

動物組織、魚介類、昆虫からの DNA 抽出キット

アイソスピソ

ISOSPIN Tissue DNA

マニュアル（第 2 版）

Code No. 316-08891

NIPPON GENE CO., LTD.

I 製品説明

ISOSPIN Tissue DNA は、動物組織、魚介類、昆虫などから高純度なゲノム DNA を抽出・精製するためのキットです。

本キットでは、Proteinase K と界面活性剤存在下での加熱処理により試料を溶解させ、DNA 以外のタンパク質や多糖類等の夾雑物を遠心分離により除去してから、スピncラム法で DNA を精製します。そのため、効率的に組織から DNA を回収することができ、特に今まで抽出困難であった粘性物質（多糖類）等を多く含む魚介類などから高純度の DNA を抽出することができます。

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たスピncラムによる DNA 精製方法を採用しており、人体に有害なフェノールやクロロホルム等の毒性有機溶媒を使用しません。また、使用するスピncラムに内封されたシリカメンブレンは、十分な DNA 吸着容量と高い溶出効率を確保しています。

II キット内容

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

キット内容： ISOSPIN Tissue DNA（50 回用）

キット内容品	容量	備考
Ti Extraction1 Buffer	22.5 ml × 1 本	
Ti Extraction2 Buffer	2.5 ml × 1 本	
Ti Binding Buffer	30 ml × 1 本	エタノール含有 ^{*1, *2}
Ti Wash1 Buffer	40 ml × 1 本	エタノール含有 ^{*1, *2}
Ti Wash2 Buffer	45 ml × 1 本	エタノール含有 ^{*2}
RNase A (100 mg/ml)	250 µl × 1 本	長期保存の場合、冷蔵/冷凍 ^{*3}
Proteinase K (20 mg/ml)	1 ml × 1 本	冷凍保存
Elution Buffer	3 ml × 1 本	
Spin Column	50 本 × 1 袋	上部パーツ：カラム 下部パーツ：Collection Tube

*1 Ti Binding Buffer および Ti Wash1 Buffer は、ボトルの蓋を開ける際の湿度の変化により、ボトルの口まわりに白い結晶が生じる場合があります。蓋を閉めた後、さらにチャック付き袋等に入れて保管することをおすすめします。DNA 抽出操作には影響ありません。

*2 Ti Binding Buffer、Ti Wash1 Buffer、Ti Wash2 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。

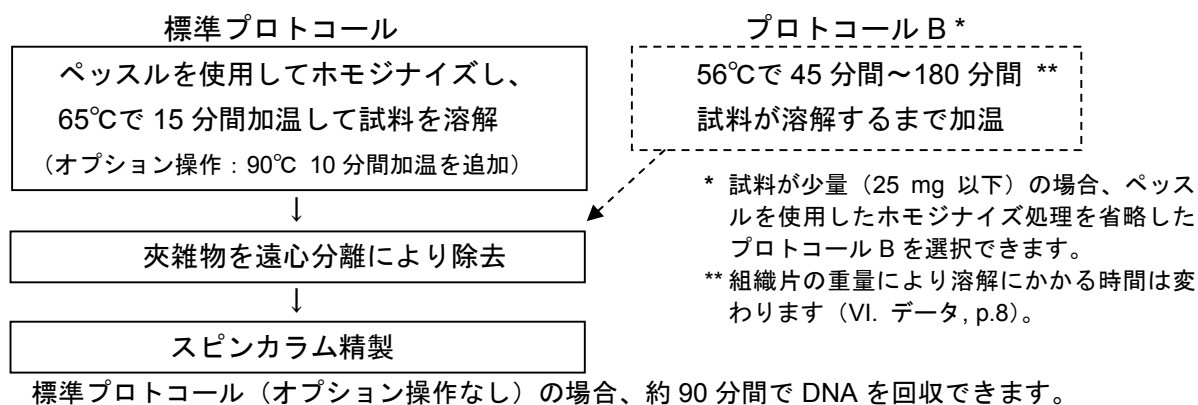
*3 RNase A は室温保存が可能ですが、長期間ご使用にならない場合には、冷蔵（2~10℃）もしくは冷凍（-20℃）保存して下さい。

III 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いしないで下さい。
- ・ 本品の取扱いは、マニュアル記載内容通りに行ってください。
- ・ 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）につきましては、ニッポンジーンのウェブページ (<https://www.nippongene.com/siyaku/list.html>) よりご覧になれます。

