

mtDNA Extractor CT Kit

Mitochondrial DNA (mtDNA) is a replicon containing in eukaryotic cytoplasm and its variants are known to arise independently of genomic DNA and participate in appearance of some diseases as diabetes, Alzheimer disease, and muscle disorders. Distribution of mtDNA variants is thought to be quite different among each tissue, and even each cells, and there are cells containing mitochondria at different portions between the normal and its variant mtDNAs. Therefore, qualified mtDNA from various tissues and cells are required to study the relationships between the diseases and mtDNA variants. However, existing methods for purification of mtDNA are consisted of very tedious manipulations, inappropriate for simultaneous isolation of mtDNAs from many samples for screening analyses, and many cases, total DNA fraction is used to analyze mtDNA, although mtDNA occupies at a quite small portion of the fraction.

“mtDNA Extractor CT Kit” is designed to isolate mtDNA from a variety of cells and tissues in high yield and high quantity with about 1 hour.

[Features]

1. mtDNA isolation with easy handling and time-saving.
2. Isolated mtDNA is pure enough to apply to the subsequent experiments as PCR and restriction enzyme digestion.
3. mtDNA isolated from as much as 5 mg of tissue is enough to amplify given DNA fragment by PCR. mtDNA isolated from 50 mg of tissues besides muscle tissues (250 mg) can be detected by EtBr-staining after agarose gel electrophoresis.
4. The method is applicable to frozen tissues as well as fresh ones.
5. The preparation is performed without hazardous reagents such as chloroform and aqueous phenol.

[Contents]

1. Buffer for Homogenate	25 mL	1 bottle
2. DNA Extraction Solution I	1.3 mL	1 vial
3. DNA Extraction Solution II (A)	1.3 mL	1 vial
4. DNA Extraction Solution II (B)	1.3 mL	1 vial
5. DNA Extraction Solution III	1.9 mL	1 vial
6. Sodium Iodide Solution	7.5 mL	1 bottle
7. Washing Solution	50 mL	1 bottle

[Materials and apparatuses to be prepared]

Reagents

1. Isopropanol, analytical grade
2. TE buffer at pH 8.
3. PBS (–), for cultured cells

Apparatuses and Lobo wares

1. Motor-driven Glass homogenizer or the equivalent
2. Automixer (MAZELA S type Z-1100, Tokyorikakikai IK. K., Tokyo)
3. 1.5mL-microtubes (sterilized)
4. Vortex mixer
5. Microfuge (max. 12,000 × g)
6. A centrifuge under reduced pressure
7. Cell scribe for cultured cells

[Procedures]

A. Isolation of mtDNA from mammalian tissues

1. Homogenize 50 mg of minced tissue with scissors in 1 mL of the homogenizing buffer with a glass homogenizer by up-and down of the pestle at 1,000 r.p.m. several times on ice until the pestle reaches the bottom of the glass well.

〈Notes〉

- 1) The sample tissues should be as fresh as possible. Qualified mtDNA could be prepared from 50 mg of frozen mammalian tissues at – 80 degrees C. for 1 month, and that from those frozen at – 20 degrees C. for 1 week.
- 2) mtDNA obtained from 50 mg of tissues besides muscles can be detected as a doublet bands on EtBr-staining an agarose gel electrophoresis, while mtDNA isolated from 250 mg of skeletal muscle can be detected on the same agarose gel.
- 3) Homogenization of rigid tissues such as skeletal and heart muscles should be done using glass homogenizer but not with glass Teflon homogenizer due to inefficient fragmentation of the tissues.
2. After transfer of the homogenate to another tube, centrifuge it at 1,000 × g at 4 degrees C. for 1 minute to precipitate large materials like nuclei, and then transfer the supernatant to another microtube by papering.
3. Centrifuge the microtube at 10,000 × g at 4 degrees C. for 10 minute to precipitate the membrane fraction from the supernatant, and then remove the resultant supernatant from the tube.
4. Add 50 micro L of DNA Extractor Solution I to the tube to mix well by papering or vortexing.
5. Add 100 micro L of pre-mixed solution of DNA extractor solution II (A) and (B) at equal volumes to the tube, and vortex it a couple of times, leaving it on ice for 5 minutes.

