

# ISOGENOME

Code No. 314-08113 (100 ml)

マニュアル (第3版) 1501HT-2305

## I 製品説明

ISOGENOME (アイトゲノム) は、組織や細胞からゲノム DNA を抽出するための試薬です。本品は、グアニジンや界面活性剤を含む溶液であり、RNA を加水分解することにより DNA を選択的に回収することができます。また、簡単な操作で DNA を抽出できるため、スケールアップや多検体処理にも対応できます。さらに RNA 抽出用試薬 ISOGEN II (Code No. 311-07361) と組み合わせることで、同一サンプルから RNA と DNA を抽出することができます。試料に ISOGENOME を加えて溶解またはホモジナイズした後、エタノール沈殿、エタノール洗浄、溶解することで、短時間でゲノム DNA が抽出できます。

### ■ 特長

- 約 30 分間でゲノム DNA を抽出
- 新鮮な組織からのゲノム回収率 70%以上
- ISOGEN II との併用で RNA と DNA が抽出可能
- フェノールを含まず、操作中にも使用しない
- 得られた DNA は様々なアプリケーションにそのまま使用可能<サザンブロットリング、ドットプロットハイブリダイゼーション、クローニング、PCR など>

## II 製品内容

Code No. 314-08113

- ISOGENOME 100 ml
- マニュアル 1 部

## III 保存

### 室温保存

- 低温で長時間保存した場合、まれに塩が析出する場合がありますが、品質・性能に問題はありません。このような場合には容器ごと 55~65℃で 30~60 分間程、インキュベートと適時混合して、析出物を完全に溶解させてからご使用下さい。

## 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。また、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。
- ISOGENOME には刺激物が含まれています。皮膚との接触を避けるため取扱いに注意し、ご使用の際には適切な保護具 (手袋、眼鏡等) を着用して下さい。
- 本品の取り扱いには、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。
- 安全性データシート (SDS) につきましては、ニッポンジーン WEB ページ ([www.nippongene.com](http://www.nippongene.com)) よりご覧になれます。

## V プロトコール

### ■ 本品以外に必要な試薬

- エタノール (99.5%)、75%エタノール
- 8 mM NaOH (用時調製)<sup>\*1</sup>
- 1M HEPES (pH 調整用)

### ■ 使用するチューブについて

- 本プロトコールは、1 ml の ISOGENOME と 0.5 ml のエタノールを添加する方法が記載されており、その場合は 2.0 ml 容量のチューブを必要とします。
- 1.5 ml 容量のチューブを使用する場合は、プロトコールを 0.8 倍にスケールダウンして行って下さい。

### ■ 操作方法について

- 全ての操作は室温で行えますが、遠心は 4~25℃で行ってください。
- 高分子のゲノム DNA は切断されやすいので、混合の際に激しい振盪やボルテックスは避けて、できるだけ穏やかに且つ十分に行ってください。

\*1 8 mM NaOH は、調製後 1ヶ月以内のものを使用します。調製時は、開封後 6ヶ月未満の 2~4 M NaOH の原液から 8 mM NaOH を調製して下さい。

## プロトコール A: ゲノム DNA の単離

### Step 1. 試料の溶解 (ホモジナイゼーション)

- ① 組織 25~50 mg、培養細胞 (10 cm<sup>2</sup>) または ~1 × 10<sup>7</sup> 細胞 (容量 < 0.1 ml) に対して、1 ml の ISOGENOME を添加する。

< 1 ml の ISOGENOME に対するサンプル量の目安 >

サンプルの種類		サンプル量	ISOGENOME 添加量	溶解方法
組織	肝臓、腎臓、肺、心臓、骨格筋など	25~50 mg	1 ml	a)
	脾臓、脳 (軟組織)	5~10 mg		
細胞	接着細胞	10 cm <sup>2</sup>	1 ml	b)
	細胞沈殿	1 × 10 <sup>7</sup> 細胞 (< 0.1 ml)		
	浮遊細胞	0.1 ml		

- ② 試料と ISOGENOME が均一になるよう、穏やかに且つ十分に溶解する。
  - a) 組織の場合、隙間に余裕があるガラス・テフロンホモジナイザー (間隙精度: 0.1~0.15 mm 以上) を用いて手動で 5~10 ストローク (上下) して組織を完全にホモジナイゼーションする。  
少量の軟組織の場合、マイクロピペットで繰り返しピペッティングすることで組織を分散および溶解する。
  - b) 接着細胞の場合、ディッシュから培地を取り除いた後、10 cm<sup>2</sup>あたり (3.5 cm ディッシュに相当) 1 ml の ISOGENOME を直接加えてマイクロピペットで数回ピペッティングして溶解する。
  - c) 浮遊細胞 (細胞沈殿または細胞懸濁液) の場合、遠心して培地を取り除いた後、1 × 10<sup>7</sup> 細胞 (容量 < 0.1 ml) あたり 1 ml の ISOGENOME を加え、ピペッティングを繰り返して細胞を溶解する。
- ③ a) の組織および軟組織や夾雑物の多い試料の場合は、ホモジナイズしたサンプル (ホモジネート) を室温で 5~10 分間静置する。(DNA の可溶性)

