

# MonoFas<sup>®</sup>

研究用試薬キット

---

DNA Stool Kit Ver.02

取扱説明書



株式会社アニモス

## 目次

1. 製品説明 .....	- 3 -
2. 製品内容 .....	- 3 -
3. 製品仕様 .....	- 4 -
4. 必要な試薬及び器具 .....	- 4 -
5. MonoFas <sup>®</sup> スピんカラム使用上の注意事項 .....	- 4 -
6. DNA 抽出プロトコールの簡易フロー .....	- 5 -
7. 保存及びその他の注意 .....	- 12 -
8. 保証期間 .....	- 12 -

## 1. 製品説明

**MonoFas® DNA Stool Kit Ver.02**は、ヒト、動物（肉食、雑食、草食動物）の糞便からDNAを抽出するキットです。

次世代の高分離フィルターである均一な連続孔を持つシリカモノリス採用し、高効率、高純度を実現しながら、短時間で簡便な抽出操作で行なえるのが特長です。本キットは、破碎ビーズ工程と組み合わせることで、糞便中の微生物（グラム陽性、陰性菌等）から網羅的に高純度DNAを抽出が可能です。

本キットによって得られたDNAで、不純物の除去率が高く、抽出したDNA溶液中に無機塩類が非常に少ないため、高効率のPCR増幅が可能です。

## 2. 製品内容

本製品を受け取りましたら、梱包内容、スピнкаラムの外観、数量、バッファー液等に異常がないか確認してください。

内容違い、数量違い、スピнкаラムの外観等に異常がありましたら、すみやかに弊社へご連絡ください。

Cat. No.	A19-0001	A19-0002	A19-0003	A19-0004
回数	25	50	100	250
スピнкаラム	25本×1袋	50本×1袋	50本×2袋	50本×5袋
Buffer A19（溶解）	9 mL	17 mL	33 mL	83 mL
Buffer B19（変性・吸着）	9 mL	17 mL	33 mL	83 mL
Buffer C19（洗浄）	14 mL	28 mL	55 mL	138 mL
Buffer D19（溶出）*	6 mL	6 mL	11 mL	28 mL

### 破碎ビーズセット

Cat. No.	A19-0501	A19-0502	A19-0503	A19-0504
回数	25	50	100	250
スピнкаラム	25本×1袋	50本×1袋	50本×2袋	50本×5袋
ビーズチューブ（Bead Tube）	25本×1袋	50本×1袋	50本×2袋	50本×5袋
Buffer A19（溶解）	9 mL	17 mL	33 mL	83 mL
Buffer B19（変性・吸着）	9 mL	17 mL	33 mL	83 mL
Buffer C19（洗浄）	14 mL	28 mL	55 mL	138 mL
Buffer D1（溶出）*	6 mL	6 mL	11 mL	28 mL

\* 冬季になると Buffer A19 に白い結晶が析出する場合がありますが、品質、性能に問題はありません。容器ごと 40~50℃で加温し、結晶を完全に溶解させてからご使用ください。

\* Buffer D19 は、10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA (Free) (pH 8.5) です。

### 3. 製品仕様

	糞便からの DNA 抽出
原理	シリカモノリス法
操作時間	～35分
推奨処理量	～0.2g
溶出量	10～100 μL
DNA の純度(A260/A280)	1.7～2.1
DNA の純度(A260/A230)	1.7～2.1

### 4. 必要な試薬及び器具

<本キット以外に必要な試薬、機器>

- 99.5%エタノール 又は イソプロパノール (特級グレードを推奨)
- マイクロピペット、マイクロピペット用チップ
- 1.5 又は 2.0 mL 遠心チューブ
- 50 mL 遠心管
- ビーズ式破碎装置 (2 mL チューブ対応のもの)
- 遠心機 ※
- 恒温槽: ドライバス 又は ウォーターバス (70℃で使用可能なもの)
- ボルテックスミキサー (2,500 rpm 程度の攪拌ができるもの)

※ 遠心機によっては使用できないケースがありますので、遠心機の仕様をご確認の上、使用してください。  
また本書での以下の基本計算式をもとに相対遠心加速度(×g)と回転数(rpm)を算出しております。