- 〈Note〉 Pre-mixed solution of DNA extractor Solution II (A) and (B) can be used at most for 3 weeks on storage at 2~10 degrees C after mixing. Although DNA Extractor Solution II (B) may form precipitate during the storage. It can be used after the precipitate is dissolved by warming followed by cooling.
6. Add 75 micro L of chilled DNA Extractor Solution III to the tube, and briefly vortex the tube, leaving the tube on ice for 5 minutes.
 7. Centrifuge the tube at $12,000 \times g$ for 5 minutes at 4 degrees C, followed by transfer of the supernatant to another tube by papering.
 〈Note〉 Transfer of the supernatant from the tube should be done, avoiding precipitate material to transfer to the new tube. On taking brownish material, try again from the centrifugation.
 8. Add 300 micro L of Sodium Iodide Solution to the tube, and mixing.
 9. Add 500 micro L of Isopropanol to the tube, and mix well.
 〈Note〉 The solution in the tube may be colored after addition of some isopropanol reagent, probably, due to deterioration of the reagent or its insufficient quantity. Analytical grade of Isopropanol should be used.
 10. Centrifuge the tube at $12,000 \times g$ for 10 minutes at room temperature, followed by decantation to remove the supernatant.
 〈Note〉 The precipitate can be seen due to co-precipitant containing in the solution provided.
 11. Add 1 mL of the Washing Solution to the tube, and is followed by brief vortexing.
 12. Centrifuge the tube at $12,000 \times g$ for 5 minutes at room temperature, followed by decantation.
 13. Repeat the wash consisted of Step 11 and 12.
 14. After drying the precipitate under reduced pressure, dissolve it in an appropriate volume of TE, at pH 8.
 〈Note〉 The final product contains RNA, which can be removed by digestion of RNase treatment : incubation with 10 micro g/mL RNase for 1 hour at room temperature.

B. Isolation of mtDNA from cultured cell

1. Rinse culture cells twice with PBS on the culture dish, followed by collection of the cells using cell scribe into glass homogenizer.
2. Proceed the whole steps from 1-14 described in A.

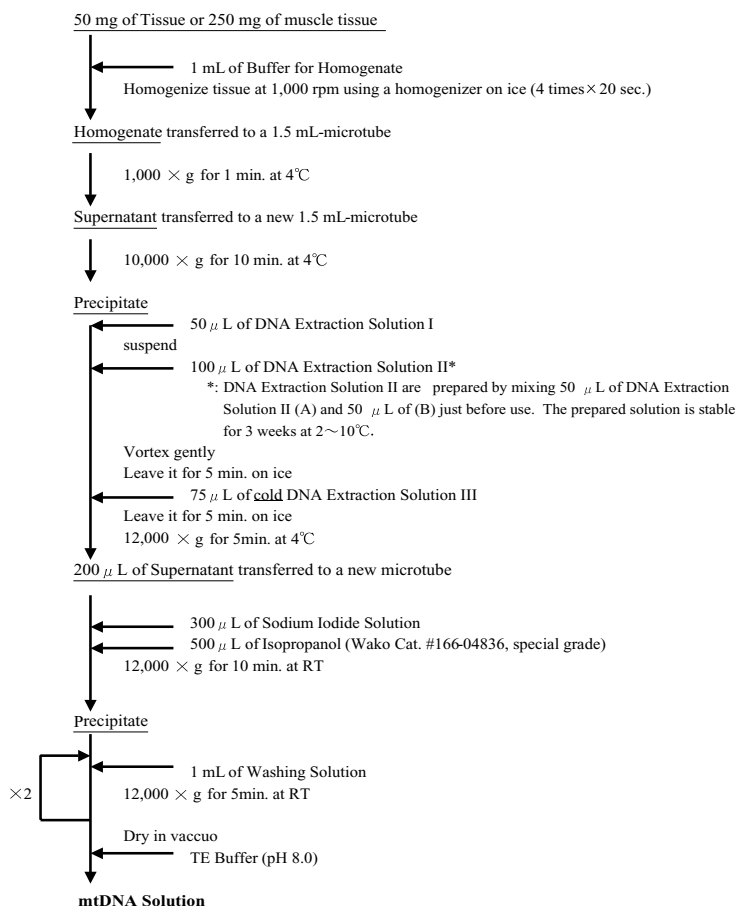
[Storage]

Keep at 2~10 degrees C.

