

Code No. 296-67701 (50 reactions)

Wako

for Genetic Research
DNA Extractor[®] TIS Kit

[Introduction]

The DNA Extractor[®] TIS Kit is specially designed for the extraction of DNA from human and animal parenchyma tissue. The base of this kit is a procedure using Sodium Iodide (NaI) as a chaotropic agent, which allows for a safe extraction without hazardous phenol/chloroform. The procedure using Sodium Iodide is an extraction procedure which causes less oxidation of DNA. Additionally, the DNA Extractor[®] TIS Kit is able to inhibit the oxidation of DNA by using an Oxidation Inhibitor. The DNA Extractor[®] TIS Kit is a most useful DNA extraction kit for the assay of 8-OHdG (8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine) which is a marker of oxidative stress.

[Features]

- 1) Useful for the assay of markers of oxidative stress.
- 2) Based on the procedure using Sodium Iodide which causes less oxidation of DNA.
- 3) Inhibits the further oxidation of DNA by using an Oxidation Inhibitor.
- 4) Suitable for a wide range of applications which require the extraction of DNA from human and animal parenchyma tissue.

[Kit contents]

- | | |
|-------------------------------|------------|
| 1) Lysis Solution | 75 mL × 2 |
| 2) Enzyme Reaction Solution | 15 mL × 1 |
| 3) RNase Solution | 50 μL × 1 |
| 4) Protein Digestion Solution | 750 μL × 1 |
| 5) Oxidation Inhibitor | 350 μL × 1 |
| 6) Sodium Iodide Solution | 15 mL × 1 |
| 7) Alcohol Solution | 30 mL × 1 |
| 8) PEG Solution | 20 mL × 1 |

[Materials needed]

Reagents :

- 1) 70% Ethanol (Ethanol : Code No. 054-07225)
- 2) Deionized distilled water (DDW) : Code No. 316-90101
- 3) TE buffer (pH 8.0) : Code No. 314-90021

Equipments :

- 1) Microcentrifuge tubes (2 mL)
- 2) Microcentrifuge tubes (1.5 mL)
- 3) Homogenizer (Teflon homogenizer etc.)
- 4) High speed refrigerated microcentrifuge
- 5) Vortex mixer
- 6) Incubator (37 °C)
- 7) Micropipette

[Storage]

Store at 2~10 °C.

[Package size]

50 reactions

[Method]

The protocol contains vigorous mixing steps by a vortex mixer in order to finish the incubation and extraction steps quickly and inhibit the oxidation of DNA. If extraction of intact and long genomic DNA is desired, the mixing steps with the vortex mixer should be done more gently.

When DNA obtained by using Protocol 1 contains too much RNA, or sodium iodide, it is possible to get purer DNA using Protocol 2.

[Protocol 1]

- (1) Cut up the appropriate amount of tissue into small pieces and add 1 mL of Lysis Solution. Homogenize it in an ice water bath.

The following table shows the maximum amount of tissue that can be treated. Do not exceed this amount.

Tissue	Yield of DNA (mg/100 mg of tissue)	Maximum amount of the tissue that can be treated.	Predicted yield of DNA
spleen	1-1.5 mg	30 mg	300-450 μg
kidney	400-500 μg	100 mg	400-500 μg
lung	400-500 μg	100 mg	400-500 μg
pancreas	400-500 μg	100 mg	400-500 μg
small intestine	300-400 μg	100 mg	300-400 μg
liver	250-300 μg	150 mg	approx. 400 μg
stomach	250-300 μg	150 mg	approx. 400 μg
testis	approx. 200 μg	150 mg	approx. 300 μg
brain	100-150 μg	180 mg	200-300 μg
heart	approx. 100 μg	200 mg	approx. 200 μg

The amount is based on the data for mouse tissue.

The maximum amount of the tissue which can be treated is 150~200 mg, and the maximum amount of DNA is 400~500 μg. It becomes difficult to purify DNA when the amount of the tissue or DNA exceeds the maximum. We recommend the use the smallest amount of tissue in order to get good results when a large amount of DNA is not required.

- (2) Transfer the homogenate to a 2 mL microcentrifuge tube and centrifuge at $600 \times G$ for 10 minutes at 4°C .

Centrifuge at $5,000 \times G$ for 10 minutes at 4°C when the sample is brain tissue.
(The condition of the centrifugation at Step 5 is $600 \times G$. This is the same as protocol.)