IV プロトコール

<プロトコールの選択>



<キット以外に必要なもの>

- ・ ボルテックスミキサー
- ・ マイクロピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ ペッスル
- ・ 1.5 ml マイクロチューブ
- ・ 遠心分離機（4°C）
- ・ ヒートブロック（65°Cまたは 56°C、必要に応じて 90°C）

<必要に応じて別途用意するもの>

- ・ ハサミ（またはメス、カッターなど）
- ・ 液体窒素、乳鉢、乳棒

<標準プロトコール>

効率よく組織を破碎するため、チューブの形状に合わせたペッスルを使用して下さい。

試料の溶解

- ① 細断した 5-100 mg の組織（試料）を 1.5 ml マイクロチューブに入れる。
注）あらかじめ、組織を滅菌処理したはさみなどで細かく刻むか、液体窒素中で粉碎する。
注）試料の量が多すぎると、試料の溶解が不十分となり DNA の分解が進んだり、カラムが目詰まりしたりするため、少量の試料から検討を始め、段階的に試料の量を増やす。
- ② 試料に 450 μ l の Ti Extraction1 Buffer を加え、ペッスルですり潰す。
注）懸濁液中に試料の塊が残っていると塊の中の DNA が抽出できず、収量低下の原因となるため、念入りにすり潰す。チューブを光にかざすと懸濁液中の塊が確認しやすい。
- ③ **オプション**：90°C で 10 分間加温する（静置）。加温後、室温で 5 分間冷ます。
注）粘性物質などでカラムが目詰まりする、試料の色素が最終溶液に残る場合は、本操作③（オプション）を行う。夾雑物が少ない試料の場合、本操作を省略できる。
- ④ 5 μ l の RNase A、20 μ l の Proteinase K を加え、ボルテックスでよく攪拌する。
65°C で 15 分間加温する。加温中、5 分おきに 10 秒間ボルテックスで攪拌する。
↓

夾雑物を遠心分離により除去

- ⑤ 50 μ l の Ti Extraction2 Buffer を加え、20 秒間ボルテックスで攪拌する。
遠心（13,000 \times g、10 分間、4°C）し、上清を新しいマイクロチューブに回収する。
注）沈殿物や液表面の膜上の析出物をなるべく取らないように上清を回収する。
注）回収した上清に析出物が多く入ってしまった場合、再度遠心（13,000 \times g、10 分間、4°C）し、析出物をペレットにしてから上清を回収する。
- ⑥ 上清に対して等量の Ti Binding Buffer を加え、均質になるまで転倒混和する。
遠心（13,000 \times g、30 秒間、4°C）し、上清（混合液）を新しいマイクロチューブに回収する。
例）上清 450 μ l の場合は、Ti Binding Buffer 450 μ l を添加するため、混合液は 900 μ l になる。
↓

スピнкаラム精製

- ⑦ メンブレンに DNA を吸着させるため、900 μ l の混合液を Spin Column に添加する。
注）混合液量が 900 μ l より多い場合はステップ⑦～⑧を繰り返して、1 本の Spin Column に全量を添加する。
- ⑧ 遠心（13,000 \times g、1 分間、4°C）し、ろ液を捨てて、カラムを Collection Tube の上に再度戻す。
- ⑨ 700 μ l の Ti Wash1 Buffer を Spin Column に添加し、遠心（13,000 \times g、1 分間、4°C）

する。ろ液を捨てて、カラムを Collection Tube に再度戻す。

⑩ 500 μ l の Ti Wash2 Buffer を Spin Column に添加し、遠心（13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C）する。

⑪ 300 μ l の Ti Wash2 Buffer を Spin Column に添加し、遠心（13,000 \times g、2 分間、4 $^{\circ}$ C）する。ろ液を捨てる。

注）Ti Wash2 Buffer による 2 回目の洗浄では、添加量と遠心時間が異なる。

⑫ Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上のせる。

⑬ DNA を溶出させるため、50 μ l 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）の代わりに Nuclease フリー水も溶出液として使用できる。