[References]

- 1) 安田和基 : 医学のあゆみ, **174**, 420 (1995).
- 2) Davis, R. E. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4526 (1997).
- 3) Poulton, J. *et al.* : *Prenatal Diagnosis*, **16**, 1247 (1996).
- 4) Jazin, E. E. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12382 (1996).
- 5) 田中雅嗣, 小澤高将 : 日本臨床, **47**, 304 (1989).

mtDNA Extractor CT Kit (catalog No. : 291-55301, 25 tests)
【Protocol】



FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

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

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

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

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
 D-41468 Neuss
 Germany
 Telephone : + 49-2131-3111-0
 Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

コード No. 291-55301 (25回用)

細胞・組織ミトコンドリア DNA 抽出用

mtDNA エキストラクターCTキット

〔はじめに〕

近年、糖尿病やアルツハイマー病とミトコンドリア DNA (mtDNA) 変異との関連を示唆する報告がなされ始め、mtDNA の解析が盛んに行われるようになってきました^{1),2),3),4)}。mtDNA は、核 DNA と異なり個体の中で変異 DNA の分布と割合が多様なため、様々な症状を生じさせるものと考えられています。特に神経や筋組織に症状をあらわす多くの疾患にも深く関わっている事が知られるようになり、血液中の白血球からでなく、疾患に関わる様々な組織からも mtDNA を抽出する必要性が指摘されています⁵⁾。しかし、高純度の mtDNA を調製するには、煩雑な操作と多くの時間が必要であり、多検体処理を目的とした研究には適していません。現在行われている mtDNA の分析は、細胞から total DNA を抽出する際に含まれる微量の mtDNA を用いて、多量のゲノム DNA の混在下で行われています。

mtDNA エキストラクター CT キットは、細胞および組織から容易に高純度の mtDNA を抽出する事が出来ます。

〔特 長〕

- 1) 簡単な操作で短時間に mtDNA を抽出できます。
- 2) 調製された mtDNA は高純度であり、制限酵素処理や DNA 増幅反応に使用できます。
- 3) 少量の組織 (5 mg) からでも PCR 反応に適用できる mtDNA が回収できます。また回収された mtDNA はゲノムの混入が少ないため、組織片約 50 mg (骨格筋は 250 mg) からの抽出でアガロースゲル電気泳動により mtDNA の確認ができます。
- 4) 新鮮な組織だけでなく、凍結組織からも mtDNA の回収が可能です。
- 5) フェノールやクロロホルムなどの有害な劇物溶剤を使用しません。

〔内 容〕

1) Buffer for Homogenate	25 mL	1本
2) DNA Extraction Solution I	1.3 mL	1本
3) DNA Extraction Solution II (A)	1.3 mL	1本
4) DNA Extraction Solution II (B)	1.3 mL	1本
5) DNA Extraction Solution III	1.9 mL	1本
6) Sodium Iodide Solution	7.5 mL	1本
7) Washing Solution	50 mL	1本

〔貯 法〕 2～10℃保存

〔キット以外に必要なもの〕

試 薬

1) イソプロパノール (特級, Code 166-04836)	12.5 mL
2) TE バッファー (遺伝子工学研究用, Code 316-90025)	適量
3) PBS [培養細胞の場合] (組織洗浄用, Code 164-18541)	適量

器 具

- 1) ガラスホモジナイザー (またはテフロンホモジナイザー)
- 2) 自動攪拌機 (東京理科機械製 MAZELA Z Type Z-1100 等)
- 3) 1.5 mL マイクロチューブ (滅菌済)
- 4) ボルテックスミキサー
- 5) 微量高速遠心機 (最大 12,000 × g)
- 6) 減圧乾燥機
- 7) セルスクレーパー (培養細胞の場合)