- (3) Decant and remove the supernatant from the tube then invert and place on paper towels to remove any excess liquid.
(4) Add 1 mL of Lysis Solution to the pellet and vortex to detach and pull the pellet apart.
(5) Centrifuge at $600 \times G$ for 10 minutes at 4°C .
(6) Repeat Step 3~5.
(7) Decant and remove the supernatant from the tube then invert and place on paper towels to remove any excess liquid.
(8) Add $300 \mu\text{L}$ of Enzyme Reaction Solution, $1 \mu\text{L}$ of RNase Solution and $3 \mu\text{L}$ of Oxidation Inhibitor to the pellet, and vortex to detach and pull the pellet apart.
(9) Incubate at 37°C for 10 minutes.
(10) Add $15 \mu\text{L}$ of Protein Digestion Solution and vortex to detach and pull the pellet apart.
(11) Incubate at 37°C for 1 hour vortexing vigorously about every 20 minutes.

Frequent vortexing is more effective.

When the tissue has not dissolved completely, extend the incubation by 1 hour, and vortex occasionally in order to dissolve more quickly. We recommend vortexing frequently to dissolve the tissue quickly, because a long incubation time progresses the oxidation of DNA.

- (12) Centrifuge at $10,000 \times G$ for 5 minutes at room temperature after the tissue has been dissolved completely.
(13) Transfer the supernatant to a 1.5 mL microcentrifuge tube using a micropipette.

Be careful not to take up the pellet.

The insoluble pellet is visible on the side which is subject to centrifugal force in the case of angle centrifugation. The pellet can be avoided by taking up the supernatant with a micropipette from the other side.

- (14) Add $300 \mu\text{L}$ of Sodium Iodide Solution to the supernatant, mix, and flash centrifuge briefly. After that, add $600 \mu\text{L}$ of Alcohol Solution and vortex.
(15) Centrifuge at $10,000 \times G$ for 10 minutes at room temperature.
(16) Remove the supernatant from the tube then invert and place on paper towels for approx. 1 minute.
Be careful not to drop the pellet while removing the supernatant.

A very slight amount of sodium iodide may remain in the DNA sample, and the DNA sample may show an UV (230 nm) absorption. The UV absorption of sodium iodide can be decreased by removing the supernatant carefully. Removing the sodium iodide solution which remains on the inner wall of the tube with tissue paper is more effective.

- (17) Add 1 mL of 70% Ethanol to the pellet and vortex to detach the pellet from the tube.
(18) Centrifuge at $10,000 \times G$ for 5 minutes at room temperature.
(19) Repeat Step 16~18.
(20) Remove the supernatant from the tube then invert and place on paper towels for approx. 5 minutes.
Be careful not to drop the pellet while removing the supernatant.
(21) Press the tube to paper towels in order to remove as much of the supernatant as possible, and leave the tube for approx. 10 minutes with the cap of the tube opened.
Proceed to the next step while the pellet is still wet, because it is difficult to dissolve the pellet which is completely dry.
(22) Add the appropriate amount of DDW or TE buffer, and vortex to detach the pellet from the tube.

The amount of DNA obtained varies between organs. Adjust the amount of DDW or TE buffer to prepare the appropriate concentration of DNA by referencing the table in Step 1. When assaying 8-OHdG using 「High Sensitive 8-OHdG Check (Code No.307-07921)」, $1.5 \sim 1.8 \text{ mg/mL}$ is a benchmark.

- (23) Incubate at 37°C with occasionally vortexing to dissolve the pellet completely.

It may take longer to dissolve genomic DNA evenly. DNA may be dissolved by leaving it in the refrigerator over night, or with vigorous vortexing at high temperatures ($50^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$). Check the uniformity of the solution by visually checking whether the pellet (DNA) has been dissolved completely.

- (24) Measure the absorbance of OD 260 nm, and calculate the concentration of DNA.

The sample DNA should be stored at -80°C because the DNA will continue to oxidize.

DNA obtained from spleen tissue may be brown in color. In the case of 8-OHdG assay, the color is removed from the DNA solution at the step of the centrifugal ultrafiltration after the treatment reaction with nuclease P_1 and does not have an effect on 8-OHdG assay.

【Protocol 2】

- (1) Cut up the appropriate amount of tissue into small pieces and add 1 mL of Lysis Solution. Homogenize it in an ice water bath.

The table in Step 1 of Protocol 1 shows the maximum amount of tissue that can be treated. Do not exceed this amount.

The maximum amount of the tissue which can be treated is 150~200 mg, and the maximum amount of DNA is 400~500 μg . It becomes difficult to purify DNA when the amount of the tissue or DNA exceeds the maximum. We recommend the use of the smallest amount of tissue in order to get good results when a large amount of DNA is not required.

- (2) Transfer the homogenate to a 2 mL microcentrifuge tube and centrifuge at $600 \times G$ for 10 minutes at 4°C .

