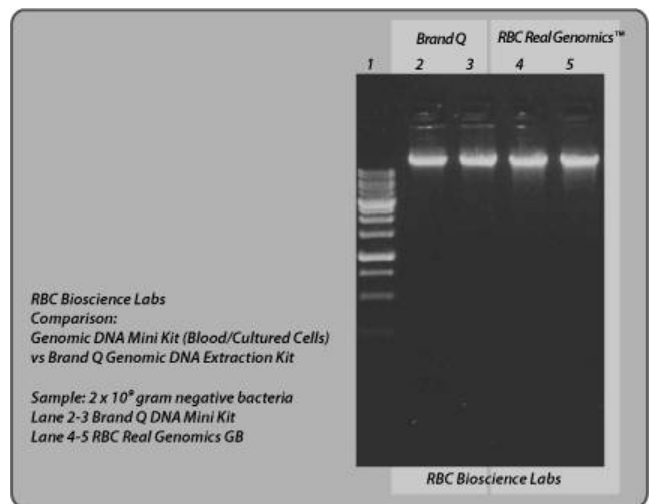
追加でご用意いただくもの：Lyticase または Zymolase、ソルビトール緩衝液（ソルビトール 1.2M ; 10mM CaCl<sub>2</sub> ; 0.1M Tris-HCl (pH 7.5) ; 35mM β-メルカプトエタノール）

1. 酵母細胞（5×10<sup>7</sup> まで）を遠心分離機に 5,000xg で 10 分間かける。上澄み液を捨て、ソルビトール緩衝液 600μl に細胞ペレットを入れて再懸濁させる。
2. Lyticase または Zymolase を 200U 加え、30℃で 30 分間インキュベートする。遠心分離機に 2,000xg で 10 分間かけて、スフェロプラストを集菌する。
3. 上清を捨てて GT Buffer を 200μl 加え、ボルテックスにかけるか、ピペッティングにより、細胞ペレットを再懸濁させる。室温で 5 分間インキュベートする。
4. 培養細胞用プロトコールの溶解（3~）の処理を行う。

トラブルシューティング

問題	考えられる原因と解決策
カラムが詰まる	<p>サンプル容量が多いため、カラムが過負荷になっている サンプル容量を減らすか、複数のチューブに分けて処理を行ってください。</p> <p>DNA 結合の処理において沈殿が生成している サンプル容量を減らしてください。 細胞溶解物をカラムに加え入れる前に、溶解液中の沈殿物を分散させてください。</p>
収量が少ない	<p>DNA 溶出の処理が不適切 Elution Buffer が GD Column の充填材の中央に加えられ、吸収されていることを確認してください。</p> <p>DNA が完全に溶出されなかった DNA 溶出の処理を 2 回行って、収量を増やしてください。</p>
抽出された DNA を用いたその後の実験がうまくいかない	<p>残留エタノールが混入している 洗浄の処理を行った後、さらに遠心分離機にフルスピードで 5 分間かけるか、60℃で 5 分間インキュベートして、GD Column を乾かしてください。</p> <p>RNA が混入している RNA 分解の処理を追加で行ってください。</p> <p>タンパク質が混入している サンプル容量を減らしてください。 DNA 結合の処理を行った後、GD Column に W1 Buffer を 400μl 注いで洗浄し、遠心分離機に 13,000rpm で 30 秒間かけてから、通常の洗浄の処理を行ってください。</p> <p>ゲノミック DNA が分解している 新鮮な組織サンプルを使用してください。長期間保存されている間にゲノミック DNA が分解する場合があります。</p>

7



製品の取扱い方法についてのお問合せは、以下の弊社窓口までご相談ください。

RBC Bioscience 社製品 日本総代理店  
有限会社 サイトローブ  
マーケティング営業部

〒113-0031 東京都文京区根津 2-4-2-1 階  
Tel : 03-5842-1749  
Fax : 03-5842-1926  
E-mail : rbc@scitrove.co.jp

8