

ウシ全血からの DNA 抽出キット

CoCoMo™-BLV DNA Pure SPIN

マニュアル（第 1 版）

品番 A001

株式会社ニッポンジーン

I 製品説明

CoCoMo™-BLV DNA Pure SPIN は、ウシ全血からゲノム DNA を抽出するキットであり、牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）検出用の動物用研究用試薬である CoCoMo™-BLV Primer / Probe に最適化された DNA 抽出キットです。

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ncラムは、カラム容積を最大限確保しており、内封されたメンブレンは、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・保存

CoCoMo™-BLV DNA Pure SPIN（品番 A001）

キット構成	容量（100 回用）	保存温度	備考
吸着バッファー	28 ml × 1 本	室温	
プロテアーゼ K	1 ml × 2 本	-20℃	室温輸送品 * 1)
洗浄バッファー①	50 ml × 2 本	室温	エタノール含有 * 2)
洗浄バッファー②	30 ml × 2 本	室温	エタノール含有 * 2)
溶出バッファー	28 ml × 1 本	室温	組成：10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.1 mM EDTA
スピncラム	50 本 × 2 袋	室温	* 3)
コレクションチューブ	50 本 × 4 袋	室温	

- * 1) **キットは室温で輸送**します。製品到着後、プロテアーゼ K は-20℃保存して下さい。
なお-30℃や-80℃などの超低温での保存はしないで下さい。
- * 2) 洗浄バッファー①および洗浄バッファー②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) スピncラムは、蓋付きのシリカメンブレンカラム（上部パーツ）と
コレクションチューブ（下部パーツ）で構成されています。

III 使用上の注意

- ・ 作業環境への汚染を防ぐため、使用の際には溶液を飛散させたり、溶液に触れたピペットチップが他の器具や試薬に接触したりしないようご注意ください。
- ・ 本品は、研究用試薬です。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。

IV プロトコール

<キット以外に必要な試薬、器具、機器など>

試薬：・エタノール（96～100%）

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
- ・チューブラック

機器：・卓上遠心機（スピンドウン用）

- ・遠心分離機
- ・ボルテックスミキサー
- ・ヒートブロック

※ 作業環境について

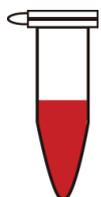
コンタミネーション防止のため、ウシ全血 DNA の抽出精製を行うエリアと、リアルタイム PCR の反応液を調製するエリアを分けることを推奨いたします。また、マイクロピペットやチューブラックなどの器具も各エリア専用とし、もし他のエリアで使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻すことを推奨いたします。

<抽出プロトコールを始める前に>

- ウシ全血を室温（15℃～25℃）に戻す。
- ヒートブロックを 56℃に加熱して温めておく。

<抽出プロトコール>

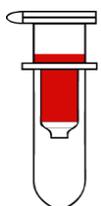
細胞の溶解



- ① 1.5 ml マイクロチューブにプロテアーゼ K を 20 μ l 加える。
- ② 室温に戻したウシ全血を転倒混和にて攪拌し、200 μ l 加える。
注) 攪拌が不十分の場合、同一サンプルでも DNA の抽出量に差が生じる場合がある。
- ③ 200 μ l の吸着バッファーを加え、ボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌する。
軽くスピンドウンしてチューブの壁面に付着している液体を落とす。
注) サンプルと吸着バッファーが完全に混和するように攪拌する。
攪拌が不足している場合、抽出効率が低下する。
- ④ 56°C で 10 分間保温する。
- ⑤ 200 μ l のエタノールを加える。ボルテックスで 15 秒間攪拌する。
軽くスピンドウンする。
注) 混合液とエタノールが完全に混和するように攪拌する。
攪拌が不足している場合、抽出効率が低下する。



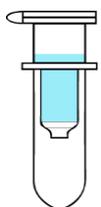
DNA 吸着



- ⑥ 混合液を全量 (620 μ l) スピнкаラムに添加する。
- ⑦ 遠心 (12,000 \times g、1 分間、室温) する。
- ⑧ ろ液をコレクションチューブごと廃棄し、スピнкаラムを新しいコレクションチューブに装着する。



洗浄 (1 回目)



- ⑨ 750 μ l の洗浄バッファー①をスピнкаラムに添加する。
- ⑩ 遠心 (12,000 \times g、1 分間、室温) する。
- ⑪ ろ液をコレクションチューブごと廃棄し、スピнкаラムを新しいコレクションチューブに装着する。

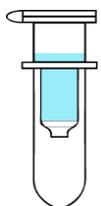


(次のページに続く)