Centrifuge at $5,000 \times G$ for 10 minutes at 4°C when the sample is brain tissue.
(The condition of the centrifugation at Step 5 is $600 \times G$. This is the same as protocol.)

- (3) Decant and remove the supernatant from the tube then invert and place on paper towels.
- (4) Add 1 mL of Lysis Solution to the pellet and vortex to detach and pull the pellet apart.
- (5) Centrifuge at $600 \times G$ for 10 minutes at 4°C .
- (6) Repeat Step 3~5.
- (7) Decant and remove the supernatant from the tube then invert and place on paper towels.
- (8) Add 300 μL of Enzyme Reaction Solution, 15 μL of Protein Digestion Solution and 3 μL of Oxidation Inhibitor to the pellet, and vortex to detach and pull the pellet apart.
- (9) Incubate at 37°C for 1 hour vortexing vigorously about every 20 minutes.

Frequent vortexing is more effective.

When the tissue has not dissolved completely, extend the incubation by 1 hour, and vortex occasionally in order to dissolve more quickly. We recommend vortexing frequently to dissolve the tissue quickly, because a long incubation time progresses the oxidation of DNA.

- (10) Centrifuge at $10,000 \times G$ for 5 minutes at room temperature after the tissue has been completely dissolved.
- (11) Transfer the supernatant to a 1.5 mL microcentrifuge tube using a micropipette.
Be careful not to take up the pellet.

The insoluble pellet is visible on the side which is subject to centrifugal force in the case of angle centrifugation. The pellet can be avoided by taking up the supernatant with a micropipette from the other side.

- (12) Add 300 μL of Sodium Iodide Solution to the supernatant, mix, and flash centrifuge briefly. After that, add 600 μL of Alcohol Solution and vortex.
- (13) Centrifuge at $10,000 \times G$ for 10 minutes at room temperature.
- (14) Remove the supernatant from the tube then invert and place on paper towels for approx. 1 minute.
Be careful not to drop the pellet while removing the supernatant.

A very slight amount of sodium iodide may remain in the DNA sample, and the DNA sample may show an UV (230 nm) absorption. The UV absorption of sodium iodide can be decreased by removing the supernatant carefully. Removing the sodium iodide solution which remains on the inner wall of the tube with tissue paper is more effective.

- (15) Add 1 mL of 70% Ethanol to the pellet and vortex to detach the pellet from the tube.
- (16) Centrifuge at $10,000 \times G$ for 5 minutes at room temperature.
- (17) Repeat Step 14~16.
- (18) Remove the supernatant from the tube then invert and place on paper towels for approx. 5 minutes.
Be careful not to drop the pellet while removing the supernatant.
- (19) Press the tube to paper towels in order to remove as much of the supernatant as possible.
- (20) Add 400 μL of TE buffer(pH 8.0), 1 μL of RNase Solution and 4 μL of Oxidation Inhibitor, and vortex to detach the pellet from the tube.
- (21) Incubate at 37°C for 30 minutes vigorously vortexing every 10 minutes.

It is necessary to dissolve the pellet completely in order to finish the treatment of RNase. If the pellet is not dissolved completely after the incubation for 30 minutes, extend the incubation time by 5-10 minutes from when the pellet has been dissolved in the buffer uniformly.

- (22) After flash centrifuge, add 400 μL of PEG Solution and vortex.
- (23) Centrifuge at $10,000 \times G$ for 10 minutes at 4°C .
- (24) Remove the supernatant from the tube then invert and place on paper towels.
Be careful not to drop the pellet while removing the supernatant. Proceed to the next step even if some of the supernatant remains.
- (25) Add 1 mL of 70% Ethanol to the pellet and vortex to detach the pellet from the tube.
- (26) Centrifuge at $10,000 \times G$ for 5 minutes at 4°C .

- (27) Remove the supernatant from the tube then invert and place on paper towels for approx. 5 minutes.
Be careful not to drop the pellet while removing the supernatant.
- (28) Press the tube to paper towels in order to remove as much of the supernatant as possible, and leave the tube for approx. 10 minutes with the cap of the tube opened.
Proceed to the next step while the pellet is still wet because it is difficult to dissolve the pellet which is completely dry.
- (29) Add the appropriate amount of DDW or TE buffer, and vortex to detach the pellet from the tube.

The amount of DNA obtained varies between organs. Adjust the amount of DDW or TE buffer to prepare the appropriate concentration of DNA by referencing the table in Step 1 of Protocol 1. When assaying 8-OHdG using High Sensitive 8-OHdG Check (Code No.307-07921), 1.5~1.8 mg/mL is a benchmark.