ローターの回転半径は、遠心機によって変わりますので、遠心機取扱説明書のローター仕様ページをご確認ください。

基本計算式

$$RCF = 1.118 \times R \times N^2 \times 10^{-6}$$

RCF: 相対遠心加速度 (×g)    R: 回転半径(mm)    N: 回転数 (rpm)

### 5. MonoFas®カラム使用上の注意事項

- スピнкаラムは落としたり、ぶついたりしないでください。強い衝撃を与えるとシリカモノリスが割れることがあります。
- すべての工程は遠心操作で行ってください。
- スピнкаラムはオートクレーブ処理が可能です。処理後は、真空乾燥機を利用して十分乾燥させてから使用してください。  
オートクレーブ条件: 110℃以下、20分以内  
乾燥条件: 真空化 100℃以下 5時間以上
- スピнкаラムは汎用のシリカメンブレンカラムより通液抵抗が小さくなっておりますので、液の流出を止める場合にはスピнкаラムの蓋を閉めるようにしてください。
- 遠心機を用いる場合はチューブ類が装置の蓋などに接触しない事を確認の上ご使用ください。
- 精製 DNA を分子生物学的操作に用いる場合には、十分に滅菌された容器や滅菌水などを用いてください。

MonoFas® DNA Stool Kit Ver.02

- 本製品は消耗品ですので再使用はできません。
- ご所属の機関の倫理委員会の規定に従い作業してください。また、スピнкаラムの廃棄の際には、遺伝情報が残らないことと、感染症への配慮を考慮してください。

## 6. DNA 抽出プロトコールの簡易フロー

### <糞便の破碎方法について>

破碎ビーズによる物理的な破碎の併用によって、強固な細胞壁を有する微生物（グラム陽性、陰性菌等）からもDNAを抽出することが可能です。なお、破碎ビーズによるDNAの物理的な剪断を避けたい場合には、熱処理法による抽出プロトコールが利用可能です。

本キットでは、プロトコール①には、破碎ビーズを対象とした抽出方法、プロトコール②には、熱処理を対象とした抽出方法、プロトコール③には、簡易抽出を対象とした抽出方法を示す。

### プロトコールの選定基準

- プロトコール① 破碎ビーズ法 : 網羅的にDNAを抽出したい実験系
- プロトコール② 熱処理法 : ロングリードのDNAを抽出したい実験系
- プロトコール③ 簡易抽出法 : 個体由来や細胞膜が比較的柔らかいグラム陽性菌のDNAを抽出したい実験系

### 糞便のサンプルについて

糞便サンプルから直接抽出する場合と糞便懸濁液から抽出する場合があります。

### 糞便懸濁液の作製手順

糞便約1gを50 mLの遠心管に採取し、20倍量の滅菌蒸留水を添加する。その後、ボルテックスミキサー等で均一になるまで攪拌混合後、室温で30分間静置する。

### <遠心加速度と回転数について>

当社のスピнкаラムは通液性に優れているシリカモノリスフィルターを採用しており、汎用の卓上遠心機を用いて、遠心加速度 10,000 × g 未満の設定で使用可能です。しかしながら、10,000 × g 未満の場合、核酸の量や溶液の粘度によって、目詰まりが発生するケースがあります。目詰まりが発生した場合は、必要に応じて遠心加速度を上げる、遠心時間を延長する等の追加遠心を行い、アプライした液体がスピнкаラムに残らないように通液させてください。

