

Code No. 295-50201 (For 50 tests)

DNA Extractor[®] Kit

This product is in compliance with sodium Iodide method and designed for use in extracting residual host cell DNA in biological samples such as vaccines and biopharmaceuticals, and DNA in serum. It offers high recovery of DNA even from samples containing only a very small amount of DNA. The entire extraction step is completed with a single tube for 60-90 minutes. The extracted DNA can be quantified by qPCR or threshold systems from Molecular Devices, LLC.

There are two protocols for DNA extraction using this kit. Protocol #1 is used for DNA extracting from clean samples such as purified proteins or serum. Protocol #2 is used for crude samples such as cell lysate, solution containing high-concentration protein or lipid, and when the extracted DNA is quantified by threshold systems from Molecular Devices, LLC.

Difference between the two protocols are indicated in the table below.

	Sample of interest	Pretreatment step of sample	Number of washing steps	"Washing Solution (A)" in the kit
Protocol #1	Clean or Serum	Not required	1 time	Not required
Protocol #2	Crude or Threshold systems	Optional	2 times	Required

[Features]

- In compliance with sodium Iodide method
- High quality and recovery
- Completed in a single tube for 60-90 minutes.

[Principle of sodium Iodide method for DNA extraction]

An chaotropic reagent, Sodium Iodide, and an anionic detergent participate in solubilization of proteins and lipids contained in biological samples. After addition of 2-propanol to the mixture, nucleic acids are co-precipitated with glycogen as a carrier, while other components remain soluble in the solution phase.

[Kit contents]

Code No.	Components	Size
292-50211	Sodium Iodide Solution	26 mL × 1
299-50221	Sodium N-Lauryl Sarcosinate Solution	1.2 mL × 1
296-50231	Washing Solution (A)	42 mL × 1
293-50241	Washing Solution (B)	40 mL × 2
290-50251	Glycogen Solution	0.1 mL × 1

[Storage]

room temperature

[Additional materials required for 50 tests]**〈Reagents〉**

- 1) 2-Propanol 20 mL
- 2) Sterile distilled water 6 mL

〈Instruments〉

- 1) Microcentrifuge
- 2) Vortex mixer
- 3) 50 × 2 mL or 1.5 mL of centrifuge tube
- 4) Micropipette
- 5) Micropipette tips
- 6) Heating block

[Precautions for Use]

- The color of "Washing Solution (A)" may be slightly different between product lots. e.g. faint yellow or colorless. It does not affect quality of DNA extraction.
- If precipitate is observed in "Sodium Iodide Solution" or "Sodium N-Lauryl Sarcosinate Solution", warm it or them at 50°C until the precipitate is no longer visible.
- Use DNA-free, DNase-free and sterilized reagents and Instruments.
- DNA concentration cannot be accurately measured by absorbance if sodium Iodide remains in the extracted DNA. Measure the amount of DNA by qPCR or threshold systems.

[Protocol #1]**〈Preparation of Reagents〉****Solution I-A**

Add 6 mL of sterile distilled water, 1 mL of "Sodium N-Lauryl Sarcosinate Solution" and 65 μ L of "Glycogen Solution" into the bottle of 26 mL of "Sodium Iodide Solution". Mix it with a vortex mixer.

Note : Solution I-A can be stored at 2-10°C in the dark for approximately 5 months.

Solution II

Add 2 μ L of "Glycogen Solution" into the bottle of 40 mL of "Washing Solution (B)". Mix it with a vortex mixer immediately.

Notes :

- It does not affect quality of DNA extraction if white precipitates appear in Solution II.
- Solution II can be stored at 2-10°C in the dark for approximately a week at least. If preparing a small volume of Solution II, use required amount of "Glycogen Solution" and "Washing Solution (B)". For example, add 1 μ L of "Glycogen Solution" into 20 mL of "Washing Solution (B)" in a sterilized tube.

〈DNA Extraction Procedure〉

1. Dispense 100 μ L of sample solution to a 2 mL or 1.5 mL blank centrifuge tube.
2. Add 300 μ L of Solution I-A into the tube and mix it with a vortex mixer.
3. Warm the tube at 60°C for 15 minutes in a heating block.
4. Remove the tube from the heating block. Add 400 μ L of 2-Propanol

into the tube and mix it with a vortex mixer.