〔使用方法〕（組織*1からの抽出法）

- (1) ハサミで細かく刻んだ組織片 50 mg*2 と Buffer for Homogenate 1 mL をホモジナイザー*3 に入れます。

*1 組織は出来るだけ新鮮な物を使用して下さい。但、 -80°C で 1 ヶ月以内または -20°C で 1 週間以内の凍結組織でも使用可能です。

*2 組織約 50 mg から抽出を行えば、アガロース電気泳動でバンドとして十分に確認できる程度の mtDNA が得られます。但、骨格筋は約 250 mg から抽出を行うと同程度の mtDNA が得られます。用法容量は同じです。

*3 骨格筋、心筋などの固い組織のホモジナイズには、必ずガラスホモジナイザーを使用して下さい。他の柔らかい組織にはテフロンホモジナイザーを用いて下さい。

- (2) ホモジナイザーの底に組織片がなくなるまで、氷中でマイルドにホモジナイズ（1,000 rpm, ペッスルを上下に 5 回程度）し、そのホモジネートをマイクロチューブに移します。
- (3) 4°C で 1 分間遠心（1,000 $\times$ g）した後、上清をピペットで新しいマイクロチューブに移します。
- (4) 4°C で 10 分間遠心（10,000 $\times$ g）した後、上清を除きます。
- (5) DNA Extraction Solution I を 50 μL 加え、ピペッティング（またはボルテックス）によりペレットを懸濁します。
- (6) 50 μL の DNA Extraction Solution II (A) および 50 μL の DNA Extraction Solution II (B)*4 を別のマイクロチューブ内で混合し（用時調製）*5、この混合液 100 μL をサンプルに加えて、ボルテックスミキサーで 2～3 回軽く混合した後、5 分間氷中に置きます。

*4 DNA Extraction Solution II (B) が沈殿を生じた場合は、 37°C の水で温めて完全に溶解後、室温に冷却してから使用して下さい。

*5 DNA Extraction Solution II (A) および (B) を混合後、 $2\sim 10^{\circ}\text{C}$ で 3 週間保存可能です。

- (7) 75 μL の予め氷冷しておいた DNA Extraction Solution III を加え、ボルテックスミキサーで混合した後、5 分間氷中に置きます。
- (8) 4°C で 5 分間遠心（12,000 $\times$ g）した後、上清（約 200 μL ）をピペットで新しいマイクロチューブに移します*6。

*6 ピペットで沈殿を吸わないよう注意して下さい（上清を全量採取する必要はありません）。また、茶褐色の沈殿を吸ってしまった場合は、再度遠心して完全に沈殿を除いて下さい。

- (9) 300 μL の Sodium Iodide Solution を加えて混合します。
- (10) 500 μL のイソプロパノールを加えて混合します*7。

*7 イソプロパノールの品質の劣化やグレードにより液が黄色に着色することがありますので、特級品を使用して下さい。

- (11) 室温で 10 分間遠心（12,000 $\times$ g）した後、上清を除きます*8。

*8 共沈剤が含まれていますので、ペレットを視認することができます。

- (12) 1 mL の Washing Solution を加えて混合します。
- (13) 室温で 5 分間遠心（12,000 $\times$ g）した後、上清を除きます。
- (14) ステップ (12) および (13) を 1 回繰り返します。

(15) ペレット (DNA) を減圧乾燥した後、TE バッファーに溶解します*9。

*9 最終的に得られた mtDNA には RNA が混入していますので、これを除去する場合は RNase 処理（最終濃度 10 μ g/mL、室温で1時間反応）を行って下さい。