### <添加するアルコール類について>

本プロトコールでは、溶液の溶解度を変えるためにアルコール類を添加する方法を採用しております。

この添加するアルコール類は、エタノールまたはイソプロパノールが選択可能です。

イソプロパノールはエタノールより疎水性が高いため、核酸の溶解度が低く、より少ない量で効果を発揮します。

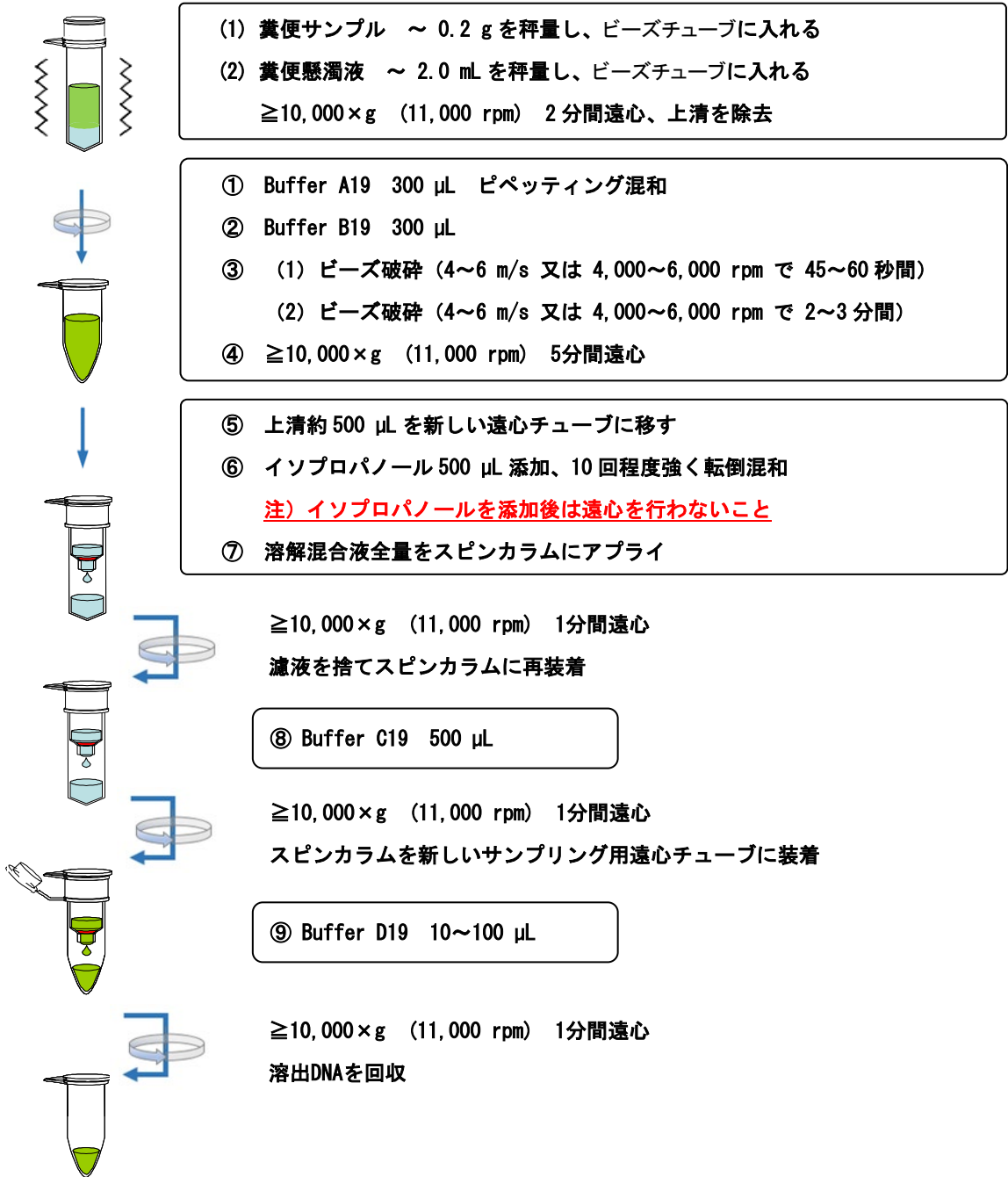
### 選択の基準

回収される DNA 量が多い場合：イソプロパノール選択

回収される DNA 量が少ない場合：エタノールを選択

《プロトコール①破砕ビーズ法での DNA 抽出方法》

糞便サンプルからの抽出方法



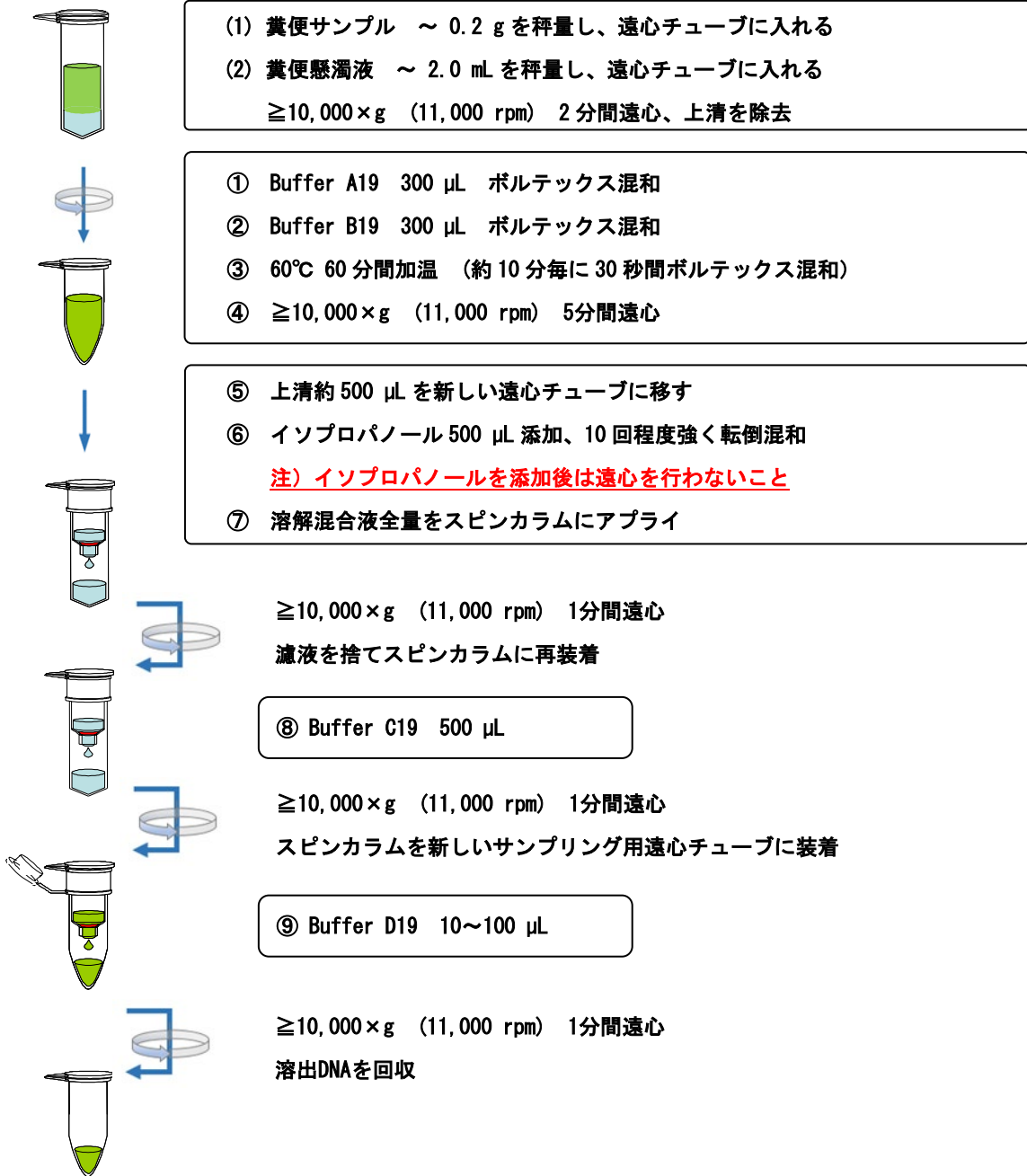
※抽出・精製 DNA は-20°Cで保存してください。

## <詳細プロトコール>

### DNA抽出工程

- (1) 糞便サンプル ~ 0.2 gを秤量し、ビーズチューブに入れる。
- (2) 糞便懸濁液 ~ 2.0 mLを秤量し、ビーズチューブに入れる。  
≥10,000×g (11,000 rpm) 2分間遠心し、上清を除去する。
  - 試料が多すぎた場合、スピнкаラムの目詰まり、回収量減少、精度低下の可能性があります。目詰まりした場合は、量を減らして検討してください。
- ① Buffer A19 300 μLを添加し、ビーズを吸い込まない様にピペッティングを行う。