⑭ 遠心（13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C）する。

⑮ DNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される。

<プロトコール B>

ペッスルを使用しない場合、以下の手順で試料を溶解して下さい。

試料の溶解

① 5-25 mg の組織（試料）を 1.5 ml マイクロチューブに入れる。

注）あらかじめ、組織をはさみなどで細かく刻むか、液体窒素中で粉碎する。

注）少量の試料（5 mg）から検討を始め、段階的に試料の量を増やす。

② 試料に 450 μ l の Ti Extraction1 Buffer を加え、ボルテックスでよく攪拌する。

20 μ l の Proteinase K を加え、ボルテックスでよく攪拌する。

③ 56 $^{\circ}$ C で試料が溶解するまで加温する。加温中、5~15 分おきに 10 秒間ボルテックスで攪拌する。

注）組織片の重量により溶解にかかる時間は変わるため、データ VI（p.8）を参照する。

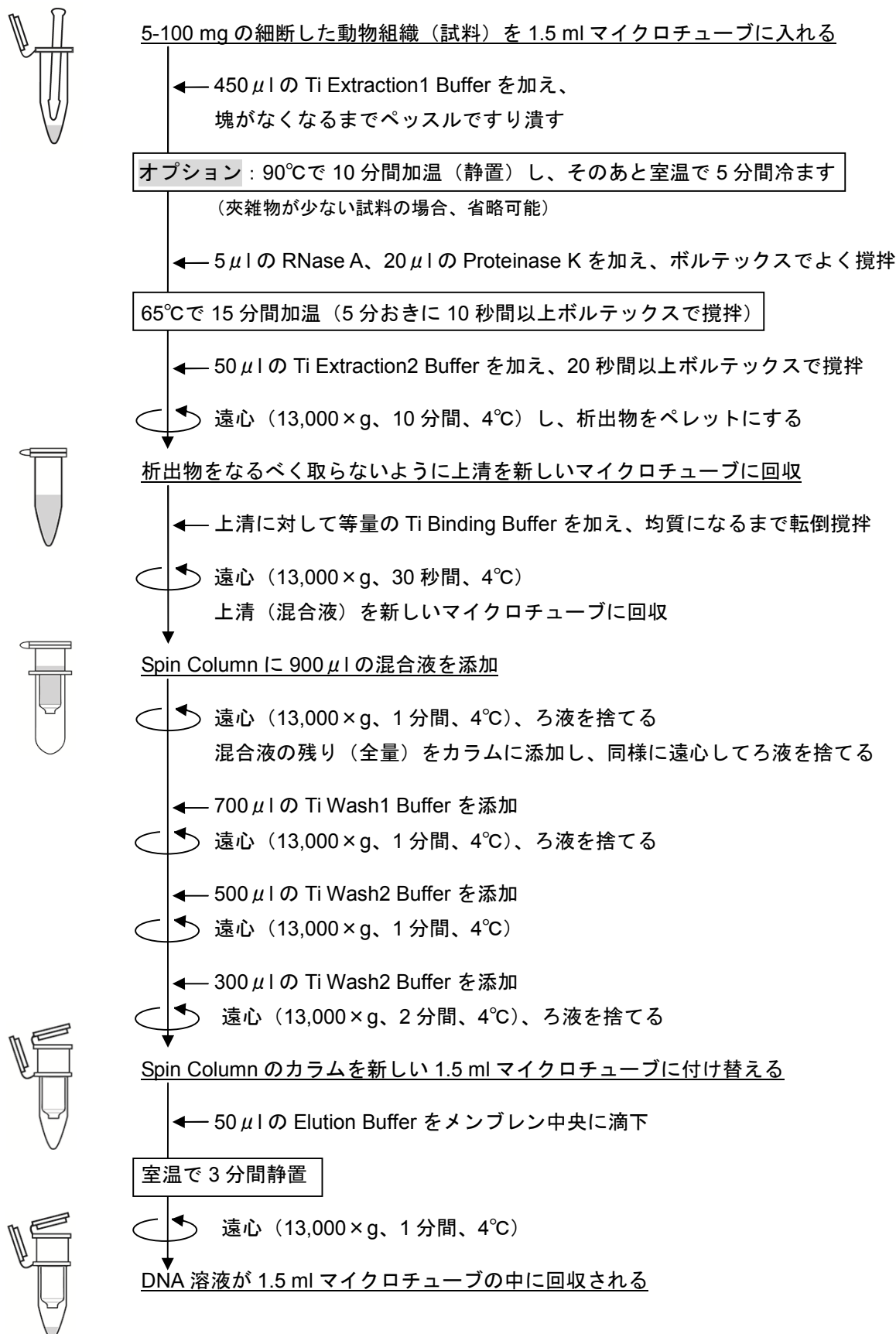
④ 5 μ l の RNase A を加え、ボルテックスでよく攪拌する。室温で 5 分間冷ます。

