血液、血清、血しょうからの DNA 抽出キット

アイソスピン

ISOSPIN Blood & Plasma DNA

マニュアル（第 3 版）

Code No. 312-08131

NIPPON GENE CO., LTD.

I　製品説明

ISOSPIN Blood & Plasma DNA（アイソスピン ブラッド＆プラズマ DNA）は、血液、血清、血しょうから DNA を抽出するためのキットです。
本キットは、カオトロピックイオン存在下で DNA がシリカへ吸着する原理を応用しており、フェノールやクロロホルムなどの毒性有機溶媒を使用しません。使用するスピンカラムは、カラム容積を最大限確保しており、内封されたシリカゲル膜は、充分な DNA 吸着容量と高い溶出効率を確保しています。本キットを使用して得られた DNA はリアルタイム PCR などの各種分子生物学実験に使用することが可能です

II　キット内容

ISOSPIN Blood & Plasma DNA (Code No. 312-08131)

キット構成品	容量（50 回用）	保存温度	備考
BE Buffer	15 ml × 1 本	室温	
Proteinase K	1 ml × 1 本	–20℃	
BW1 Buffer	48 ml × 1 本	室温	エタノール含有＊1
BW2 Buffer	35 ml × 1 本	室温	エタノール含有＊1
Elution Buffer	14 ml × 1 本	室温	組成：10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.1 mM EDTA
Spin Column	50 本 × 1 袋	室温	上部パーツ：カラム 下部パーツ：Collection Tube
Collection Tube	50 本 × 2 袋	室温	

III　保存

輸送・保管温度：　**室温**（到着後、Proteinase K は–20℃保存）

＊1 BW1 Buffer および BW2 Buffer には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速やかに蓋を閉め、保管して下さい。

Ⅳ　使用上の注意

・ 本品は、試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
・ 試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱わないで下さい。
・ 本品の取り扱いは、マニュアル記載内容通りに行って下さい。
・ マニュアル記載内容と異なった取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。
・ 製品安全データシート（SDS）は、ニッポンジーン Web サイト（www.nippongene.com）よりご覧になれます。

Ⅴ　プロトコール

＜キット以外に必要な器具、機器など＞

試　薬：　・エタノール

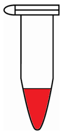
器　具：　・マイクロピペット
　　　　　・ピペットチップ
　　　　　・1.5 ml マイクロチューブ

機　器：　・卓上遠心機（スピンダウン用）
　　　　　・遠心分離機
　　　　　・ボルテックスミキサー
　　　　　・ヒートブロック

＜抽出プロトコールを始める前に＞

□ 血液サンプルを室温（15℃～25℃）に戻す。
□ ヒートブロックを 56℃に加熱しておく。

＜抽出プロトコール＞



① 1.5ml マイクロチューブに Proteinase K を 20μl 加える。

② 室温に戻した血液あるいは血しょう、血清サンプルを転倒混和にて撹拌し、200～250μl 加える。

注）サンプルが有核赤血球を含む血液（魚類、両生類、爬虫類、鳥類の血液）の場合、血液10μl に生理食塩水 190 μl を加えたものを抽出サンプルとする。

注）撹拌が不十分の場合、同一サンプルでも DNA の抽出量に差が生じる場合がある。

注）サンプルが 200μl 以下の場合、生理食塩水でサンプル量を 200μl に合わせる。

PBS など緩衝能のある Buffer を使用すると抽出効率が低下する。

③ サンプルと等量（200～250μl）の BE Buffer を加え、ボルテックスミキサーで 15 秒間撹拌する。軽くスピンダウンする。

注）サンプルと BE Buffer が完全に混和するように撹拌する。

撹拌が不足している場合、抽出効率が低下する。

注）RNA フリーな DNA が必要な場合は BE Buffer を添加する前に、Ribonuclease (DNase free) Glycerol Solution（Code No. 312-01931）を 20μl 添加する。