### Step 2. 遠心分離による不溶物の除去 (オプション)<sup>\*2</sup>

- ① a) 組織の場合、ホモジネートを一度遠心 (10,000 × g, 10 分間) し、不溶物を沈殿させる。
- ② 上清を新しいチューブに移す。

### Step 3. DNA の沈殿

- ① サンプルに添加した ISOGENOME の 0.5 倍量のエタノール (99.5%) を添加する。(例: 1 ml の ISOGENOME に対して 0.5 ml のエタノール)
- ② ホモジネートとエタノールが均一な溶液になるよう転倒混和を行う。(目安: 5~8 回)
- ③ 1~3 分間、静置する。
- ④ 静置後、析出した繊維状のゲノム DNA をチップの先で混ぜるようにすくい取り、新しいチューブに移す。<sup>\*3</sup>

### Step 4. DNA の洗浄

- ① DNA の入ったチューブに 1 ml の 75%エタノールを添加する。
- ② 転倒混和 (目安: 3~6 回) で DNA を洗浄。
- ③ チューブを立てた状態で 30 秒~1 分間静置して DNA を沈殿させ、静かにピペットまたはデカンテーションによってエタノールを除去する。(沈殿が浮いてしまう場合は、遠心 (1,000 × g, 1~2 分間) して DNA を沈殿させた後、エタノールを除去する。)
- ④ もう一度 75%エタノールによる洗浄 (①~③) を繰り返す。

### Step 5. DNA の溶解

- ① ピペットでチューブの底に残っているエタノールをできる限り除去する。<sup>\*4</sup>
- ② 8 mM NaOH または ddH<sub>2</sub>O で DNA を溶解する。<sup>\*5</sup>
- ③ 肝臓や筋肉などの組織から単離した DNA 溶液は多糖類などの不溶物を含む場合がある。その場合は、遠心 (12,000 × g, 10 分間) によって不溶物を除去する。<sup>\*6</sup>

\*2 このオプション操作を行うことで、不溶性の組織断片や加水分解された RNA、過剰な多糖類を除去できるため、肝臓、筋肉等のサンプルの場合に有効である。

\*3 試料の DNA が少量 (< 15 μg) の場合、繊維状の DNA をチップで回収できないことがある。その場合は、析出した DNA を遠心 (5,000 × g, 5 分間) により沈殿させ、上清を除去する。

\*4 エタノールが残ったまま DNA を溶解させると、その後の反応系に影響を与える可能性がある。必要に応じて室温でエタノールをとばす。(完全には乾かさない)

\*5 8 mM NaOH を使用した方が DNA を溶解しやすい。添加量の目安は裏面<VI>を参照。

\*6 8 mM NaOH (1 ml) に添加する 0.1 M または 1 M HEPES 溶液の添加量の目安を裏面に示す。

<8 mM NaOH (1 ml) に添加する 0.1 M または 1 M HEPES 溶液の添加量 (目安) >

Final pH	0.1 M HEPES	Final pH	0.1 M HEPES
8.4	86 $\mu$ l	7.5	159 $\mu$ l
8.2	93 $\mu$ l	7.2	23 $\mu$ l
8.0	101 $\mu$ l	7.0	32 $\mu$ l
7.8	117 $\mu$ l		

#### ■ ゲノム DNA の収量 (目安)

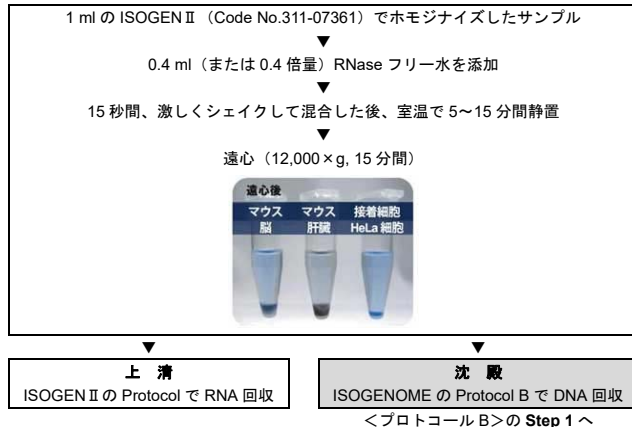
試料	ゲノム DNA 収量 (目安)
肝臓、腎臓、肺	3~5 $\mu$ g DNA/mg tissue
骨格筋、心臓、脳	1~3 $\mu$ g DNA/mg tissue

一般的に、純度 (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>) は 1.6~1.9、大きさは 20~100 kbp のゲノム DNA を単離することができる。

### プロトコール B : ISOGEN II と組み合わせた RNA、DNA の単離

ISOGEN II (Code No. 311-07361) は組織および細胞からの RNA 抽出用試薬です。これまでの ISOGEN II ではゲノム DNA を単離することができませんでしたが、ISOGENOME と組み合わせることによって、同一サンプルから RNA と DNA<sup>\*7</sup> が抽出できるようになりました。DNA は、ISOGEN II 溶解液の遠心後に得られる沈殿層から回収することができ、PCR などの使用に適しています。