- ② Buffer B19 300 μLを添加する。
- ③ 糞便サンプルの破碎条件：(1) ビーズ破碎 (4~6 m/s または 4,000~6,000 rpm で 45~60秒間) を行う。  
糞便懸濁液の破碎条件：(2) ビーズ破碎 (4~6 m/s または 4,000~6,000 rpm で 2~3分間) を行う。
  - 蓋のゆるみは、ビーズ破碎中の液漏れの原因となるため、ビーズチューブの蓋がしっかり閉まっていることを確認してください。
- ④ ≥10,000×g (11,000 rpm) 5分間遠心する。
- ⑤ 上清約500 μLを新しい1.5 mL遠心チューブに移す。
- ⑥ イソプロパノールを500 μL添加し、10回程度強く転倒混和する。
  - 混和が不十分なときは、タッピング、ピペッティングあるいは転倒混和などでよく混ぜてください。ライセート完成後は、速やかに抽出操作を行ってください。
  - 糞便試料の水分含量が少ない場合、500 μLの上清を回収できない場合があります。添加するアルコールの液量比 (1:1) を維持してスケールダウンしてください。なお、以降の工程では添加量を変更する必要はありません。
  - 凝集物が出来た場合、再度遠心することなく、凝集物を含めて、すべてスピнкаラムにアプライしてください。
- ⑦ 混合液全量をスピнкаラムにアプライ後、≥10,000×g (11,000 rpm) 1分間遠心する。