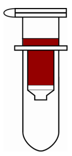
④ 56℃で 10 分間保温する。

⑤ サンプルと等量（200～250μl）のエタノールを加える。ボルテックスで 15 秒撹拌し、軽くスピンダウンする。

注）混合液とエタノールが完全に混和するように撹拌する。

撹拌が不足している場合、抽出効率が低下する。

↓



⑥ メンブレンに DNA を吸着させるため、混合液を全量 Spin Column に添加する。

注）血清、血しょうサンプルの場合、一つのカラムに複数の混合液を添加することができる。

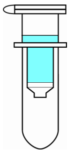
ただし、混合液の添加回数が増えるとカラムが目詰まりする可能性がある。

通常の血しょうサンプルでは一つのカラムに 5 回まで混合液の添加が可能だが、目詰まりしやすい場合は混合液の添加回数を控えるようにする

⑦ 遠心（12,000×g、1 分間、室温）する。

⑧ ろ液を Collection Tube ごと廃棄し、カラムを新しい Collection Tube に装着する。

↓

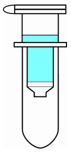


⑨ 洗浄のため、750μl の BW1 Buffer を Spin Column に添加する。

⑩ 遠心（12,000×g、1 分間、室温）する。

⑪ ろ液を Collection Tube ごと廃棄し、カラムを新しい Collection Tube に装着する。

↓



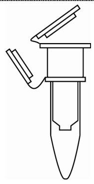
⑫ 洗浄のため、500μl の BW2 Buffer を Spin Column に添加する。

⑬ 遠心（12,000×g、5 分間、室温）する。

⑭ ろ液を Collection Tube ごと廃棄し、カラムを新しい 1.5ml マイクロチューブに装着する。

注）ろ液が付着しないようにカラムを慎重に取り外し、新しいチューブへ装着する。
カラム本体にろ液が付着した場合はオプションプロトコールを行う。

↓



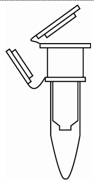
※ 【オプションプロトコール】

○ Spin Column を空の状態のまま遠心（12,000×g、1 分間、室温）し、メンブレンを乾燥させる。

注）オプションプロトコールを行うことで BW2 Buffer に含まれるエタノールをより丁寧に取り除くことができる。

○ ろ液を 1.5ml マイクロチューブごと廃棄し、カラムを新しい 1.5ml マイクロチューブに装着する。

↓



⑮ DNA を溶出させるため、20 ~ 200μl の Elution Buffer をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置する。

注）Elution Buffer（10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 9.0）の代わりに Nuclease フリー水も溶出液として使用できる。回収した DNA 溶液を長期保存する場合は、Elution Buffer で溶出することを勧める。

注）Elution Buffer の量と DNA 濃度および回収量の関係は p.7 のデータを参照。

⑯ 遠心（12,000×g、1 分間、室温）する。

⑰ DNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される。

＜簡易プロトコール＞

ヒートブロックを 56℃に温めておく
血液あるいは血しょう、血清を室温に戻す

1.5 ml マイクロチューブに Proteinase K を 20 μl 添加
血液あるいは血しょう、血清を転倒混和後、200〜250 μl 添加

← サンプルと等量（200 ~ 250 μl）の BE Buffer を添加
ボルテックスミキサーで 15 秒間撹拌
軽くスピンダウン

56℃で 10 分間保温

← サンプルと等量（200 ~ 250 μl）のエタノールを添加
ボルテックスミキサーで 15 秒間撹拌
軽くスピンダウン

↓

Spin Column に混合液を全量添加

遠心（12,000×g, 1 分間，室温）
ろ液を Collection Tube ごと廃棄し、カラムを新しい Collection Tube に装着

← 750 μl の BW1 Buffer を添加
遠心（12,000×g, 1 分間，室温）
ろ液を Collection Tube ごと廃棄し、カラムを新しい Collection Tube に装着

← 500 μl の BW2 Buffer を添加
遠心（12,000×g, 5 分間，室温）
ろ液を Collection Tube ごと廃棄

↓

Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す

【オプション】
空の状態で遠心（12,000×g, 1 分間，室温）
カラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブに装着

