

MonoFas[®]

研究用試薬キット

培養細胞ゲノム DNA 抽出キット VI

取扱説明書



株式会社アニモス

目次

1. 製品説明	- 3 -
2. 製品内容	- 3 -
3. 製品仕様	- 4 -
4. 必要な試薬及び器具	- 4 -
5. カラム使用上の注意事項	- 4 -
6. DNA 抽出プロトコールの簡易フロー	- 5 -
7. 保存及びその他の注意	- 7 -
8. 保証期間	- 7 -

1. 製品説明

MonoFas[®]培養細胞ゲノム DNA 抽出キットVI(人培養細胞からのゲノム DNA 抽出キット)をお買い上げ頂きありがとうございます。
ごぞいます。

本製品は均一な連続孔を持つフィルター型シリカモノリスをチップ先端に固定したモノリス固相スピンカラムで、DNA がシリカゲル(シリカは石英などの結晶性シリカと、シリカゲル・未焼成の珪藻土や生物中に存在する非結晶性シリカの 2 つに大別される。)に吸着する特性を利用して培養細胞からゲノム DNA の抽出を行います。本製品を使用することで、培養細胞からゲノム DNA を高効率で抽出できます。また不純物の除去率が高く、抽出したゲノム DNA 溶液中に無機塩類がないことも本製品の特徴です。本製品で抽出されたゲノム DNA で、高効率の PCR 増幅が可能であり、蛍光シーケン法により 98%以上の精度で 190 塩基以上の解析が可能であると確認されています。MonoFas[®] 培養細胞ゲノム DNA 抽出 キット VI の性能を十分に発揮させるため、本取扱説明書をよくお読みの上、正しくお使いください。

2. 製品内容

本製品を受け取りましたら、梱包内容、スピンカラムの外観、数量、バッファー液等に異常がないか確認してください。内容違い、数量違い、スピンカラムの外観等に異常がありましたら、すみやかに弊社へご連絡ください。

(1) 酵素無し

Cat. No.	A06-0001	A06-0002	A06-0003	A06-0004
回数	25	50	100	250
スピンカラム	25 本×1 袋	50 本×1 袋	50 本×2 袋	50 本×5 袋
Buffer A6 (細胞溶解・吸着)	22 mL	55 mL	66 mL	165 mL
Buffer B6 (洗浄)	14 mL	28 mL	55 mL	138 mL
Buffer C6 (溶出)*	6 mL	6 mL	11 mL	28 mL

(2) 酵素付

Cat. No.	A06-0201	A06-0202	A06-0203	A06-0204
回数	25	50	100	250
スピンカラム	25 本×1 袋	50 本×1 袋	50 本×2 袋	50 本×5 袋
Buffer A6 (細胞溶解・吸着)	22 mL	55 mL	66 mL	165 mL
Buffer B6 (洗浄)	14 mL	28 mL	55 mL	138 mL
Buffer C6 (溶出)*	6 mL	6 mL	11 mL	28 mL
Proteinase K (20mg/mL)	0.25 mL	0.5 mL	1 mL	2.5 mL

* 溶出液を回収するチューブは付属していません。別途 1.5 mL~2.0 mL の遠心チューブを用意して下さい。

* Buffer C6 は、10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA (Free) (pH 8.5)です。

MonoFas[®] 培養細胞ゲノム DNA 抽出キット VI

3. 製品仕様

	人培養細胞からの抽出
操作時間	15 分間
最大 DNA 結合量	~ 50 μg
溶出量	20 ~ 100 μL
可能 DNA サイズ	培養細胞ゲノム DNA
推奨処理量	~ 10^7 細胞
DNA の純度	A260/A280 \approx 1.7 ~ 2.3 A260/A230 \approx 1.7 ~ 2.2

