

製品コード 9770A

研究用

TAKARA

DNAiso Reagent
(DNA 抽出試薬)

説明書

v202012Da

[B. 浮遊細胞の場合]

- 1) 浮遊細胞を培地ごと遠心チューブに移し、 $8,000 \times g$ 、 4°C で2分間遠心後、上清を捨てる。
- 2) $1 \sim 3 \times 10^7$ 個の細胞あたり 1 ml の DNAiso を加える。
- 3) 沈殿が見えなくなるまでピペティングを繰り返す。
- 4) 室温で5分間静置する。

[C. 動物組織の場合]

- 1) 20 ~ 50 mg の動物組織あたり 1 ml の DNAiso を加える。
- 2) ホモジナイザーや TaKaRa BioMasher Standard (製品コード 9790A/9791A) 等を用いて沈殿が見えなくなるまで破碎する。
- 3) 破碎液を遠心チューブに移し、室温で5分間静置する。

・心臓、皮膚、軟骨組織などの破碎が難しい組織については、以下の 1') ~ 4') の方法で処理する。

- 1') 試料を乳鉢に入れ、液体窒素を加えて凍結後、さらに液体窒素を加えながら粉末状になるまですりつぶす。破碎が不十分な場合、DNA の収量や純度に影響する。
- 2') 試料の量に応じて適量の DNAiso を加え、破碎した試料が完全に浸るようにする。
- 3') 室温になるまで放置し、破碎液が透明になるまですりつぶす。
- 4') 破碎液を遠心チューブに移し、室温で5分間静置する。

・少量 (5 ~ 10 mg) の肝臓、脾臓や脳など軟組織については、以下の 1'') ~ 3'') の方法で処理する。

- 1'') 直接遠心チューブ中で 1 ml の DNAiso を加える。
- 2'') 沈殿が見えなくなるまでピペティングを繰り返す。
- 3'') 破碎液を遠心チューブに移し、室温で5分間静置する。

[D. 植物組織の場合]

- 1) 試料を乳鉢に入れ、液体窒素を加えて凍結後、さらに液体窒素を加えながら粉末状になるまですりつぶす。破碎が不十分な場合、DNA の収量や純度に影響する。
- 2) 試料の量に応じて適量の DNAiso を加え、破碎した試料が完全に浸るようにする。
- 3) 室温になるまで放置し、破碎液が透明になるまですりつぶす。
- 4) 破碎液を遠心チューブに移し、室温で5分間静置する。

[E. 酵母、グラム陽性菌の場合]

- 1) 培養液から菌体を回収する。
- 2) 液体窒素を加えて凍結後、さらに液体窒素を加えながら粉末状になるまですりつぶす。あるいは、Zymolase、Lysozyme 等の溶菌酵素を用いて細胞壁を分解する。細胞壁の分解あるいは破碎が不十分な場合、DNA の収量や純度に影響する。
- 3) $1 \sim 3 \times 10^8$ 個の菌体あたり 1 ml の DNAiso を加える。
- 4) 沈殿が見えなくなるまでピペティングを繰り返す。
- 5) 破碎液を遠心チューブに移し、室温で5分間静置する。

[F. グラム陰性菌の場合]

- 1) 培養液から菌体を回収する。
- 2) $1 \sim 2 \times 10^9$ 個の菌体あたり 1 ml の DNAiso を加える。
- 3) 沈殿がなくなるまでピペティングを繰り返す。
- 4) 室温で5分間静置する。

3. ゲノム DNA の抽出

- 1) 2 の操作で得られた試料破砕液を $10,000 \times g$ 、 4°C あるいは室温で 10 分間遠心後、不溶物が混入しないように注意して、上清を新しい遠心チューブに移す。
なお、植物組織の場合、組織由来の葉緑素は以下の (1) ~ (3) の方法でかなり除くことができる。
 - (1) 前述の操作で得られた試料破砕液に等量のクロロホルムを加え、転倒混和する。
 - (2) 室温で 10 分間静置する。
 - (3) $12,000 \times g$ 、室温で 10 分間遠心後、上層の水層を新しい遠心チューブに移す。
- 2) 2 の操作で用いた DNAiso 量の 0.5 倍量のエタノールを加えて転倒混和する。
- 3) 1 ~ 3 分経過すると DNA が綿状の白い沈殿として現れる。この沈殿をピペットチップなどに巻きつけて採取し、新しい遠心チューブに移す。
沈殿が見えない場合や分散している場合には、 $4,000 \times g$ 、室温で 2 分間遠心後、沈殿を回収する。

4. ゲノム DNA 沈殿の洗浄

- 1) 1 ml の 75% エタノールを加え、緩やかに転倒混和する。
- 2) $12,000 \times g$ 、 4°C で 5 分間遠心後、上清を捨てる。このとき、できる限り上清を除くことが望ましい。