  - 遠心後、液がスピнкаラム内に残っている場合、最高速度で再度遠心操作を行ってください。遠心操作で液が完全に通過しない場合は、スピнкаラムの蓋を開けて遠心してください。
- ⑧ 遠心機からスピнкаラムとコレクションチューブを注意深く取り出す。コレクションチューブ内の廃液を捨て、スピнкаラムに再装着する。
- ⑨ スピнкаラムの蓋を開け、Buffer C19を500 μL添加し、≥10,000×g (11,000 rpm) 1分間遠心する。
  - 遠心後 Buffer C19がスピнкаラム内に残っている場合、最高速度で再度遠心操作を行ってください。
  - Buffer C19が残余すると回収率が悪くなる場合がありますので注意してください。また、溶出液に混入すると遺伝子増幅反応を阻害するのでご注意ください。
- ⑩ 遠心機からスピнкаラムとコレクションチューブを注意深く取り出す。廃液の入ったコレクションチューブを廃棄する。
- ⑪ スピнкаラムを新しい1.5 mLサンプリング用遠心チューブに装着後、スピнкаラムの蓋を開け、Buffer D19を10~100 μL、モノリス表面の中央に添加する。その後、≥10,000×g (11,000 rpm) 1分間遠心する。
- ⑫ 遠心機からスピнкаラムとサンプリング用遠心チューブを注意深く取り出し、スピнкаラムを廃棄する。