4. 必要な試薬及び器具

- ① MonoFas[®] 培養細胞ゲノム DNA 抽出キット VI
- ② Proteinase K (20mg/mL)
- ③ イソプロパノール(特級)
- ④ 1.5mL 遠心チューブ
- ⑤ 高速マイクロ遠心機(20,000 \times g (15,000 rpm)の遠心が可能なもの)*
- ⑥ ドライバスと 1.5mL チューブ用ヒートブロックまたはウォーターバス(70°Cで使用可能なもの)
- ⑦ ボルテックスミキサー(2,500 rpm 程度の攪拌ができるもの)
- ⑧ マイクロピペット、マイクロピペット用チップ

* 遠心機によっては使用できないケースがありますので、遠心機の仕様をご確認の上、使用してください。

また本書での以下の基本計算式をもとに相対遠心加速度(\times g)と回転数(rpm)を算出しております。

ローターの回転半径は、遠心機によって変わりますので、遠心機取扱説明書のローター仕様ページをご確認ください。

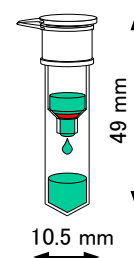
基本計算式

$$\text{RCF} = 1.118 \times R \times N^2 \times 10^{-6}$$

RCF: 相対遠心加速度(\times g) R: 回転半径(mm) N: 回転数(rpm)

5. カラム使用上の注意事項

- MonoFas[®] スピнкаラムは落としたり、ぶつけないでください。強い衝撃を与えるとシリカモノリスが割れることがあります。
- Buffer の保証期間は未開封、室温保存で購入日より1年間です。
- すべての工程は遠心操作で行ってください。
- オートクレーブ処理を行う場合には 110°C以下、20 分以内で行ってください。
- MonoFas[®] スピнкаラムは従来のタイプより通液抵抗が小さくなっておりまして、液の流出を止める場合にはスピнкаラムの蓋を閉めるようにしてください。
- 遠心機を用いる場合はチューブ類が装置の蓋などに接触しない事を確認の上ご使用ください。サイズは右図をご参照下さい。
- 遠心操作時はチューブの蓋を開けた状態で使用してください。蓋を閉めた状態では、スピнкаラム内が陰圧になるためスムーズに通液されません。
- 精製 DNA を分子生物学的操作に用いる場合には、十分に滅菌された容器や滅菌水などを用いてください。
- 本製品は消耗品ですので再使用はできません。

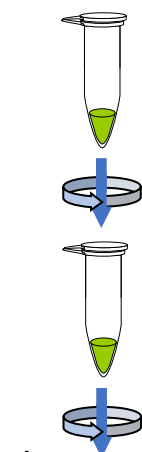


MonoFas[®] 培養細胞ゲノム DNA 抽出キット VI

- ご所属の機関の倫理委員会の規定に従い作業してください。また、カラムの廃棄の際には、遺伝情報が残らないことと、感染症への配慮を考慮してください。
- 余ったバッファの廃棄方法は、安全データシート(SDS)に記載された通り廃棄ください。

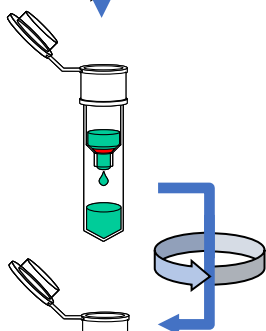
6. DNA 抽出プロトコルの簡易フロー

溶解



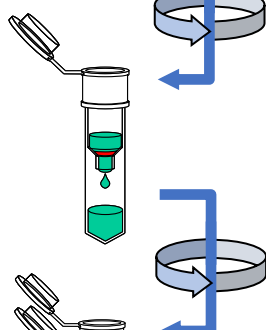
- ① 培養細胞 HEK293 細胞 $\sim 200 \mu\text{L}$ (1×10^7 細胞+PBS 希釈)に、Buffer A6 を $600 \mu\text{L}$ 、Proteinase K を $10 \mu\text{L}$ 添加し、ボルテックスミキサーで激しく攪拌する
- ② 70°C で 10 分間加温し、直ちにボルテックスミキサーなどで激しく攪拌する
- ③ イソプロパノール $200 \mu\text{L}$ を添加し、ボルテックスミキサーなどで激しく攪拌し、数秒間スピンドウンする