← 20 ~ 200 μl の Elution Buffer をメンブレン中央に滴下
室温静置　3 分間

遠心（12,000×g, 1 分間，室温）

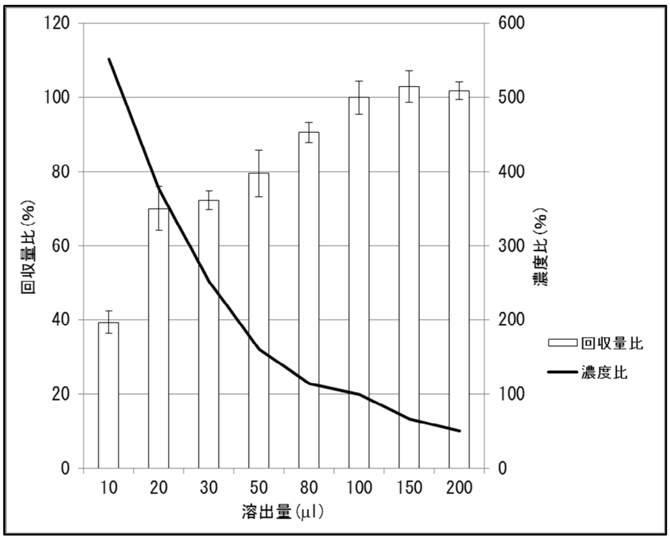
↓

DNA 溶液

VI　トラブルシューティング

トラブル	予想される原因	対　策
低収量	抽出液と血液の撹拌が不十分	BE Buffer と血液サンプルをボルテックスミキサーで 15 秒以上しっかり撹拌する。
	混合液とエタノールの撹拌が不十分	混合液とエタノールをボルテックスミキサーにて 15 秒撹拌した後、カラムにアプライする。
	溶出の効率が悪い	100 µl ~ 200 µl の Elution Buffer で溶出すると溶出の効率が最も良くなる。ただし溶出される DNA の濃度は低くなる。
	Elution Buffer ではなく蒸留水で溶出した。	蒸留水の pH が低い場合 DNA の回収量が少なくなる。蒸留水で溶出する場合は pH を確認し pH 7.0 以下のものは使用しない。
一回目のカラムの洗浄後もメンブレンが着色する	サンプルの溶解が不十分	抽出液と血液をボルテックスミキサーで 15 秒以上しっかり撹拌する。
	カラムの洗浄が不十分	プロトコール⑫を行う前に、BW1 Buffer を使用したカラムの洗浄（プロトコール⑧ ~ ⑪）をもう一度行う。
得られたDNAの濃度が低い	溶出量が多すぎる	20 µl ~ 50 µl の Elution Buffer で溶出すると DNA 濃度が高くなる。ただし DNA の回収量は少なくなる。
抽出したDNAを用いたダウンストリーム実験がうまくいかない	溶出した DNA 溶液中にエタノールが残留している。	BW2 Buffer で洗浄した後、カラムにろ液が付着しない様に慎重に取り外し、新しいチューブへ装着する。カラムにろ液が付着した場合はオプションプロトコールを行いカラムからろ液を取り除く。

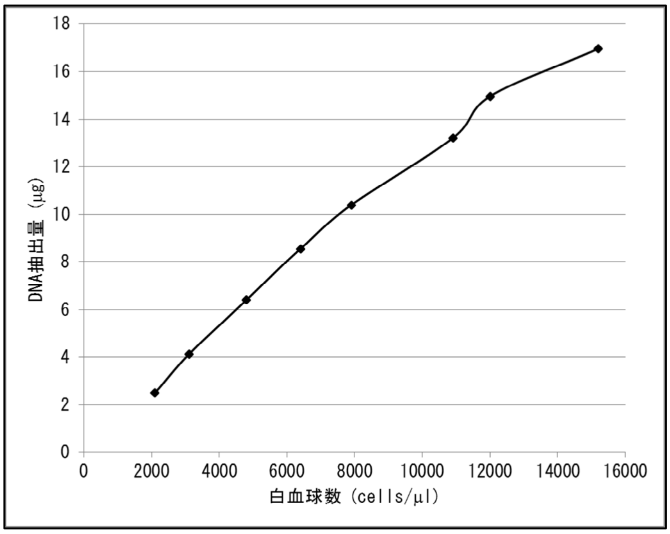
VII　データ



溶出液量による DNA 回収量と濃度の変動

100μl 溶出時の回収量および濃度を

100 とした場合



白血球数と DNA 回収量の関係

サンプル量：200μl

溶出 Buffer 量：100μl

VIII　関連製品

Code No.	製品名	包装単位
312-01931	Ribonuclease (DNase free) Glycerol Solution	1 ml
319-08141	Collection Tube	100 回用
315-08143		500 回用

株式会社ニッポンジーン

研究試薬部 学術営業課　TEL 076-451-6548　URL https://www.nippongene.com/

・お問い合わせは、お電話もしくは WEB フォームより承っております。
・マニュアル記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。