《プロトコール②熱処理法での DNA 抽出方法》



※抽出・精製 DNA は-20°Cで保存してください。

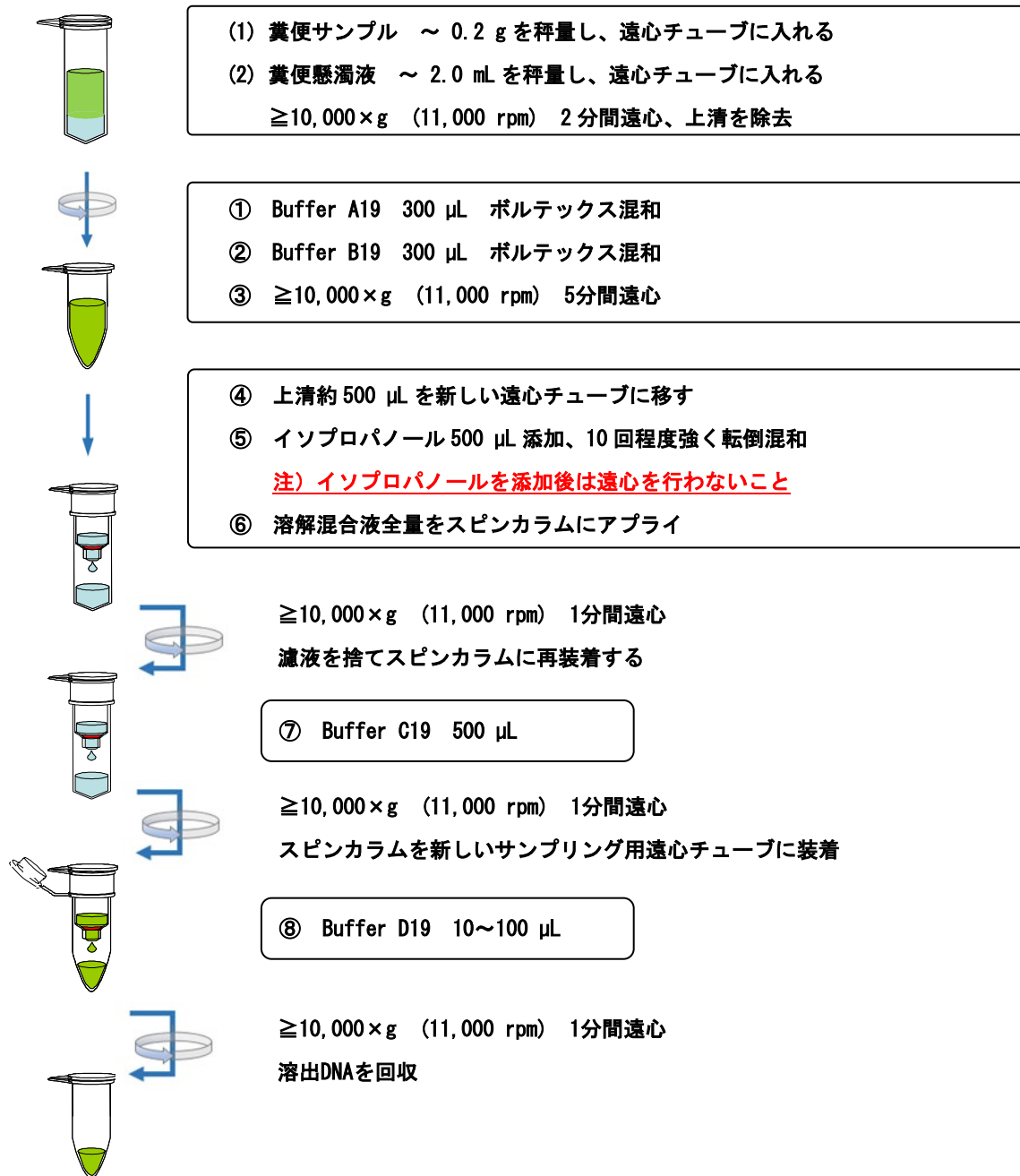


## <詳細プロトコール>

### DNA抽出工程

- (1) 糞便サンプル ~ 0.2 gを秤量し、1.5 又は 2.0 mL遠心チューブに入れる。
- (2) 糞便懸濁液 ~ 2.0 mLを秤量し、1.5 又は 2.0 mL遠心チューブに入れる。  
≥10,000×g (11,000 rpm) 2分間遠心し、上清を除去する。
  - 試料が多すぎた場合、スピncラムの目詰まり、回収量減少、精度低下の可能性があります。目詰まりした場合は、量を減らして検討してください。
- ① Buffer A19 300 µLを添加し、よく攪拌混合（ボルテックス）を行う。
- ② Buffer B19 300 µLを添加し、よく攪拌混合（ボルテックス）を行う。
- ③ 60°Cで60分間インキュベートを行う。10分間毎に30秒間ボルテックスを行う。
  - 試料と試薬の攪拌不十分は低収量の原因となります。10分毎に激しく転倒混和もしくはボルテックスミキサー等でよく混合してください。
- ④ ≥10,000×g (11,000 rpm) 5分間遠心する。
- ⑤ 上清約500 µLを新しい1.5 mL遠心チューブに移す。
- ⑥ イソプロパノールを500 µL添加し、10回程度強く転倒混和する。
  - 混和が不十分なときは、タッピング、ピペッティングあるいは転倒混和などでよく混ぜてください。ライセート完成後は、速やかに抽出操作を行ってください。
  - 糞便試料の水分含量が少ない場合、500 µLの上清を回収できない場合があります。添加するアルコールの液量比（1：1）を維持してスケールダウンしてください。なお、以降の工程では添加量を変更する必要はありません。
  - 凝集物が出来た場合、再度遠心することなく、凝集物を含めて、すべてスピncラムにアプライしてください。
- ⑦ 混合液全量をスピncラムにアプライ後、≥10,000×g (11,000 rpm) 1分間遠心する。
  - 遠心後、液がスピncラム内に残っている場合、最高速度で再度遠心操作を行ってください。遠心操作で液が完全に通過しない場合は、スピncラムの蓋を開けて遠心してください。
- ⑧ 遠心機からスピncラムとコレクションチューブを注意深く取り出す。コレクションチューブ内の廃液を捨て、スピncラムに再装着する。
- ⑨ スピncラムの蓋を開け、Buffer C19を500 µL添加し、≥10,000×g (11,000 rpm) 1分間遠心する。
  - 遠心後 Buffer C19がスピncラム内に残っている場合、最高速度で再度遠心操作を行ってください。
  - Buffer C19が残余すると回収率が悪くなる場合がありますので注意してください。また、溶出液に混入すると遺伝子増幅反応を阻害するのでご注意ください。
- ⑩ 遠心機からスピncラムとコレクションチューブを注意深く取り出す。廃液の入ったコレクションチューブを廃棄する。
- ⑪ スピncラムを新しい1.5 mLサンプリング用遠心チューブに装着後、スピncラムの蓋を開け、Buffer D19を10~100 µL、モノリス表面の中央に添加する。その後、≥10,000×g (11,000 rpm) 1分間遠心する。