5. Leave the tube at room temperature for 15 minutes.
6. Centrifuge the tube with $10,000 \times g$ at room temperature for 15 minutes.
A faint white pellet appears in the tube.
7. Remove supernatant from the tube by using a pipette and/or decanting carefully until the liquid volume in the tube is less than approximately 100 μL .

Notes :

- Be careful not to remove the pellet from the tube.
 - Centrifuge the tube with $10,000 \times g$ at room temperature for 15 minutes again if the pellet floats.
 - In case that residual liquid remains on the tube wall, place the tube upside down on a paper filter to remove it.
8. Add 1 mL of Solution II into the tube and mix it by inverting gently. Ensure that the pellet is detached from the tube wall.
 9. Centrifuge the tube with $10,000 \times g$ at room temperature for 5 minutes.
 10. Remove as much supernatant as possible from the tube by using a pipette and/or decanting carefully.

Notes :

- Be careful not to remove the pellet from the tube.
 - Centrifuge the tube with $10,000 \times g$ at room temperature for 5 minutes again if the pellet floats.
 - In case that residual liquid remains on the tube wall, place the tube upside down on a paper filter to remove it.
11. Dry the pellet by warming it at 60°C in a heating block, vacuum dryer or natural drying.
- Notes :
- Too dry pellet is difficult to be dissolved. Stop drying the pellet when it still is wet.
 - Much residual liquid in the tube may cause low qPCR efficiency because Solution II contains ethanol, which can inhibit qPCR.
 - The pellet contains DNA and glycogen.
12. Dissolve the pellet with sterile distilled water or buffer, and proceed with qPCR.

[Protocol #2]

〈Preparation of Reagents〉

1. Solution I-B

65 μL of "Glycogen Solution" into the bottle of 26 mL of "Sodium Iodide Solution". Mix it with a vortex mixer.

Note : Solution I-B can be stored at $2-10^\circ\text{C}$ in the dark for approximately 5 months.

2. Solution II

Add 2 μL of "Glycogen Solution" into the bottle of 40 mL of "Washing Solution (B)". Mix it with a vortex mixer immediately.

Notes :

- It does not affect quality of DNA extraction if white precipitates appear in Solution II.
- Solution II can be stored at $2-10^\circ\text{C}$ in the dark for approximately a week at least. If preparing a small volume of Solution II, use required amount of "Glycogen Solution" and "Washing Solution (B)". For example, add 1 μL of "Glycogen Solution" into 20 mL of "Washing Solution (B)" in a sterilized tube.

〈Pretreatment Step of Sample〉

This step is optional and can be skipped. In case of extracting DNA from samples containing much protein and/or lipid, do the pretreatment according to 〈Optional Protocol for Preparation of Samples〉 mentioned later.

〈DNA Extraction Procedure〉

1. Dispense 400-500 μL of sample solution to a 2 mL blank centrifuge tube.
2. Add 20 μL of "Sodium N-Lauryl Sarcosinate Solution" into the tube and mix it with a vortex mixer.
3. Add 500 μL of Solution I-B into the tube and mix it with a vortex mixer.
4. Warm the tube at 40°C for 15 minutes in a heating block.
5. Remove the tube from the heating block. Add 900 μL of 2-Propanol into the tube and mix it with a vortex mixer.
6. Leave the tube at room temperature for 15 minutes.
7. Centrifuge the tube with $10,000 \times g$ at room temperature for 15 minutes.

A faint white pellet appears in the tube.

8. Remove supernatant from the tube by using a pipette and/or decanting carefully until the liquid volume in the tube is less than approximately 100 μL .