- (30) Incubate at 37 °C occasionally vortexing to dissolve the pellet completely.

It may take longer to dissolve genomic DNA evenly. DNA may be dissolved by leaving it in the refrigerator over night, or with vigorous vortexing at high temperatures (50 °C~60 °C). Check the uniformity of the solution by visually checking whether the pellet (DNA) has been dissolved completely.

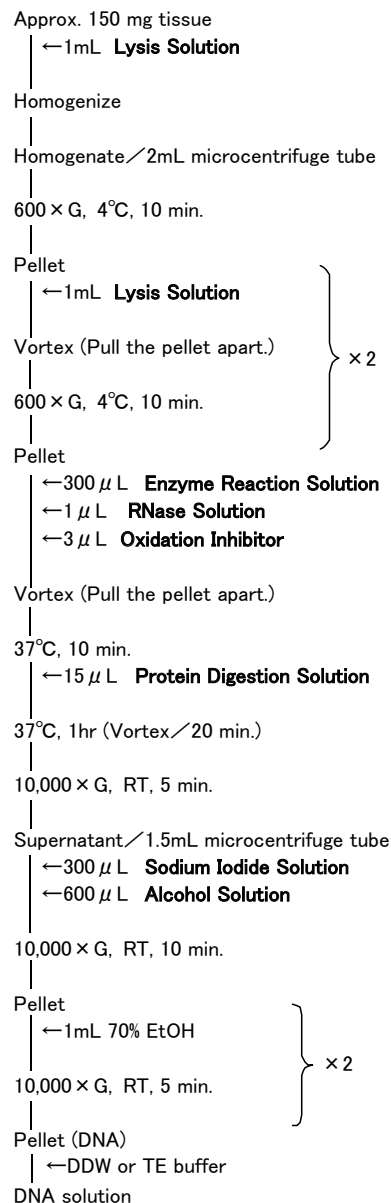
- (31) Measure the absorbance of OD260nm, and calculate the concentration of DNA.

The sample DNA should be stored at - 80 °C because the DNA will continue to oxidize.

DNA obtained from spleen tissue may be brown in color. In the case of 8-OHdG assay, the color is removed from the DNA solution at the step of the centrifugal ultrafiltration after the treatment reaction with nuclease P₁ and does not have an effect on 8-OHdG assay.

Flow chart

【Protocol 1】



【Protocol 2】

Approx. 150 mg tissue
←1mL **Lysis Solution**
Homogenize
Homogenate / 2mL microcentrifuge tube
600 × G, 4°C, 10 min.
Pellet
←1mL **Lysis Solution**
Vortex (Pull the pellet apart) } × 2
600 × G, 4°C, 10 min.
Pellet
←300 μL **Enzyme Reaction Solution**
←15 μL **Protein Digestion Solution**
←3 μL **Oxidation Inhibitor**
Vortex (Pull the pellet apart.)
37°C, 1hr (Vortex / 20 min.)
10,000 × G, RT, 5 min.
Supernatant / 1.5mL microcentrifuge tube
←300 μL **Sodium Iodide Solution**
←600 μL **Alcohol Solution**
10,000 × G, RT, 10 min.
Pellet
←1mL 70% EtOH } × 2
10,000 × G, RT, 5 min.
Pellet (Nucleic acid)
←400 μL TE buffer
←1 μL **RNase Solution**
←4 μL **Oxidation Inhibitor**
37°C, 30 min. (Vortex / 10 min.)
←400 μL **PEG Solution**
10,000 × G, 4°C, 10 min.
Pellet
←1mL 70% EtOH
10,000 × G, 4°C, 5 min.
Pellet (DNA)
←DDW or TE buffer
DNA solution

Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

Wako Chemicals USA, Inc.

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

Wako Chemicals GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-311-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

遺伝子研究用

DNA エキストラクター® TIS キット

〔はじめに〕

DNAエキストラクター® TISキットは、主にヒトや動物の柔組織を対象としたDNA抽出キットです。本キットは、従来の弊社エキストラクターシリーズ同様よう化ナトリウム法を基本原理としているため、劇物であるフェノール/クロロホルムを使用することなく一連の抽出操作を行うことができます。また、よう化ナトリウム法は操作中の酸化が比較的少ないDNA抽出法として知られていますが、酸化抑制剤を加えたことによってさらにDNA酸化が抑制され、酸化ストレスマーカーである8-OHdG (8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン) の測定に有用なDNA抽出キットです。

〔特 長〕

- 1) 酸化ストレスマーカーの検出・測定に有用です。
- 2) 操作中のDNA酸化が少ないよう化ナトリウム法を採用しています。
- 3) 酸化抑制剤を使ってより一層DNAの酸化が抑制されています。
- 4) ヒト、動物の柔組織からのDNA抽出に最適です。