- ⑫ 遠心機からスピncラムとサンプリング用遠心チューブを注意深く取り出し、スピncラムを廃棄する。

《プロトコール③簡易抽出法でのDNA抽出方法》



※抽出・精製 DNA は $-20^{\circ}\text{C}$ で保存してください。

## <詳細プロトコール>

### DNA抽出工程

- (1) 糞便サンプル ~ 0.2 gを秤量し、1.5 又は 2.0 mL遠心チューブに入れる。
- (2) 糞便懸濁液 ~ 2.0 mLを秤量し、1.5 又は 2.0 mL遠心チューブに入れる。  
≥10,000×g (11,000 rpm) 2分間遠心し、上清を除去する。
  - 試料が多すぎた場合、スピncラムの目詰まり、回収量減少、精度低下の可能性があります。目詰まりした場合は、量を減らして検討してください。
- ① Buffer A19 300 µLを添加し、よく攪拌混合（ボルテックス）を行う。
- ② Buffer B19 300 µLを添加し、よく攪拌混合（ボルテックス）を行う。
- ③ ≥10,000×g (11,000 rpm) 5分間遠心する。
- ④ 上清約500 µLを新しい1.5 mL遠心チューブに移す。
- ⑤ イソプロパノールを500 µL添加し、10回程度強く転倒混和する。
  - 混和が不十分なときは、タッピング、ピペッティングあるいは転倒混和などでよく混ぜてください。ライセート完成後は、速やかに抽出操作を行ってください。
  - 糞便試料の水分含量が少ない場合、500 µLの上清を回収できない場合があります。添加するアルコールの液量比（1：1）を維持してスケールダウンしてください。なお、以降の工程では添加量を変更する必要はありません。
  - 凝集物が出来た場合、再度遠心することなく、凝集物を含めて、すべてスピncラムにアプライしてください。
- ⑥ 混合液全量をスピncラムにアプライ後、≥10,000×g (11,000 rpm) 1分間遠心する。
  - 遠心後、液がスピncラム内に残っている場合、最高速度で再度遠心操作を行ってください。遠心操作で液が完全に通過しない場合は、スピncラムの蓋を開けて遠心してください。
- ⑦ 遠心機からスピncラムとコレクションチューブを注意深く取り出す。コレクションチューブ内の廃液を捨て、スピncラムに再装着する。
- ⑧ スピncラムの蓋を開け、Buffer C19を500 µL添加し、≥10,000×g (11,000 rpm) 1分間遠心する。
  - 遠心後 Buffer C19がスピncラム内に残っている場合、最高速度で再度遠心操作を行ってください。
  - Buffer C19が残余すると回収率が悪くなる場合がありますので注意してください。また、溶出液に混入すると遺伝子増幅反応を阻害するのでご注意ください。
- ⑨ 遠心機からスピncラムとコレクションチューブを注意深く取り出す。廃液の入ったコレクションチューブを廃棄する。
- ⑩ スピncラムを新しい1.5 mLサンプリング用遠心チューブに装着後、スピncラムの蓋を開け、Buffer D19を10~100 µL、モノリス表面の中央に添加する。その後、≥10,000×g (11,000 rpm) 1分間遠心する。
- ⑪ 遠心機からスピncラムとサンプリング用遠心チューブを注意深く取り出し、スピncラムを廃棄する。