↓

ステップ⑤以降（夾雑物除去とスピнкаラム精製）は、<標準プロトコール>と同じ

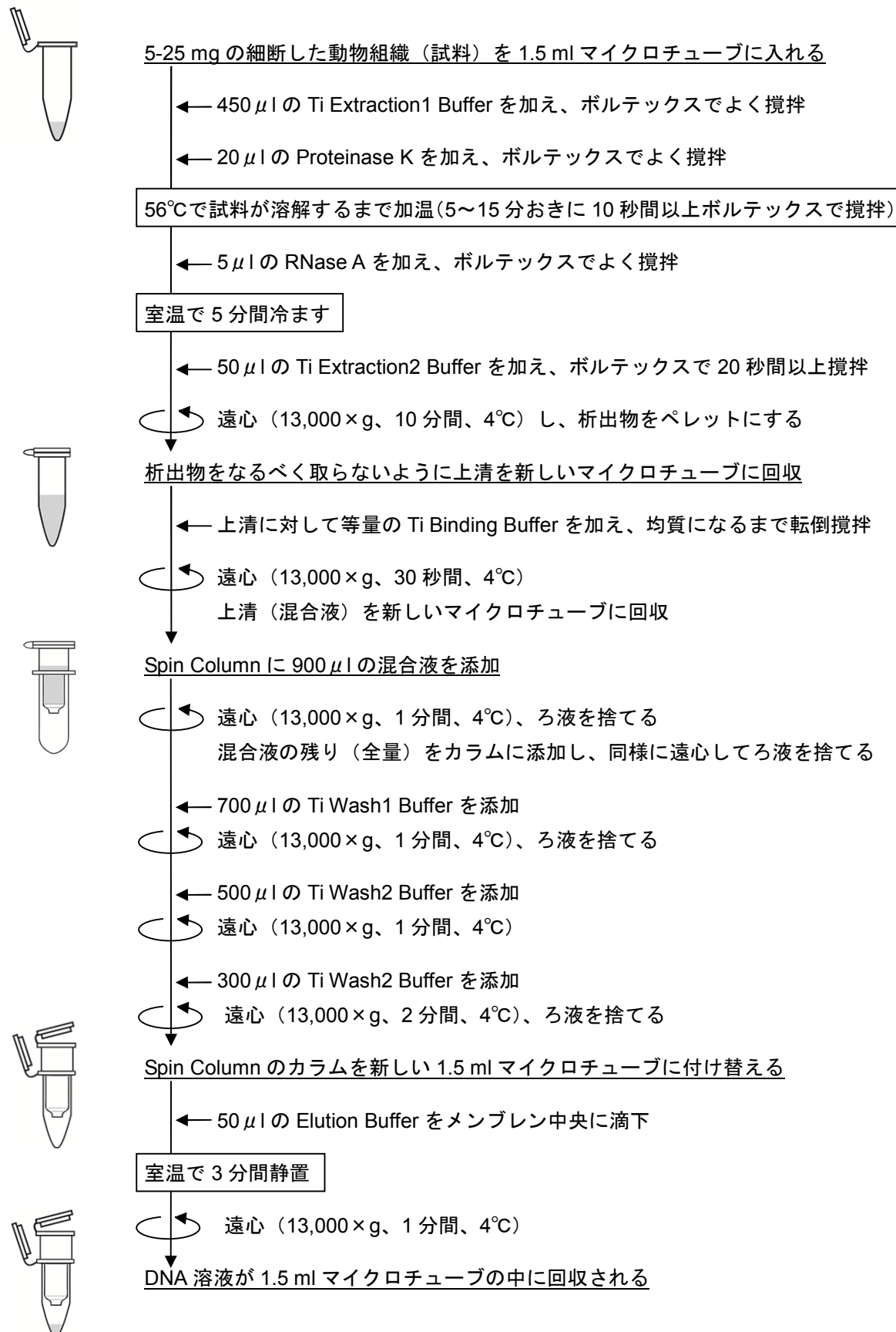
■ 標準プロトコール（簡易版）

効率よく組織を破碎するため、チューブの形状に合わせたペッスルを使用して下さい。



■ プロトコール B (簡易版)