Notes :

- Be careful not to remove the pellet from the tube.
 - Centrifuge the tube with $10,000 \times g$ at room temperature for 15 minutes again if the pellet floats.
 - In case that residual liquid remains on the tube wall, place the tube upside down on a paper filter to remove it.
9. Add 800 μL of "Washing Solution (A)" into the tube and mix it by inverting gently. Ensure that the pellet is detached from the tube wall.
 10. Centrifuge the tube with $10,000 \times g$ at room temperature for 5 minutes.
 11. Remove supernatant from the tube by using a pipette and/or decanting carefully until the liquid volume in the tube is less than approximately 100 μL .

Notes :

- Be careful not to remove the pellet from the tube.
 - Centrifuge the tube with $10,000 \times g$ at room temperature for 5 minutes again if the pellet floats.
 - In case that residual liquid remains on the tube wall, place the tube upside down on a paper filter to remove it.
12. Add 1.5 mL of Solution II into the tube and mix it by inverting gently.
 13. Centrifuge the tube with $10,000 \times g$ at room temperature for 5 minutes.
 14. Remove as much supernatant as possible from the tube by using a pipette and/or decanting carefully.

Notes :

- Be careful not to remove the pellet from the tube.
 - Centrifuge the tube with $10,000 \times g$ at room temperature for 5 minutes again if the pellet floats.
 - In case that residual liquid remains on the tube wall, place the tube upside down on a paper filter to remove it.
15. Dry the pellet by warming it at 60°C in a heating block, vacuum

dryer or natural drying.

Notes :

- Too dry pellet is difficult to be dissolved. Stop drying the pellet when it still is wet.
- Much residual liquid in the tube may cause low qPCR efficiency because Solution II contains ethanol, which can inhibit qPCR.
- The pellet contains DNA and glycogen.

16. Dissolve the pellet with sterile distilled water or buffer and proceed with qPCR.

Or dissolve the pellet with Zero Calibrator in Total DNA Assay Kit from Molecular Devices, LLC. and quantify the extracted DNA by Threshold systems.

〈Optional Protocol for Preparation of Samples〉

■ In case that protein concentration in the sample solution is less than 2 mg/mL.

1. Add the reagents below into the sample solution to the final concentration.

Reagents	Final concentration
Sodium Dodecyl Sulfate	0.10%
Dithiothreitol	50 mmol/L

2. Warm it at 55°C for 30 minutes in a heating block.

3. Proceed with 〈DNA Extraction Procedure〉 in Protocol #2.

■ In case that protein concentration in the sample solution is more than 2 mg/mL.

1. Add the reagents below into the sample solution to the final concentration.

Reagents	Final concentration
Sodium Dodecyl Sulfate	0.10%
Dithiothreitol	50 mmol/L
Sodium Chloride	150 mmol/L
EDTA	1 mmol/L

2. Add 20 μ g of Proteinase K per 1 mg of protein in the sample solution in to the sample solution.

3. Adjust pH to be approximately 7.5 with Tris.

4. Warm it at 55°C in a heating block for an hour at least.

5. Proceed with 〈DNA Extraction Procedure〉 in Protocol #2.

【FAQ】

Q. Peak wavelength appeared at 230 nm when extracted DNA concentration was measured by absorbance.

A. Sodium Iodide remains in the extracted DNA. Measure the amount of DNA by qPCR or Threshold systems.

Q. DNA recovery rate was too low.

A. A part of DNA pellet may have been removed at steps for removing supernatant. Remove the supernatant with a pipette carefully.

【Reference】

Ishizawa, M., Kobayashi, Y., Miyamura, T. and Matuura, S. (1991) Simple Procedure of DNA isolation from human serum, Nucleic Acids Res., **19**, 5792.

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://fwk.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. 295-50201 (50回用)

DNA エキストラクター[®] キット

本品は、ワクチンやバイオ医薬品のような生物由来製品に残留する宿主細胞由来の DNA や血清中の DNA をよう化ナトリウム法で抽出するキットです。

サンプルに含まれる極微量の DNA でも高い収率で回収でき、全ての工程はチューブ交換なしで 60～90 分間で完了します。抽出した DNA は、qPCR もしくは Molecular Devices 社の Threshold systems で定量できます。