(前のページからの続き)



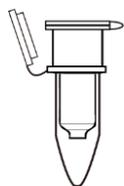
洗浄 (2回目)



- ⑫ 500 μ l の洗浄バッファー②をスピнкаラムに添加する。
- ⑬ 遠心 (12,000 \times g、5 分間、室温) する。
- ⑭ ろ液をコレクションチューブごと廃棄し、スピнкаラムを新しい 1.5 ml 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スピнкаラムを慎重に取り外し、新しいチューブへ装着する。
スピнкаラム本体にろ液が付着した場合はオプション操作を行う。



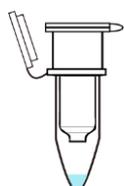
エタノールの除去 (オプション操作)



- スピнкаラムを空の状態のまま遠心 (12,000 \times g、1 分間、室温) する。
注) このオプション操作により、メンブレンを乾燥させて洗浄バッファー②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 1.5 ml マイクロチューブごと廃棄し、スピнкаラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブに装着する。



DNA 溶出



- ⑮ 50 μ l の溶出バッファーをメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置する。
- ⑯ 遠心 (12,000 \times 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>

エタノールなど本キット以外に必要なものを用意する。(本マニュアル p. 2 参照)

ウシ全血を室温に戻し、ヒートブロックを 56°C に温めておく。

1.5 ml マイクロチューブ

- ← 20 μ l のプロテアーゼ K を添加
- ← 転倒混和したウシ全血を 200 μ l 添加
- ← 200 μ l の吸着バッファーを添加
ボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌し、軽くスピンドウン

56°C で 10 分間保温

- ← 200 μ l のエタノールを添加
ボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌し、軽くスピンドウン

スピнкаラムに混合液を全量 (620 μ l) 添加

- ← 遠心 (12,000 \times g, 1 分間, 室温)
ろ液をコレクションチューブごと廃棄し、新しいコレクションチューブを装着
- ← 750 μ l の洗浄バッファー①を添加
- ← 遠心 (12,000 \times g, 1 分間, 室温)
ろ液をコレクションチューブごと廃棄し、新しいコレクションチューブを装着
- ← 500 μ l の洗浄バッファー②を添加
- ← 遠心 (12,000 \times g, 5 分間, 室温)
ろ液をコレクションチューブごと廃棄 (ろ液がカラムに付かないよう注意する)

カラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す

- 【オプション操作】
- ← スピнкаラムを空の状態のまま遠心 (12,000 \times g, 1 分間, 室温)
1.5 ml マイクロチューブを廃棄し、新しい 1.5 ml マイクロチューブを装着

- ← 50 μ l の溶出バッファーをメンブレン中央に滴下
室温で 3 分間静置

- ← 遠心 (12,000 \times g, 1 分間, 室温)

DNA 溶液

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	吸着バッファーとウシ全血の攪拌が不十分	<ul style="list-style-type: none"> 吸着バッファーとウシ全血をボルテックスミキサーで 15 秒間以上しっかり攪拌する。(プロトコール③)
	混合液とエタノールの攪拌が不十分	<ul style="list-style-type: none"> 混合液とエタノールをボルテックスミキサーにて 15 秒間しっかり攪拌した後、スピncラムに添加する。(プロトコール⑤)
一回目のカラム洗浄後もメンブレンが着色	サンプルの溶解が不十分	<ul style="list-style-type: none"> 吸着バッファーとウシ全血をボルテックスミキサーで 15 秒間以上しっかり攪拌する。(プロトコール③)
	カラムの洗浄が不十分	<ul style="list-style-type: none"> プロトコール⑫を行う前に、洗浄バッファー①を用いたカラムの洗浄 (プロトコール⑨~⑪) をもう一度行う。
抽出した DNA を用いた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	<ul style="list-style-type: none"> 洗浄バッファー②で洗浄した後、カラムにろ液が付着しないように慎重に取り外し、新しいチューブへ装着する。(プロトコール⑭) プロトコール⑮を行う前に、スピncラムを空の状態のまま遠心するオプション操作を行う。

VI 関連製品

品番	製品名	包装単位
A803	CoCoMo™-BLV Primer/Probe	50 反应用
A804	BLV PlasmidDNA/DilutionSolution	20 回用
A805	BLV PositiveControl/NegativeControl	20 反应用

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
診断試薬部 動物用研究用試薬 販売窓口

〒930-0982 富山県富山市荒川 1 丁目 1 番 25 号

TEL 076 - 442 - 3611

E-Mail info-dd@nippongene.com

受付時間：平日 9:00－12:00、13:00－17:00