〔キット内容〕

1) 溶解液	75 mL × 2本
2) 酵素反応液	15 mL × 1本
3) RNA分解酵素液	50 μL × 1本
4) タンパク分解酵素液	750 μL × 1本
5) 酸化抑制剤	350 μL × 1本
6) よう化ナトリウム溶液	15 mL × 1本
7) アルコール液	30 mL × 1本
8) PEG溶液	20 mL × 1本

〔キット以外に使用する物〕

試薬：

- 1) 70%エタノール (エタノール：Code No. 054-07225)
- 2) 滅菌蒸留水(DDW)：Code No. 316-90101
- 3) TEバッファー (pH 8.0)：Code No. 314-90021

器具：

- 1) 2 mL容マイクロ遠心分離チューブ
- 2) 1.5 mL容マイクロ遠心分離チューブ
- 3) ホモジナイザー (テフロンホモジナイザー等)
- 4) 冷却式微量高速遠心機
- 5) ボルテックスミキサー
- 6) インキュベーター (37℃)
- 7) マイクロピペット

〔保存条件〕

冷蔵保存 (2～10℃)

〔包 装〕

50回用

〔操作方法〕

下記【使用法】は、インキュベーションや抽出操作を早く終え、DNAの酸化を抑制するため、ボルテックスミキサーを使った激しい混合操作を多用しております。ゲノムDNAをインタクトな高分子状態で抽出したい場合は、ボルテックスミキサーを使った混合操作を緩やかに加減して下さい。

【使用法1】では、RNAが多く残る、或いは、よう化ナトリウムが多く残る、などの問題が生じた場合、【使用法2】にて、DNAの精製度を上げることができます。

【使用法1】

- (1) ハサミ等で細かく刻んだ組織片に、溶解液を1 mL添加して、氷水等で冷やしながらかき混ぜます (組織は下記表の最大重量の範囲内で対応して下さい)。

組織種	組織100 mg当りのDNA収量	処理可能な最大組織重量	予想されるDNA取得量
脾臓	1～1.5 mg	30 mg	300～450 μg
腎臓	400～500 μg	100 mg	400～500 μg
肺	400～500 μg	100 mg	400～500 μg
脾臓	400～500 μg	100 mg	400～500 μg
小腸	300～400 μg	100 mg	300～400 μg
肝臓	250～300 μg	150 mg	約400 μg
胃	250～300 μg	150 mg	約400 μg
精巣	約200 μg	150 mg	約300 μg
脳	100～150 μg	180 mg	200～300 μg
心臓	約100 μg	200 mg	約200 μg

(マウス組織を用いた実績に基づいています)

適用可能な組織量は最大で150 mg～200 mg、DNA量は400～500 μg程度となりますが、そのどちらかを超過するとDNA精製が困難になります。それほど多くのDNAを必要としない場合、組織量を少なめにすると良好な結果が得られます。

- (2) ホモジネートを2 mL容マイクロ遠心分離チューブに移し、 $600 \times G$ 、10分間、 $4^\circ C$ で遠心分離します。

脳を材料とする場合は、ステップ2の遠心条件だけ $5,000 \times G$ 、10分間、 $4^\circ C$ にしてください(ステップ5は $600 \times G$: 使用法通り)。

- (3) デカンテーションで上清を捨て、ペーパータオル等にチューブを逆さにして押しつけて、残液を拭き取ります。
- (4) 沈殿に、溶解液を1 mL添加して、ボルテックスミキサーで混合します(沈殿がバラバラになって舞い上がるようにしてください)。
- (5) $600 \times G$ 、10分間、 $4^\circ C$ で遠心分離します。
- (6) ステップ(3)~(5)を繰り返します。
- (7) 上清を捨て、ペーパータオル等にチューブを逆さにして押しつけて、残液を拭き取ります。
- (8) 沈殿に、酵素反応液 $300 \mu L$ 、RNA分解酵素液 $1 \mu L$ 、酸化抑制剤 $3 \mu L$ を添加し、ボルテックスミキサーで混合します(沈殿がバラバラになって舞い上がるようにしてください)。
- (9) $37^\circ C$ で10分間インキュベーションします。
- (10) タンパク分解酵素液を $15 \mu L$ 添加し、ボルテックスミキサーで混合します(沈殿が舞い上がるように激しく混合して下さい)。
- (11) $37^\circ C$ で1時間インキュベーションします(約20分ごとに激しくボルテックスミキサーで混合して下さい。こまめにボルテックスするとより効果的です)。