<sup>\*7</sup> <プロトコール B> で得られる DNA は断片化している可能性があります。



### Step 5. DNA の溶解

- ① ピレットでチューブの底に残っているエタノールをできる限り除去する。<sup>\*4</sup>
- ② 8 mM NaOH または ddH<sub>2</sub>O で DNA を溶解する。<sup>\*5</sup>  
肝臓や筋肉などの組織から単離した DNA 溶液は多糖類などの不溶物を含む場合がある。その場合は、遠心 (12,000 x g, 10 分間) によって不溶物を除去する。
- ③ 8 mM NaOH で溶解した場合は HEPES 溶液などで中和する。<sup>\*6</sup>

<sup>\*4,5,6</sup> 表面を参照。

### VI トラブルシューティング

トラブル	対策
低収量	Step 1 の試料の溶解が不十分。または ISOGENOME の量が不十分。
RNA の混入	Step 2 の遠心分離 (オプション) を行うことで RNA の混入を低減できる。
夾雑物の混入 DNA 沈殿が見えない (Step 3)	Step 2 の遠心分離 (オプション) を行う。 Step 4 の 1 回目の洗浄を 1 ml の 75% エタノールの代わりに、0.7 ml の ISOGENOME と 0.3 ml のエタノール (99.5%) の混合液による洗浄に置き換える。2 回目の洗浄は 1 ml の 75% エタノールで行う。
吸光値のばらつき	試料の DNA が少量 (<15 $\mu$ g) または断片化 DNA の場合、Step 3 で遠心を行っても DNA 沈殿が見えないことがある。その場合は、Step 1 のホモジネート液に 3 $\mu$ l の Ethachinmate (Code No. 318-01793) を加える。
低収量	ブランクやサンプルの希釈に水を用いると値がばらつくことがある。吸光度測定には TE (pH 8.0) など pH 8.0 以上のバッファーを使用すると再現性よく測定できる。 低純度である。多糖類などの夾雑物が混入している。「夾雑物の混入」の対策を参照。
組織が溶解しにくい	組織が ISOGENOME 溶液中で溶解しにくい場合、Proteinase K による前処理が有効である。25~100 mg の組織に対し、500 $\mu$ l の ISOGENOME と Proteinase K (終濃度 100 $\mu$ g/ml) を添加し、室温で 4~24 時間反応させる。その後、500 $\mu$ l の ISOGENOME をさらに添加してプロトコール通りを行う。

#### ■ 8 mM NaOH または ddH<sub>2</sub>O の添加量の目安 (DNA の溶解)

1 x 10<sup>7</sup> 細胞または 10~20 mg の組織から単離した DNA に、0.2~0.3 ml の 8 mM NaOH または ddH<sub>2</sub>O を添加することで 0.2~0.3  $\mu$ g/ $\mu$ l の DNA 溶液が得られる。

#### ■ サンプルの保存について

- Step 1 で得られたホモジネートは、室温で 1 ヶ月間、4°C または -20°C で 10 ヶ月間保存できる。
- Step 4 で得られた 75% エタノール中の DNA は、室温で少なくとも 1 週間、4°C で 3 ヶ月間保存できる。

### Step 1. 試料の溶解 (ホモジナイゼーション)

- ① 沈殿層を崩さないように静かに残りの上清を除去する。
- ② 沈殿に対して 8~10 倍量の ISOGENOME を添加し、激しく混合して沈殿を溶解する。
- ③ 組織および軟組織や夾雑物の多い試料の場合は、沈殿の溶解液を室温で 5~10 分間静置する。(DNA の可溶化)

### Step 2. 遠心分離による不溶物の除去 (オプション) <sup>\*2</sup>

- ① 必要に応じて DNA 溶解液を遠心 (10,000 x g, 10 分間) し、不溶物を沈殿させる。
- ② 上清を新しいチューブに移す。

<sup>\*2</sup> 表面を参照。

### Step 3. DNA の沈殿

- ① 沈殿に添加した ISOGENOME の 0.5 倍量のエタノール (99.5%) を添加する。  
(例: 1 ml の ISOGENOME に対して 0.5 ml のエタノール)
- ② DNA 溶解液とエタノールが均一な溶液になるように転倒混合を行う。  
(目安: 5~8 回)
- ③ 1~3 分間、静置する。
- ④ 析出した DNA を遠心 (5,000 x g, 5 分間) により沈殿させる。
- ⑤ 上清を除去する。

### Step 4. DNA の洗浄

- ① DNA の入ったチューブに 1 ml の 75% エタノールを添加する。
- ② 転倒混合 (目安: 3~6 回) で DNA を洗浄する。
- ③ チューブを立てた状態で 30 秒~1 分間静置して DNA を沈殿させ、静かにピレットまたはデカンテーションによってエタノールを除去する。(沈殿が浮いてしまう場合は、遠心 (1,000 x g, 1~2 分間) して DNA を沈殿させた後、エタノールを除去する。)
- ④ もう一度 75% エタノールによる洗浄 (①~③) を繰り返す。

\* 記載内容や製品仕様に関しては予告なしに変更する場合があります。

### 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

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。