本キットを用いた DNA の抽出には 2 つのプロトコルがあります。プロトコル #1 は、精製タンパク質や血清サンプルなど夾雑物が比較的少ないサンプルからの DNA 抽出法です。プロトコル #2 は、セルライセートやタンパク質や脂質が多く含まれるサンプルからの DNA 抽出法です。また、Molecular Devices 社の Threshold systems で抽出した DNA を定量する場合もプロトコル #2 をご使用ください。

プロトコルの違いは以下の表をご参照ください。

	サンプル	サンプルの前処理	洗浄回数	キット中の “Washing Solution (A)”
プロトコル #1	・夾雑物が少ない ・血清	不要	1 回	使用しない
プロトコル #2	・夾雑物が多い ・Threshold system	オプション	2 回	使用する

【特長】

- ・よう化ナトリウム法
- ・高純度、高回収率
- ・チューブ交換なしかつ 60～90 分間で操作が完了

【よう化ナトリウム法による DNA 抽出の原理】

よう化ナトリウムと界面活性剤により、試料中のタンパク質および脂質を可溶化し、そこへ 2-プロパノールを添加することで、核酸をグリコーゲンと共沈させます。カオトロピックイオンのよう化ナトリウムおよび界面活性剤が、試料中のタンパク質を始めとした成分の沈殿を妨げるため、DNA とグリコーゲンが特異的に沈殿します。

【キット内容】

コード No.	品 名	容 量
292-50211	Sodium Iodide Solution	26mL × 1
299-50221	Sodium N-Lauryl Sarcosinate Solution	1.2mL × 1
296-50231	Washing Solution (A)	42mL × 1
293-50241	Washing Solution (B)	40mL × 2
290-50251	Glycogen Solution	0.1mL × 1

【保存条件】

室温保存

【キット以外に必要なもの (50 回用)】

〈試薬〉

- 1) 2-Propanol 20mL
- 2) 滅菌蒸留水 6mL

〈器具〉

- 1) マイクロ遠心機
- 2) ボルテックスミキサー
- 3) 2mL 容 または 1.5mL 容 マイクロチューブ 50 本
- 4) マイクロピペット
- 5) マイクロピペットチップ
- 6) ヒートブロック

【ご使用の前に】

- ・“Washing Solution (A)” は、ロットにより無色の場合とわずかに黄色の場合がありますが、品質上問題はありません。
- ・“Sodium Iodide Solution” もしくは “Sodium N-Lauryl Sarcosinate Solution” に析出がみられる場合は、50℃に加温して析出を完全に溶解させてから使用してください。
- ・DNA フリー、DNase フリー の滅菌済み試薬と器具をご使用ください。
- ・抽出した DNA 中による化ナトリウムが残っていると、吸光度で DNA の濃度を正確に測定することはできません。qPCR もしくは Molecular Devices 社の Threshold systems で測定してください。

【プロトコル #1】

〈試薬の調製〉

Solution I-A

6mL の滅菌蒸留水、1mL の “Sodium N-Lauryl Sarcosinate Solution”、65 μ L の “Glycogen Solution” を “Sodium Iodide Solution” 26mL が入った容器に加え、ボルテックスミキサーで混合します。

注意：Solution I-A は 2～10℃で遮光保存します。約 5 ヶ月間使用可能です。

Solution II

2 μ L の “Glycogen Solution” を “Washing Solution (B)” 40 mL が入った容器に加え、直ちにボルテックスミキサーで混合します。

注意：

- ・Solution II に白い析出物が現れる場合がありますが、DNA の抽出に影響はありません。
- ・Solution II は 2～10℃で遮光保存してください。約 1 週間使用可能です。Solution II を少量調製する場合、“Glycogen Solution” と “Washing Solution (B)” を必要量だけ混合します。
例) 1 μ L の “Glycogen Solution” を 20mL の “Washing Solution (B)” が入った滅菌チューブに加える。

〈DNA の抽出〉

1. 100 μ L のサンプル溶液を 1.5mL 容あるいは 2mL 容のマイクロチューブに移します。
2. 300 μ L の Solution I-A をサンプル溶液に加え、ボルテックスミキサーで混合します。
3. ヒートブロックを使い、60℃で 15 分間温めます。
4. マイクロチューブをヒートブロックから取り出し、400 μ L の 2-Propanol を加え、ボルテックスミキサーで混合します。