吸着



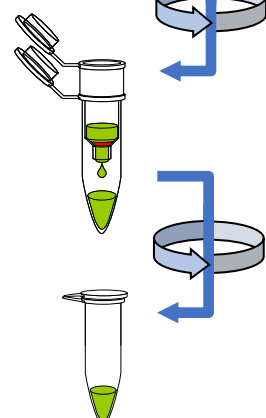
- ④ MonoFas カラムに溶解試料全量をいれて、遠心分離する $20,000 \times g$ ($15,000 \text{ rpm}$)、1 分間

洗浄



- ⑤ Buffer B6 を $500 \mu\text{L}$ 添加し、遠心分離する $20,000 \times g$ ($15,000 \text{ rpm}$)、1 分間

溶出



- ⑥ サンプリングチューブに載せかえるスピンカラム内部のふちに液が残った場合はキムワイプでふき取り、(注) 洗浄液中のエタノールが溶出液に混入すると、遺伝子増幅反応を阻害します
- ⑦ Buffer C6 を $20\sim 100 \mu\text{L}$ 添加し、1 分間程度静置する ($50 \mu\text{L}$ で 2 回溶出推奨)
- ⑧ 遠心分離し $20,000 \times g$ ($15,000 \text{ rpm}$)、1 分間、抽出 DNA を得る
(注) 抽出 DNA は -20°C 保存してください

<注意事項>

工程①: 新鮮培養細胞又は凍結培養細胞を準備してください。培養細胞を PBS 所定量 200 μ L 中の細胞数は 1×10^7 細胞個まで希釈し、Buffer A6 を 600 μ L 加えてボルテックスミキサーなどで激しく攪拌してください。

注 1) 培養細胞量が多すぎた場合、カラムの目詰まり、回収量減少、精度低下の可能性があります。目詰まりした場合は、細胞量を減らして検討してください。DNA が分解するため、室温で細胞を放置しないでください。

注 2) 凍結細胞を使用する場合は、室温にしてから直ちに Buffer A6 を加えてください。新鮮な細胞を使用する場合は、所定量の細胞へ Buffer A6 を加えてください。70°Cにて攪拌しながら、細胞を完全に溶解させます。攪拌しなかった場合、所定量の細胞でも完全に溶解しない場合があります。加温できるシェーカーなどで攪拌してください。または、加温しながら時々ボルテックスして細胞をよく溶解してください。溶解しにくい場合は、加温時間を延長してください。

注 3) Buffer A6 の混和がボルテックスで不十分なときは、タッピング、ピペッティングあるいは転倒混和などでよく混ぜてください。

工程②: 70°Cで 10 分間加熱する(インキュベーション)。加温しながら時々ボルテックスして血液をよく溶解してください。

工程③: 特級イソプロパノールを 200 μ L 添加し、ボルテックスして混和する。数秒間スピンドウンして、キャップや壁についた液を収集する。ライセート完成後は、速やかに抽出操作を行ってください。

工程④: ライセートを数回ピペッティングし、カラムに全量添加する。カラムの蓋をしっかりと閉め、20,000 \times g (15,000 rpm) にて1分間遠心する。遠心機からカラムと廃液容器を注意深く取り出す。廃液入った容器を捨てる。

注) 試料によっては凝集物ができることがありますが、すべての凝集物ごとカラムへ添加します。遠心後ライセートがカラム内に残っている場合、最高速度で再度遠心操作を行ってください。

工程⑤: 注意深くカラムの蓋を開け、Buffer B6 を 500 μ L を添加する。カラムの蓋をしっかりと閉め、20,000 \times g (15,000 rpm) にて1分間遠心する。遠心機からカラムと廃液容器を注意深く取り出す。廃液入った容器を捨てる。