以上で糞便からのDNA抽出は完了です。

注) スピncラムに添加した溶出Buffer D19は、ほぼ全量が回収されます。

注) 回収したDNAをすぐに使用しない場合は、サンプリング用遠心チューブのキャップをしっかりと閉めた

後、-20℃で保存することをお勧めします。

注) 本製品に同封されているBuffer D19は、RNase・DNaseフリー滅菌水に置き換えることが可能です。その場合、pHにより回収率が変動するためアンモニア水などでpH 8.5~9.0に調整してご使用ください。

#### <使用に関する注意事項>

- ① 試薬の容量は抽出プロトコールに記載された量を厳守してください。
- ② コンタミネーションを防ぐために毎回ピペットチップを交換してください。
- ③ 遠心後、遠心機からスピncラムとコレクションチューブを取り外す際は、廃液がスピncラム先端に付着しないよう注意深く取り外してください。付着した場合は軽くスピncダウンを行ってください。
- ④ 遠心機内の温度が上昇するのを防ぐため、遠心機の連続運転は避けてください。
- ⑤ 抽出の途中では時間をおかず、操作は速やかに行ってください。
- ⑥ 感染性のおそれのあるサンプルを使用した場合、廃棄物は感染性産業廃棄物に該当しますので、適切な処理を行ってください。

## 7. 保存及びその他の注意

- 室温（15℃ ~ 25℃）で保存してください。
- 洗浄液には、揮発性の高いエタノールが含まれています。ご使用後は、蒸発を防ぐために必ず蓋を閉めてください。
- MonoFas® 抽出・精製キットは厳しい品質管理のもとで製造、検査、包装、出荷しておりますが、万一不具合がありましたら弊社までご連絡ください。
- 本製品は糞便からのDNA抽出・精製の目的で製造しております。それ以外の目的での使用および本取扱説明書に基づかない方法では使用しないでください。
- 本試薬キットを使用前に、安全データシート（SDS）の記載内容を一読ください。
  - 安全データシート（SDS）の（URL <http://www.animos.co.jp>）よりダウンロードして入手願います。
- 余ったBufferの廃棄方法は、安全データシート（SDS）に記載された通り廃棄ください。

## 8. 保証期間

- 各種Bufferの保証期間は未開封、室温保存で購入後1年間です。  
各種Bufferが追加で必要な際には、最寄りの支店または営業所までご連絡ください。

ゾルーゲル法によるシリカモノリスは、国立大学法人京都大学 曾我直弘先生、中西和樹先生により開発されました。この技術と、ジーエルサイエンス株式会社が所有する製品商標及び特許のライセンスを受けて、MonoFas® シリーズ製品を株式会社アニモスが開発・製造しています。

お問い合わせ先：株式会社アニモス

〒333-0844 埼玉県川口市上青木 3-12-18

TEL：048-606-2892 FAX：048-611-7192 E-mail：monofas@animos.co.jp

MonoFas® DNA Stool Kit Ver.02