5. 室温で15分間静置します。
6. 室温で15分間、10,000×*g*で遠心分離します。マイクロチューブ中にわずかに白いペレットが生じます。
7. マイクロピペットあるいはデカンテーションでマイクロチューブ中の液量が100 μ L 以下になるまで上清を取り除きます。
注意：
 - ・マイクロチューブ中のペレットを取り除かないよう注意してください。
 - ・ペレットが浮遊している場合、室温で15分間、10,000×*g*で再度遠心分離します。
 - ・チューブの内壁に上清が残っている場合は、ろ紙上でチューブを逆さまにして上清を取り除きます。
8. 1mL の Solution II を加え転倒混和で穏やかに混合します。ペレットがチューブの内壁から剥がれていることを確認してください。
9. 室温で5分間、10,000×*g*で遠心分離します。
10. マイクロピペットあるいはデカンテーションのできる限り上清を取り除きます。
注意：
 - ・ペレットを取り除かないよう十分ご注意ください。
 - ・ペレットが浮遊している場合は、室温で5分間、10,000×*g*で再度遠心分離します。
 - ・チューブの内壁に上清が残った場合は、ろ紙上でマイクロチューブを逆さまにし、上清を取り除きます。
11. ヒートブロックで60℃に加温、真空乾燥機、自然乾燥のいずれかでチューブに残ったペレットを乾燥させます。
注意：
 - ・ペレットを乾燥させすぎると溶解が困難になります。ペレットが湿った状態で乾燥を止めてください。
 - ・マイクロチューブの中に上清が残っていると、Solution II に含まれるエタノールがqPCRを阻害するため、qPCR効率が下がることがあります。
 - ・ペレットにはDNAとグリコーゲンが含まれます。
12. ペレットを滅菌蒸留水またはバッファーに溶解し、qPCRを行います。

【プロトコール #2】

〈試薬の調製〉

1. Solution I-B
65 μ L の “Glycogen Solution” を “Sodium Iodide Solution” 26mL が入った容器に加え、ボルテックスミキサーで混合します。
注意：Solution I-B は 2～10℃で遮光保存してください。約5ヶ月間使用可能です。
2. Solution II
2 μ L の “Glycogen Solution” を “Washing Solution (B)” 40mL が入った容器に加え、直ちにボルテックスミキサーで混合します。
注意：
 - ・Solution II に白い析出物が現れる場合がありますが、DNA の抽出に影響はありません。
 - ・Solution II は 2～10℃で遮光保存してください。約1週間使用可能です。Solution II を少量調製する場合、“Glycogen Solution” と “Washing Solution (B)” を必要量だけ混合します。例) 1 μ L の “Glycogen Solution” を “Washing Solution (B)” 20mL が入った滅菌チューブに加える。

〈サンプルの前処理〉

サンプルによっては本工程を省くことができます。タンパク質や脂質が多量に含まれたサンプルからDNAを抽出する場合は、本説明書の最後にある〈サンプル前処理プロトコル〉に従ってサンプルを処理します。