注) 遠心後 Buffer B6 がカラム内に残っている場合、最高速度で再度遠心操作を行ってください。

注) Buffer B6 が残余すると回収率が悪くなる場合がありますので注意してください。

注) カラム内部のふちに液が残った場合はキムワイブ等でふき取ってください。

工程⑥: カラムをサンプリングチューブにのせかえます。注意深くカラムの蓋を開け、Buffer C6 を 20~100 μ L モノリス表面の中央に添加してください。その後 20,000 \times g (15,000 rpm) で 1 分間遠心し、溶出する。遠心機からカラムと回収チューブを注意深く取り出し、カラムを捨てる。例えば: 100 μ L で溶出する場合は 50 μ L で 2 回溶出すると DNA の回収量が増加します。

注) MonoFas カラムに添加した溶出 Buffer D4 は、ほぼ全量が回収されます。溶出液量を 10 μ L まで下げられますが、その場合、収量が低下します。

* 回収したゲノム DNA をすぐに使用しない場合は、回収容器のキャップをしっかりと閉めた後、-20°Cで保存することをお勧めします。

* 本製品に同封されている Buffer C6 以外に、RNase・DNase フリー滅菌水に置き換えることができます。その場合、pH により回収率が変動するためアンモニア水や水酸化カリウムなどで pH 8.5~9.0 に調整してご使用ください。

<培養細胞に関する注意事項>

- ① 培養細胞をすぐに使用しない場合は、冷凍保存(-0°Cまたは-80°C)してください。室温で放置したり、凍結、溶解を繰り返すと、DNA が分解したり、回収量が減少することがあります。
- ② 処理可能量を超えた培養細胞をロードすると、性能が低下し、最悪の場合、カラムの目詰まりを引き起こします。

<操作に関する注意事項>

- ① 所定量の Buffer A6 を培養細胞へ浸してください。試薬容量はプロトコールに記載された量を厳守してください。
- ② コンタミネーションを防ぐために毎回ピペットチップを交換してください。
- ③ 遠心後、遠心機からカラムと廃液容器を取り外す際は、廃液がカラム先端に付着しないよう注意深く取り外してください。付着した場合は軽くスピンドウンを行ってください。
- ④ 遠心機内の温度が上昇するのを防ぐため、遠心機の連続運転は避けてください。
- ⑤ 抽出の途中では時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- ⑥ 感染性のおそれのあるサンプルを使用した場合、使用後廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので、適切な処理を行ってください。
- ⑦ 組織細胞、口腔粘膜細胞、植物組織とマウス尾の場合でプロトコールが異なります。所定のプロトコールをお使いください。

7. 保存及びその他の注意

- 室温(15°C ~ 25°C)で保存してください。
- 洗浄液には、揮発性の高いエタノールが含まれています。ご使用後は、蒸発を防ぐために必ず蓋を閉めてください。
- MonoFas® 抽出・精製キットは温度変化が小さく、湿気の少ない涼しく清浄な暗所に保管してください。
- MonoFas® 抽出・精製キットは厳しい品質管理のもとで製造、検査、包装、出荷しておりますが、万一不具合がありましたら弊社までご連絡ください。
- 本製品は培養細胞からのゲノム DNA 抽出・精製の目的で製造しております。それ以外の目的での使用および本取扱説明書に基づかない方法では使用しないでください。
- 本試薬キットを使用前に、安全データシート(SDS)の記載内容をご一読ください。
安全データシート(SDS)の詳細は弊社 HP(URL <http://www.animos.co.jp>)よりダウンロードして入手願います。

8. 保証期間

- 各種 Buffer の保証期間は未開封、室温保存で購入後 1 年間です。
各種 Buffer が追加で必要な際には、最寄りの支店または営業所までご連絡ください。

ゾルーゲル法によるシリカモノリスは、国立大学法人京都大学 曾我直弘先生、中西和樹先生により開発されました。この技術と、ジールサイエンス株式会社が所有する製品商標及び特許のライセンスを受けて、MonoFas® シリーズ製品を株式会社アニモスが開発・製造しています。

お問い合わせ先：株式会社アニモス

〒333-0844 埼玉県川口市上青木 3-12-18

TEL:048-606-2829 FAX:048-611-7192 E-mail:monofas@animos.co.jp

MonoFas® 培養細胞ゲノム DNA 抽出キット VI