ペッスルを使用しない場合、加温 (56°Cで最長 180 分間) して試料を溶解して下さい。



V 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	DNA が分解している。	<ul style="list-style-type: none"> 新鮮な試料を用いる。 すぐに DNA 抽出できない場合は、速やかに凍結させる。 保存状態が悪い試料の場合、オプション操作の 90°C 加温（標準プロトコールのステップ③）をやめる。
	Ti Extraction1 Buffer 中の試料のホモジナイズが不十分。	<ul style="list-style-type: none"> Ti Extraction1 Buffer 中で試料の塊がなくなり、均一な懸濁液となるまで、ペッスルを用いて念入りにすり潰す。 チューブ形状に適したペッスルを用いる。例えば、丸底チューブには丸底チューブ用のペッスルを使用する。事前に空のチューブにペッスルをはめて、隙間がないか確認する。
低純度	粘性物質を含む多糖類などの夾雑物が多い試料である。	<ul style="list-style-type: none"> オプション操作（標準プロトコールのステップ③）を行う。
	Spin Column に、Ti Binding Buffer 添加後の遠心で生じた沈殿（夾雑物）が持ち込まれた。	<ul style="list-style-type: none"> ステップ⑥で、試料によっては目視で分かりづらいゲル状の沈殿物を形成することがある。上の方から慎重に上清を 800 μl 取って新しいチューブに移し、残りの上清を先の細いチップで回収する。沈殿があるとチップ内で液が詰まり吸引しにくくなるので、上清と沈殿の判別ができる。
	洗浄が不十分。	<ul style="list-style-type: none"> Ti Wash1 Buffer による洗浄（ステップ⑨）を 400 μl と 300 μl に分けて 2 回行う。 ステップ①で、試料量を半分以上減らす。
Spin Column の目詰まり	夾雑物を取り除かれていない。	<ul style="list-style-type: none"> 上記「低純度」の対策を行う。 そのまま操作を続けたい場合は、遠心時間を 2 倍程度に延長し、カラムから Buffer が抜けたら次工程へ進む。しかしこの場合、抽出物の純度は低くなる可能性がある。
吸光度値のばらつき	低収量である。	<ul style="list-style-type: none"> 上記「低収量」の対策を行う。
	低純度である。	<ul style="list-style-type: none"> 上記「低純度」の対策を行う。

VI データ

1. 標準プロトコールとプロトコール B の比較

標準プロトコールではペッスルを使用して試料のホモジナイズを行っているのに対し、プロトコール B では、ペッスルを使用しないで 56°Cでの加温により試料を溶解しています。このとき、組織片の重量により溶解にかかる時間は変わります。

<プロトコール B で組織片の溶解にかかる加温時間>

(各重量の組織片を 56°Cで加温中、15 分おきにボルテックスした場合)

組織	5 mg	10 mg	15 mg	20 mg	25 mg
マウス肝臓	60 分	90 分	120 分	150 分	180 分
トリ肝臓	45 分	75 分	75 分	105 分	120 分
アサリ外套膜	45 分	45 分	60 分	60 分	60 分

<プロトコール B で抽出した場合の DNA 収量>

(標準プロトコールで抽出した場合の DNA 収量を 100%とした場合の相対比)

組織	5 mg	10 mg	15 mg	20 mg	25 mg
マウス肝臓	100%	75%	42%	32%	25%
トリ肝臓	100%	100%	42%	31%	28%
アサリ外套膜	100%	100%	100%	100%	100%

2. 各種試料からの DNA 抽出例

標準プロトコール (90°C加温のオプション操作なし) で抽出した DNA 収量の目安です。

生物種	部位	収量
アサリ	足	100 ng/mg tissue
	外套膜	160 ng/mg tissue
	水管	180 ng/mg tissue
	中腸腺	350 ng/mg tissue
	エラ	500 ng/mg tissue
	閉殻筋	100 ng/mg tissue
サバ	エラ	124 ng/mg tissue
	角膜	10 ng/mg tissue
	水晶体	0.5 ng/mg tissue
	ガラス体	4 ng/mg tissue
	網膜	110 ng/mg tissue
イエバエ	脚	380 ng/mg tissue
	個体	350 ng/mg tissue
チャバネゴキブリ	脚	450 ng/mg tissue
	個体	250 ng/mg tissue
アリ	個体	73 ng/mg tissue
ヒメグモ	個体	177 ng/mg tissue
トリ	肝臓	700 ng/mg tissue
マウス	脳	110 ng/mg tissue
	肝臓	660 ng/mg tissue
	腎臓	320 ng/mg tissue
	尾	400 ng/mg tissue
ヒト	口腔粘膜	10 ng/mg tissue
	毛根	18 ng/本
	爪	5 ng/mg tissue
HeLa 細胞 (参考 1)	培養細胞	4,000 ng/10 ⁶ cells