5. ゲノム DNA の溶解

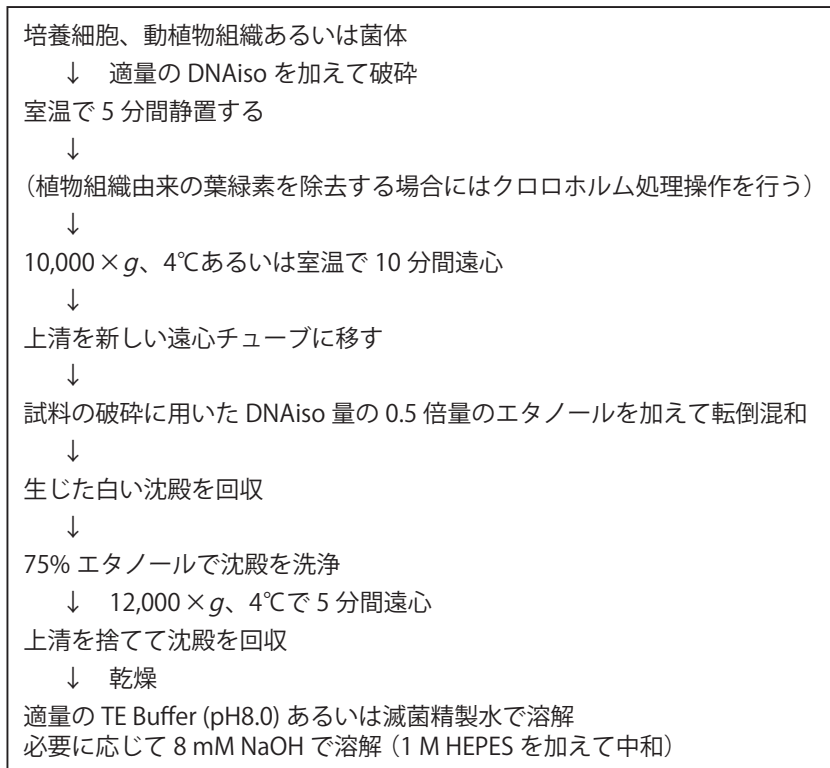
室温で数秒 ~ 1 分間乾燥させた後、適量の TE Buffer (pH8.0) あるいは滅菌精製水で沈殿を溶解する。大量のゲノム DNA の溶解には時間を要する。
肝臓、皮膚、植物組織等由来の溶解されない成分 (多糖類など) が見られる場合には、 $12,000 \times g$ で 10 分間遠心して除く。
大量のゲノム DNA は、TE Buffer や滅菌精製水には完全に溶解することが困難な場合がある。その場合には、8 mM NaOH で溶解する方法があるが、溶解後 HEPES 溶液を加えて pH を中和する必要がある。1 ml の 8 mM NaOH に添加する 1 M HEPES 溶液の量と最終 pH の目安は下記の通りである。

最終 pH	1 M HEPES 溶液
7.0	32 μl
7.2	23 μl
7.5	15.9 μl
7.8	11.7 μl
8.0	10.1 μl
8.2	9.3 μl
8.4	8.6 μl

注 1) ゲノム DNA が溶解しにくくなることがありますので、乾燥させ過ぎないでください。真空乾燥や加熱乾燥をしないでください。

注 2) 通常、本キットの工程を行うことで、RNA はある程度分解・除去されますが、サンプルの種類によっては、十分に除去できない場合もあります。その場合は、必要に応じて回収したゲノム DNA サンプルを用いて RNase A 処理を行ってください。

V. ゲノム DNA 抽出のフローチャート



VI. ゲノム DNA の定量と純度検定

[定量]

吸光度を測定し、 A_{260} の値から DNA 濃度を求めます。

(参考) DNA 濃度の計算方法 : $\text{DNA 濃度 } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times [\text{希釈倍率}] \times 50$

[純度検定]

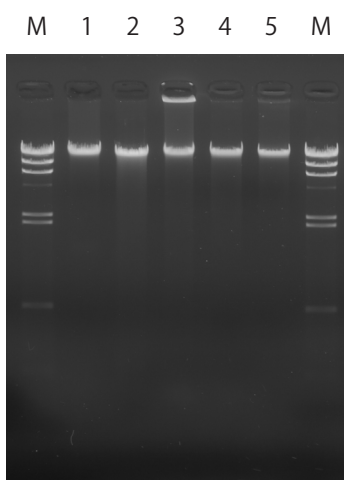
A_{260}/A_{280} の比を求めて純度を検定します。 A_{260}/A_{280} の比が 1.8 ~ 2.0 の範囲であれば望ましい状態です。

