

## カネカ簡易 DNA 抽出キット (RT-PCR 用)

## 取扱説明書

## 注意

- 本品は研究用です。ヒト、動物への医療・臨床診断に使用しないで下さい。また、食品、化粧品、家庭用品などとしても使用しないで下さい。
- 本品の使用、廃棄にあたっては、保護具(保護手袋、保護メガネなど)着用や、眼に入った場合や皮膚に付着した場合はよく水洗いするなど、実験室での一般の注意事項を厳守し安全に留意して下さい。

## 特徴／用途

- 本品は、簡便な操作かつ 30 分程度で、RT-PCR に利用可能な RNA を抽出できます。

| 内容物     |               |     |
|---------|---------------|-----|
| 試薬 A    | 400 $\mu$ l/本 | 5 本 |
| DNase I | 100 $\mu$ l/本 | 1 本 |

\* なお、本品は RT-PCR において、抽出液を鋳型として使用されることを想定した製品です。

## 使用方法

## ■ 標準プロトコル

## [ 培養細胞の場合 ]

1. 細胞培養液を、細胞数が 10<sup>3</sup> ~ 10<sup>6</sup> 個となるように遠心チューブに移す。
2. 遠心チューブを 1000 rpm にて 3 分間遠心する。収集した細胞ペレットを剥がさないように上清の培地成分を静かに除去する。
3. 細胞のペレットに PBS(-) を 100  $\mu$ l 加え、ピペッティングにより細胞を再懸濁する。遠心チューブを 1000 rpm にて 3 分間遠心後、上清を除去し細胞を収集する。
4. 細胞の入った遠心チューブに試薬 A を 20  $\mu$ l 添加し、ピペッティングにより、よく攪拌し懸濁する。懸濁液を新しい PCR チューブに移す。
5. 細胞懸濁液が入った PCR チューブをヒートブロックなどにて 75°C で 5 分間、インキュベートする。
6. PCR チューブを室温まで冷却した後、DNase I を 1  $\mu$ l 添加し、ピペッティングにより攪拌する。その後、ヒートブロックなどにて 42°C で 10 分間、75°C で 5 分間インキュベートする。
7. 使用するキットのプロトコルに従い、反応系へ抽出液を添加する。例えば、抽出液<sup>注1)</sup> 1 ~ 2  $\mu$ l を逆転写反応に使用する(25  $\mu$ l 反応系の場合)。<sup>注2)</sup>

#### [ 血液の場合 ]

1. 20  $\mu$ l の試薬 A を PCR チューブに添加する。
2. 上記 PCR チューブに、ヘパリンなどの抗凝固剤<sup>注 3)</sup> を添加した新鮮血 0.5 ~ 2.0  $\mu$ l を添加し、ピペッティングによりよく攪拌する。
3. 上記 PCR チューブをヒートブロックなどにて 75°C で 5 分間、インキュベートする。
4. PCR チューブを室温まで冷却した後、DNase I を 1  $\mu$ l 添加し、ピペッティングにより攪拌する。その後、ヒートブロックなどにて 42°C で 10 分間、75°C で 5 分間インキュベートする。
5. 使用するキットのプロトコルに従い、反応系へ抽出液を添加する。例えば、抽出液注 1) 1 ~ 2  $\mu$ l を逆転写反応に使用する(25  $\mu$ l 反応系の場合)。<sup>注 2)</sup>

注 1) インキュベートした溶液に沈殿物が見られる場合があります。沈殿物の除去は必須の工程ではありませんが、沈殿物を除去する場合は、PCR チューブを、4°C、5000 rpm にて 5 分間遠心し、上清を回収して下さい。

注 2) 抽出液は、すみやかに使用することをお薦めします。抽出液を使用する際は氷上にて保持し、保存時は -20°C 以下で保存して下さい。

注 3) ヘパリン、EDTA を添加した血液から RNA 抽出可能であることを確認しております。

#### 使用上の注意

1. 標準プロトコルにて RT-PCR により増幅断片が確認されない場合は、以下の操作を行うことで改善されることがあります。
  - ・使用する検体量を最適化する。(培養細胞の場合:細胞数  $10^3$ ~ $10^6$  個の範囲)
  - ・プロトコルの途中で作業を中断せず、作業をすみやかに実施する。
  - ・抽出液をすみやかに使用する。
  - ・実験条件やプライマーを最適化する。
2. RNA は RNase により容易に分解する恐れがあります。作業時は、コンタミネーションに十分注意し、使用するチューブやチップなどは、全て RNase free の製品を使用してください。抽出液を使用する際は、氷上にて保持し、保存時は -20°C 以下で保存してください。
3. 使用する細胞によっては、抽出液を鋳型とした実験で阻害物質の影響がある可能性があります。

#### 保存方法／使用期限

- 保存方法 :本品は冷凍にてお届けします。お受け取り後は、試薬 A、DNase I は -20°C 以下で保存して下さい。また、試薬 A が凍結している場合は、実験前に完全に融解させ、よく攪拌してからご使用ください。なお、試薬 A は融解後、-20 ~ 4°C でも保存可能です。

- 使用期限 : 本品の外袋に記載しております。
- 本品開封後は速やかにご使用下さい。
- 凍結融解を繰り返すことで DNase I の活性が低下する恐れがあります。あらかじめ DNase I を使用分量ずつ小分けして、使用の都度使い切ることで活性の低下を防げる場合があります。

## 廃棄方法

本品の取扱いの際は必ず保護具（保護手袋や保護メガネなど）を着用してください。

- 残余廃棄物 : 少量であればペーパータオルやウエスに吸収させて焼却処分する。
- 汚染容器及び包装 : 使用後の空容器と包装を廃棄する場合、内容物を完全に除去した後、後に処分する。

## 保証

- 弊社の責任の範囲は、本品自体に不具合があった場合の代替品への交換のみに限られ、直接・間接を問わずその他一切の損害について弊社はその責に任じません。あらかじめご了承ください。

## お問い合わせ先

カガクで  
ネガイを  
カナエル会社

株式会社カネカ  
[info\\_dquick@kaneka.co.jp](mailto:info_dquick@kaneka.co.jp)  
URL <http://www.kaneka-labtest.com>