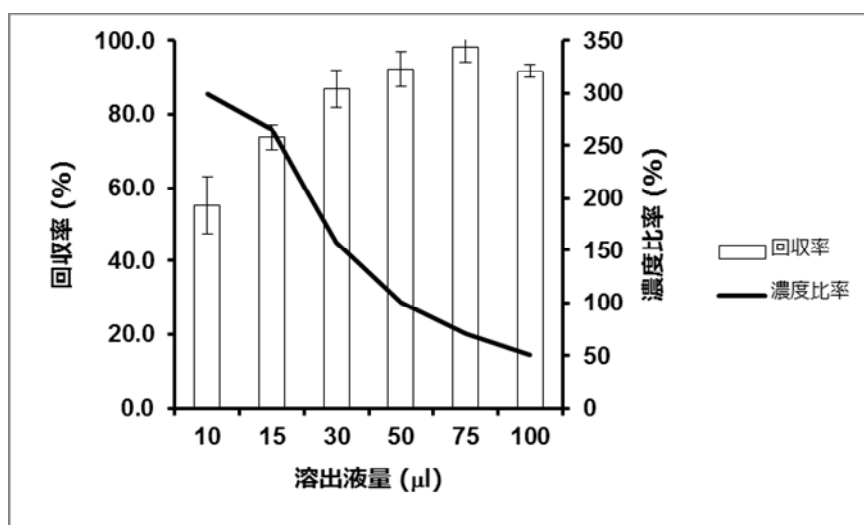
(参考 1) 培養細胞から DNA を抽出する場合、より短時間 (約 30 分間) で効率よく回収できる「ISOSPIN Blood & Plasma DNA」(Code No. 312-08131) をお勧めします。

3. スピнкаラム製品性能

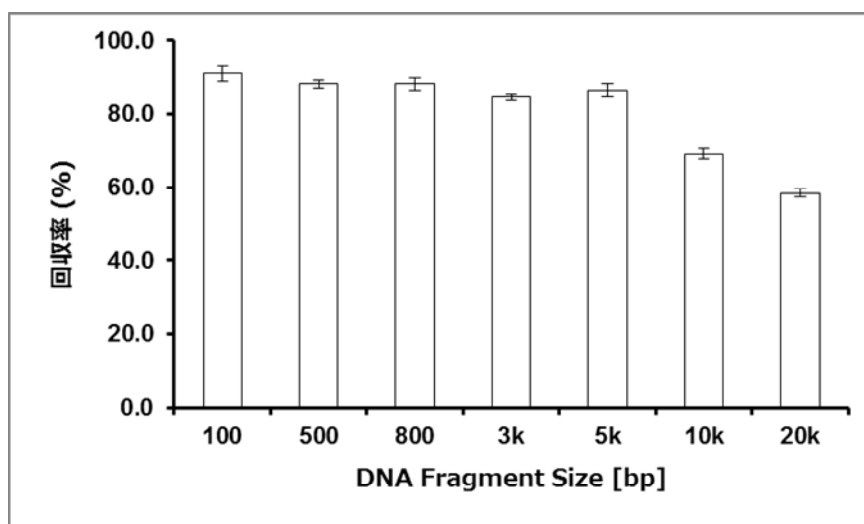
DNA 吸着容量	20 μ g
最低溶出液量	10 μ l
回収効率	60-95% (100 bp – 20 kbp) (参考 2)
カラム容量	900 μ l

<溶出液量による回収効率の変動と精製産物の濃度変動 (参考 2) >

(濃度比率 : 50 μ l 溶出時の濃度を 100%とした場合の相対比)



<DNA 断片サイズによる回収効率の変動 (参考 2) >



(参考 2) 「ISOSPIN PCR Product」 (Code No. 315-08001) データより抜粋。

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。

お問い合わせ先

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/siyaku/>

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。