組織の溶解が不完全な場合は、インキュベーションを1時間程度延長し、早めに溶解が完了するように、時々ボルテックスミキサーで混合して下さい。加温が長時間になるとDNAの酸化が進むため、早く溶解するようにボルテックスをこまめに行うことをお勧めします。

- (12) 組織の溶解が確認できたらインキュベーションを止め、 $10,000 \times G$ 、5分間、室温で遠心分離します。
- (13) マイクロピペットで上清を1.5 mL容マイクロ遠心分離チューブに移します(沈殿を吸い取らないように注意して下さい)。

アングル遠心の場合、チューブの背側(遠心力方向)に不溶性の沈殿が認められます。腹側にピペットチップの先をあてて上清を吸い取ると沈殿を避け易くなります。

- (14) 上清に、よう化ナトリウム溶液を $300 \mu L$ 添加し混合した後、軽くフラッシュ遠心し、次にアルコール液を $600 \mu L$ 添加して、ボルテックスミキサーで混合します。
- (15) $10,000 \times G$ 、10分間、室温で遠心分離します。

- (16) 上清を捨て、ペーパータオル等にチューブを逆さにして立て、約1分間放置します(上清を捨てる時、沈殿を落とさないように気をつけて下さい)。

本法では、DNA試料中による化ナトリウムが極僅かに残り、紫外線吸収(230 nm 付近)を示すことがあります。この上清の除去を丁寧に行うことにより、よう化ナトリウムによる紫外線吸収を低減することができます。場合によっては、チューブ内壁に残るよう化ナトリウム液をティッシュ等で拭き取るより効果的です。

- (17) 沈殿に、70%エタノールを1 mL添加し、ボルテックスして沈殿を舞い上がらせて下さい。
- (18) $10,000 \times G$ 、5分間、室温で遠心分離します。
- (19) ステップ(16)~(18)を繰り返します。
- (20) 上清を捨て、ペーパータオル等にチューブを逆さにして立て、約5分間放置します(上清を捨てる時、沈殿を落とさないように気をつけて下さい)。
- (21) ペーパータオルに押しつける等して、残液を十分に拭き取り、チューブの口を開けたまま室温で約10分間放置します(完全に乾かすと沈殿を溶解させづらくなりますので、ウェットな状態で次のステップに進んで下さい)。
- (22) 適量のDDWまたはTEバッファーを添加し、ボルテックスして、なるべく沈殿を舞い上がらせて下さい。

臓器種の違い等によってDNA取得量が大きく異なります。ステップ1の表を参考にして、適度なDNA濃度に調製できるようにDDWまたはTEバッファーの添加量は適宜対応して下さい。「高感度8-OHdGチェック (Code No.307-07921)」にて8-OHdGの測定を行う場合は、DNA濃度 $1.5 \sim 1.8 \text{ mg/mL}$ 程度が目安となります。

- (23) $37^\circ C$ でインキュベーションして、沈殿を完全に溶解させます(時々ボルテックスをして下さい)。

ゲノムDNAを均一に溶かすには時間を要する場合があります。場合によっては、冷蔵庫で終夜放置して溶かす、或いは $50^\circ C \sim 60^\circ C$ 程度の高温でボルテックスを激しく行い早く溶けるようにする方法もあります。沈殿(DNA)の完全な溶解は、溶液を透かして見ることにより、均一性を確認して判断して下さい。

- (24) 吸光度OD 260 nmを測定し、DNA濃度を算出します。

日毎にDNAの酸化が進むので、試料は $-80^\circ C$ に保存することをお勧めします。

脾臓から得られるDNA溶液は、茶色を呈していることがあります。8-OHdGの測定時には、スクレアーゼ処理等の後、限外濾過の工程で着色は除かれますので、8-OHdGの測定には影響を与えません。そのまま、スクレアーゼ処理工程にお進み下さい。

【使用法2】

- (1) ハサミで細かく刻んだ組織片に、溶解液を1 mL添加して、氷水等で冷やしながらかき混ぜます（組織は使用法1に記載した表の最大重量の範囲内で対応して下さい）。

適用可能な組織量は最大で150 mg~200 mg、DNA量は400~500 µg程度となりますが、そのどちらかを超過するとDNA精製が困難になります。それほど多くのDNAを必要としない場合、組織量を少なめにすると良好な結果が得られます。