VII. 実施例

- 下記の試料より 1 ml の DNAiso を用いてゲノム DNA を抽出した。
RNase A 処理後、フェノール処理、エタノール沈殿を行いゲノム DNA のみを回収した。
A₂₆₀ の値から収量を求め、各ゲノム DNA 200 ng 相当量を 1% アガロースゲル電気泳動により分析した。

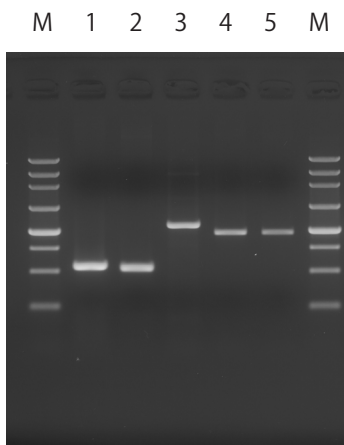
No.	材料	材料使用量	収量 (μg)*
1	<i>E. coli</i> (JM109)	2 × 10 ⁹	11
2	トマトの葉	500 mg	10
3	マウス脳	25 mg	7
4	HeLa 細胞	1 × 10 ⁷	42
5	浮遊細胞 K562	1 × 10 ⁷	34

* : RNA 除去後の収量



1 : *E. coli* (JM109)
2 : トマトの葉
3 : マウス脳
4 : HeLa 細胞
5 : 浮遊細胞 K562
M : λ-*Hind* III digest (250 ng 相当量)

- 上記 1 で得られたゲノム DNA を鋳型とし、*TaKaRa Ex Taq*[®] Hot Start Version を用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動により分析した。



1 : *E. coli* (JM109) *araC* 0.5 kb
2 : トマトの葉 *Cox I* 0.5 kb
3 : マウス脳 *Ccnd2* 1.2 kb
4 : HeLa 細胞 *DCARE1a* 1.0 kb
5 : 浮遊細胞 K562 *DCARE1a* 1.0 kb
M : 250 bp DNA Ladder (Dye Plus)

VIII. トラブルシューティング

1. 収量が少ない

ゲノムDNAの回収量は用いた試料の種類や量によって異なります。参考として、下記にDNAisoを用いて抽出できるゲノムDNA量の目安を示します。

試料の種類	試料の量	ゲノムDNA収量(目安)
マウス肝臓	100 mg	100 ~ 400 μ g
マウス腎臓	100 mg	300 ~ 400 μ g
マウス心臓	100 mg	200 ~ 300 μ g
浮遊細胞 HL60	1×10^7 個	50 ~ 70 μ g
トマトの葉	1 g	10 ~ 200 μ g
<i>E. coli</i>	1×10^9 個	3 ~ 5 μ g

予想された収量よりも著しく少なかった場合、以下の原因が考えられます。

- ・試料の破砕が不十分だった。
- ・DNAisoの量が不十分だった。
- ・ゲノムDNA沈殿の溶解が不完全だった。
- ・抽出操作工程でDNaseが混入した。

2. A₂₆₀/A₂₈₀の値が低い

- ・DNAisoの添加量が少ないとタンパク質変性が不十分となるため、適量のDNAisoを使用してください。
- ・DNAiso添加後のインキュベーションが不十分な場合、核酸からのタンパク質の解離が不十分となります。
- ・抽出したゲノムDNAを十分に溶解してください。

3. 抽出したゲノムDNAが溶解しない

- ・75%エタノールによる洗浄後の乾燥が過剰だと溶解が困難になります。長時間の乾燥や加熱乾燥を行わないように注意してください。
- ・抽出したゲノムDNAの量が多い場合には、時間をかけて溶解してください。
- ・TE Buffer (pH8.0) あるいは滅菌精製水での溶解が困難な場合には、8 mM NaOHによる溶解をお試しください。

4. 抽出したゲノムDNAに多糖類が多く混在している

通常、動物の筋肉組織や植物には大量の多糖類が含まれています。抽出したゲノムDNAから多糖類を取り除くのは困難ですので、これらのような試料からゲノムDNAを抽出する場合には、はじめから添加するDNAisoの量を増やしておくことをお勧めします。

5. 抽出したゲノムDNAにRNAが多く混入している

- ・ゲノムDNAの抽出時、エタノール添加後遠心して沈殿を得た場合には、RNAがより多く混入します。
- ・必要に応じてRNase A処理を行ってください。

IX. 参考文献

Cox R A, *Methods in Enzymology* (Grossmann L and Moldave K., Eds.). (1968) **12** B: 120-129. Academic Press, Orland, FL.

X. 関連製品

TaKaRa BioMasher Standard (Non-sterile) (製品コード 9790A/B)
TaKaRa BioMasher Standard (Sterile) (製品コード 9791A/B)
RNase A (凍結乾燥品) (製品コード 740505/740505.50)
TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (製品コード RR006A/B)

XI. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- *TaKaRa Ex Taq* はタカラバイオ株式会社の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995
ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社