〈DNA の抽出〉

1. 400～500 μ L のサンプル溶液を2mL 容マイクロチューブに移します。
2. サンプル溶液に20 μ L の “Sodium N-Lauryl Sarcosinate Solution” を加え、ボルテックスミキサーで混合します。
3. 500 μ L の Solution I-B を加え、ボルテックスミキサーで混合します。
4. ヒートブロックを使い、40℃で15分間温めます。
5. ヒートブロックからマイクロチューブを取り出し、900 μ L の 2-Propanol を加え、ボルテックスミキサーで混合します。
6. 室温で15分間静置します。
7. 室温で15分間、10,000×*g*で遠心分離します。マイクロチューブ中にわずかに白いペレットが生じます。
8. マイクロピペットあるいはデカンテーションでマイクロチューブ中の液量が100 μ L 以下になるまで上清を取り除きます。
注意：
 - ・マイクロチューブ中のペレットを取り除かないよう注意してください。
 - ・ペレットが浮遊している場合、室温で15分間、10,000×*g*で再度遠心分離します。
 - ・チューブの内壁に上清が残っている場合は、ろ紙上でチューブを逆さまにして上清を取り除きます。
9. 800 μ L の “Washing Solution (A)” を加え、転倒混和で穏やかに混合します。ペレットがチューブの内壁から剥がれていることを確認してください。
10. 室温で5分間、10,000×*g*で遠心分離します。
11. マイクロピペットあるいはデカンテーションでマイクロチューブ中の液量が100 μ L 以下になるまで上清を取り除きます。
注意：
 - ・マイクロチューブ中のペレットを取り除かないよう注意してください。
 - ・ペレットが浮遊している場合、室温で5分間、10,000×*g*で再度遠心分離します。
 - ・チューブの内壁に上清が残っている場合は、ろ紙上でチューブを逆さまにして上清を取り除きます。
12. 1.5mL の Solution II を加え、転倒混和で穏やかに混合します。
13. 室温で5分間、10,000×*g*で遠心分離します。
14. マイクロピペットあるいはデカンテーションのできる限り上清を取り除きます。
注意：
 - ・ペレットを取り除かないよう十分ご注意ください。
 - ・ペレットが浮遊している場合は、室温で5分間、10,000×*g*で再度遠心分離します。
 - ・チューブの内壁に上清が残った場合は、ろ紙上でマイクロチューブを逆さまにし、上清を取り除きます。
15. ヒートブロックで60℃に加温、真空乾燥機、自然乾燥のいずれかでチューブに残ったペレットを乾燥させます。
注意：
 - ・ペレットを乾燥させすぎると溶解が困難になります。ペレットが湿った状態で乾燥を止めてください。
 - ・マイクロチューブの中に上清が残っていると、Solution II に含ま

れるエタノールが qPCR を阻害するため、qPCR 効率が下がることがあります。

・ベレットには DNA とグリコーゲンが含まれます。

16. ベレットを滅菌蒸留水またはバッファーに溶解し、qPCR を行います。Molecular Devices 社の Threshold system で DNA を定量する場合は、Molecular Devices 社の Total DNA Assay Kit 付属の Zero Calibrator でベレットを溶解します。

〈サンプル前処理プロトコル〉

■サンプル溶液中のタンパク質濃度が 2mg/mL 以下の場合

1. 最終濃度が以下になるように試薬をサンプルに加えます。

試薬	最終濃度
Sodium Dodecyl Sulfate	0.10%
Dithiothreitol	50mmol/L

2. ヒートブロックを使い、55℃で 30 分間温めます。
3. プロトコル #2 の〈DNA の抽出〉へ進みます。

■サンプル溶液中のタンパク質濃度が 2mg/mL 以上の場合

1. 最終濃度が以下になるように試薬をサンプルに加えます。

試薬	最終濃度
Sodium Dodecyl Sulfate	0.10%
Dithiothreitol	50mmol/L
Sodium Chloride	150mmol/L
EDTA	1mmol/L

2. サンプル溶液中のタンパク質 1mg あたり 20 μ g の Proteinase K をサンプル溶液に加えます。
3. pH が約 7.5 になるように Tris で調整します。
4. ヒートブロックを使い、55℃で 1 時間以上温めます。
5. プロトコル #2 の〈DNA の抽出〉へ進みます。

【FAQ】

Q. 抽出した DNA 濃度を吸光度で測定したところ、230nm にピーク波長が出ました。

A. 抽出した DNA 中によ化ナトリウムが残っていたと考えられます。DNA 濃度は qPCR あるいは Threshold system で測定してください。

Q. DNA の回収率がとても低い。

A. 上清を取り除く工程で DNA を含んだベレットを除去した可能性があります。上清はピペットで注意深く除去してください。

【参考文献】

Ishizawa, M., Kobayashi, Y., Miyamura, T. and Matuura, S. (1991) Simple Procedure of DNA isolation from human serum, Nucleic Acids Res., **19**, 5792.

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社
大阪府中央区道修町三丁目 1 番 2 号
Tel : 06-6203-3741