- (2) ホモジネートを2 mL容マイクロ遠心分離チューブに移し、600×G、10分間、4℃で遠心分離します。

脳を材料とする場合は、ステップ2の遠心条件だけ5,000×G、10分間、4℃にして下さい（ステップ5は600×G：使用法通り）。

- (3) デカンテーションで上清を捨て、ペーパータオル等にチューブを逆さにして押しつけて、残液を拭き取ります。
- (4) 沈殿に、溶解液を1 mL添加して、ボルテックスミキサーで混合します（沈殿がバラバラになって舞い上がるようにして下さい）。
- (5) 600×G、10分間、4℃で遠心分離します。
- (6) ステップ(3)~(5)を繰り返します。
- (7) 上清を捨て、ペーパータオル等にチューブを逆さにして押しつけて、残液を拭き取ります。
- (8) 沈殿に、酵素反応液300 µL、タンパク分解酵素液15 µL、酸化抑制剤3 µLを添加し、ボルテックスミキサーで混合します（沈殿がバラバラになって舞い上がるようにして下さい）。
- (9) 37℃で1時間インキュベーションします（約20分ごとに激しくボルテックスミキサーで混合して下さい。こまめにボルテックスするとより効果的です）。

組織の溶解が不完全な場合は、インキュベーションを1時間程度延長し、早めに溶解が完了するように、時々ボルテックスミキサーで混合して下さい。加温が長時間になるとDNAの酸化が進むため、早く溶解するようにボルテックスをこまめに行うことをお勧めします。

- (10) 組織の溶解が確認できたらインキュベーションを止め、10,000×G、5分間、室温で遠心分離します。
- (11) マイクロピペットで上清を1.5 mL容マイクロ遠心分離チューブに移します（沈殿を吸い取らないように注意して下さい）。

アングル遠心の場合、チューブの背側（遠心力方向）に不溶性の沈殿が認められます。腹側にピペットチップの先をあて上清を吸い取ると沈殿を避けやすくなります。

- (12) 上清に、よう化ナトリウム液を300 µL添加し混合した後、軽くフラッシュ遠心し、次にアルコール液を600 µL添加して、ボルテックスミキサーで混合します。
- (13) 10,000×G、10分間、室温で遠心分離します。
- (14) 上清を捨て、ペーパータオル等にチューブを逆さにして立てて、約1分間放置します（上清を捨てる時、沈殿を落とさないように気をつけて下さい）。

本法では、DNA試料中による化ナトリウムが極僅かに残り、紫外線吸収（230 nm付近）を示すことがあります。この上清の除去を丁寧に行うことにより、よう化ナトリウムによる紫外線吸収を低減することができます。場合によっては、チューブ内壁に残るよう化ナトリウム液をティッシュ等で拭き取りより効果的です。

- (15) 沈殿に、70%エタノールを1 mL添加し、ボルテックスして沈殿を舞い上がらせて下さい。
- (16) 10,000×G、5分間、室温で遠心分離します。
- (17) ステップ(14)~(16)を繰り返します。
- (18) 上清を捨て、ペーパータオル等にチューブを逆さにして立てて、約5分間放置します（上清を捨てる時、沈殿を落とさないように気をつけて下さい）。
- (19) ペーパータオルに押しつける等して、残液を十分に拭き取ります。
- (20) TE バッファー（pH 8.0）400 µL、RNA分解酵素液1 µL、酸化抑制剤4 µLを添加し、ボルテックスミキサーで混合します（なるべく沈殿が舞い上がるようにして下さい）。
- (21) 37℃で30分間インキュベーションします（約10分ごとに激しくボルテックスミキサーで混合して下さい）。

RNase処理が完了するためには、核酸沈殿が完全に溶解する必要があります。約10分ごとにボルテックスして完全に溶解するようにしますが、30分間インキュベーション終了時点で沈殿が完全に溶解していない場合は、インキュベーション時間を延長して下さい。その目安は、核酸沈殿がバッファー中に均一に溶解してから、5~10分間としています。

- (22) フラッシュ遠心をした後、PEG溶液を400 µL添加し、ボルテックスミキサーで混合します。
- (23) 10,000×G、10分間、4℃で遠心分離します。
- (24) 上清を捨て、ペーパータオル等にチューブを逆さにして立てて下さい（上清を捨てる時、沈殿を落とさないように気をつけて下さい。多少溶液が残っても先に進んで下さい）。
- (25) 沈殿に、70%エタノールを1 mL添加し、ボルテックスして沈殿を舞い上がらせて下さい。
- (26) 10,000×G、5分間、4℃で遠心分離します。

- (27) 上清を捨て、ペーパータオル等にチューブを逆さにして立て、約5分間放置します（上清を捨てる時、沈殿を落とさないように気をつけて下さい）。
- (28) ペーパータオルに押しつける等して、残液を十分に拭い取り、チューブの口を開けたまま室温で約10分間放置します（完全に乾かすと沈殿を溶解させづらくなりますので、ウェットな状態で次のステップに進んで下さい）。
- (29) 適量のDDWまたはTEバッファーを添加し、ボルテックスして、なるべく沈殿を舞い上がらせて下さい。