〔培養細胞からの抽出法〕

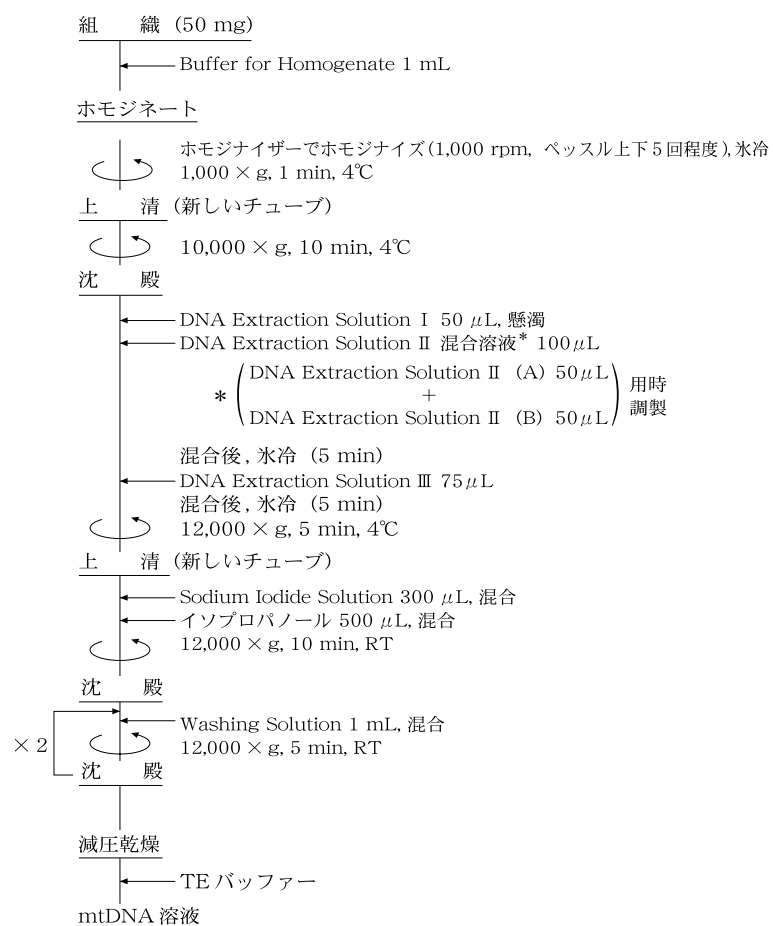
- (1) 培養した細胞を PBS で 2 回洗浄します。
- (2) セルスクレーパーにて細胞を回収しホモジナイザーに入れます。
- (3) Buffer for Homogenate を 1 mL 入れ、以下、（組織からの抽出法）(2)～(15)に準じます。

〔トラブルシューティング〕

問 題	原 因	対 策
mtDNA のバンドがスミアになる。	組織サンプルが古い。	組織サンプルは、できるだけ新鮮な物を使用して下さい。但、 -80°C で 1 ヶ月以内または -20°C で 1 週間以内の凍結組織ならば使用可能です。
DNA 増幅反応で DNA が増幅されない。	抽出操作中に DNA ペレットを上清と一緒に捨ててしまった。	DNA ペレットは遠心後、容器の底から剥がれやすいため、注意して上清を除いて下さい。
	DNA Extraction Solution III 添加、遠心後、沈殿が上清に混入した。	沈殿は、DNA 増幅反応を阻害する可能性がありますので、再度遠心して完全に沈殿を除いて下さい。
	DNA の洗浄が不十分。	Washing Solution で洗浄後、さらにエタノール沈殿を行い、DNA を十分に洗浄して下さい。
ゲノムDNAの混入が多い。	DNA Extraction Solution II (A) および (B) の混合液を長期間保存後に使用した。	基本的には用時調製ですが、保存する場合は、3 週間以内に使用して下さい。
	DNA Extraction Solution I, II および III をそれぞれ添加後、液を十分に混合していない。	添加後、ボルテックスミキサーで十分に液を混合して下さい。
mtDNA の回収率が悪い。	組織が十分に破壊されていない。 手動でホモジナイズした。	ホモジナイズは、自動攪拌機を使って、高速 (1,000 rpm) でなるべく手早く行って下さい。

〔参考文献〕

- 1) 安田和基：医学のあゆみ, **174**, 420 (1995).
- 2) Davis, R. E. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4526 (1997).
- 3) Poulton, J. *et al.* : *Prenatal Diagnosis*, **16**, 1247 (1996).
- 4) Jazin, E. E. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12382 (1996).
- 5) 田中雅嗣, 小澤高将：日本臨床, **47**, 304 (1989).



製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741

2304KA2