

簡易プロトコール (一般組織用)

1. 組織を25mg用意します。サンプルはなるべく小さく、剃刀の刃などで刻んでください。
液体窒素で凍結後に粉碎すると効率よく溶解できます。
2. サンプルに160μlのPBSを加えて、ボルテックスします。
3. Dounceホモジナイザーなどで、サンプルをホモジナイズします。
凍結粉碎したサンプルを利用する場合には、この操作は必要ありません。
4. 20μlのProteinase K (PK)を加えます。
5. さらに200μl のCell Lysis Buffer (CLD)を加えて、蓋をして10秒間ボルテックスをします。
6. 56°Cで30分~2時間インキュベートします。シェーカー型のインキュベーターがお勧めですが、利用できない場合には、30分に一回10秒間ほど撹拌してください。溶解が不十分な場合には、反応時間を長くしてください。
7. 20μl のRNase A Solution を各サンプルに加えて撹拌後、56°Cで10分間反応します。
8. サンプルをヒートブロック等から取り出し、250μl の Binding Buffer(BBA)を加えてから、ボルテックスを10秒間行います。
組織が残っているような場合には、1分間遠心を行い、上清を次のステップに使用する。
9. ReliaPrep™ Binding Column をCollection tube にセットして、サンプルを加えます。
10. 最高速で1分間遠心します。液がカラムに残っているようであれば、さらに遠心します。
11. Collection tube に残ったフロースルーを廃棄し、カラムを新しいCollection tubeにセットします。
12. 500μl のColumn Wash Solution (CWD) をカラムに加え、最高速で2分間遠心します。
フロースルーを廃棄します。
13. ステップ 9 をさらに2回行います (合計3回のWashを行います)。
14. カラムを、新しい1.5mlのマイクロチューブにセットします。
15. 50–200μl のNuclease-Free Water をカラムに加えて、最高速で1分間遠心します。
16. 溶出したDNAは、短期間の保存の場合は4°C、長期間の保存の場合には–20°Cで保管します。