臓器種の違いなどによってDNA取得量が大きく異なります。使用方法1ステップ1の表を参考にして、適度なDNA濃度に調製できるようにDDWまたはTEバッファーの添加量は適宜対応して下さい。「高感度8-OHdGチェック (Code No.307-07921)」にて8-OHdGの測定を行う場合は、DNA濃度1.5～1.8 mg/mL程度が目安となります。

- (30) 37℃でインキュベーションして、沈殿を完全に溶解させます（時々ボルテックスをして下さい）。

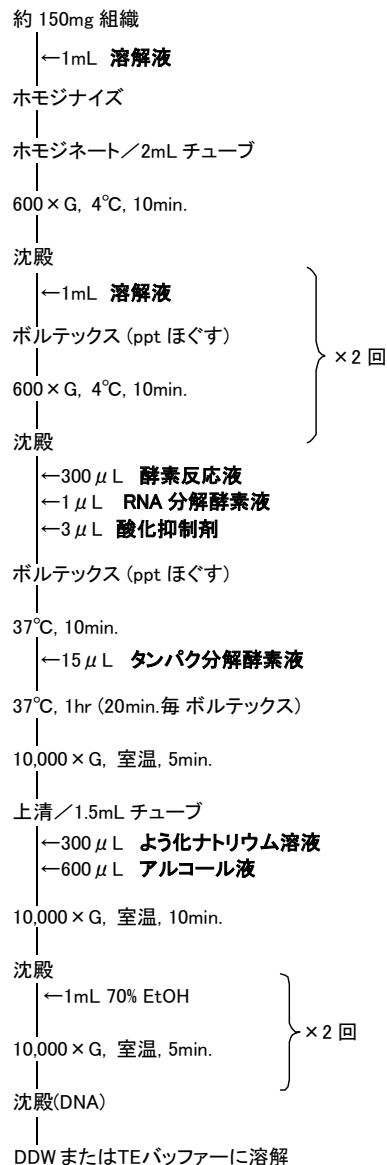
ゲノムDNAを均一に溶かすには時間を要する場合があります。場合によっては、冷蔵庫で終夜放置して溶かす、或いは50℃～60℃程度の高温でボルテックスを激しく行い早く溶けるようにする方法もあります。沈殿（DNA）の完全な溶解は、溶液を透かして見ることにより、均一性を確認して判断して下さい。

- (31) 吸光度OD 260 nmを測定し、DNA濃度を算出します。

日毎にDNAの酸化が進むので、試料は-80℃に保存することをお勧めします。

脾臓から得られるDNA溶液は、茶色を呈していることがあります。8-OHdGの測定時には、スクレアーゼ処理等の後、限外濾過の工程で着色は除かれますので、8-OHdGの測定には影響を与えません。そのまま、スクレアーゼ処理工程にお進み下さい。

【使用法1プロトコール】



【使用法 2 プロトコール】

約 150mg 組織
| ←1mL **溶解液**
ホモジナイズ
|
ホモジネート / 2mL チューブ
|
600 × G, 4°C, 10min.
|
沈殿
| ←1mL **溶解液**
ボルテックス (ppt ほぐす)
|
600 × G, 4°C, 10min.
|
沈殿
| ←300 μL **酵素反応液**
| ←15 μL **タンパク分解酵素液**
| ←3 μL **酸化抑制剤**
ボルテックス (ppt ほぐす)
|
37°C, 1hr (20min. 毎 ボルテックス)
|
10,000 × G, 室温, 5min.
|
上清 / 1.5mL チューブ
| ←300 μL **よう化ナトリウム溶液**
| ←600 μL **アルコール液**
10,000 × G, 室温, 10min.
|
沈殿
| ←1mL 70% EtOH
10,000 × G, 室温, 5min.
|
沈殿 (核酸)
| ←400 μL TE バッファー
| ←1 μL **RNA 分解酵素液**
| ←4 μL **酸化抑制剤**
37°C, 30min. (10min. 毎に ボルテックス)
| ←400 μL **PEG 溶液**
10,000 × G, 4°C, 10min.
|
沈殿
| ←1mL 70% EtOH
10,000 × G, 4°C, 5min.
|
沈殿 (DNA)
|
DDW または TE バッファーに溶解

} × 2 回

} × 2 回

製造発売元

和光純薬工業株式会社

大阪市中央区道修町 3 - 1 - 2
電話 (06) 6203 - 3741 (代表)

0808K01