

MonoFas[®]

研究用試薬キット

レジオネラ属菌 DNA 抽出キット
（レジオネラ迅速検査法対応）

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 [®] スピнка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	- 8 -
8. 保証期間	- 8 -

1. 製品説明

MonoFas[®] レジオネラ属菌 DNA 抽出キットをお買い上げ頂きありがとうございます。

本製品は、『第3版 レジオネラ症防止指針（2009）』迅速検査法に対応したゲノム DNA 精製用キットです。迅速検査法（遺伝子検査法）は、培養法と比較して検査時間が大幅に短縮されます。そのため、集団感染事例をはじめとする、感染源を特定するためのスクリーニングや、施設の営業停止後の再開の決定に効果的です。ただし遺伝子検査法は、培養法による検査を補助する検査方法としての利用をお勧めします。

本製品の特長は下記となります。

- ① 均一な連続孔を持つ“シリカモノリス”カラムを用いるため、通液性が良く微量溶出（～50μL）が可能
- ② 温泉水中等の地下水にしばしば混入するフミン質やフミン酸などの PCR 増幅反応の阻害物質が除去可能
- ③ エタノール以外の DNA 抽出・精製工程に用いる試薬をすべてご用意

性能を十分に発揮させるために本取扱説明書をよくお読みのうえ正しくお使いください。

『第3版 レジオネラ症防止指針（2009）』のレジオネラ迅速検査法もご参考ください。

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.	A02-0202
回数	50
スピнкаラム	50本×1袋
Buffer A2（溶解）	5 mL
Buffer B2（変性・吸着）	11 mL
Buffer C2（洗浄①）	17 mL
Buffer D2（洗浄②）*	17 mL
Buffer D2（溶出）*	6 mL
Proteinase K（20 mg/mL）	0.5 mL

*Buffer D2は、10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA (Free) (pH 8.5)です。

3. 製品仕様

	レジオネラ属菌からの DNA 抽出
原理	シリカモノリス法
操作時間	～35分
最大 DNA 結合量	～50 μg
推奨処理量	～0.2 g
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（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
- 10 mL 試験管
- 直径47mm、孔径0.22 μmまたは0.45 μmのメンブラン・フィルター
- フードミル（カッターミル等）
- 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ラ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。

MonoFas® レジオネラ属菌 DNA 抽出キット

- 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。
- 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

<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。

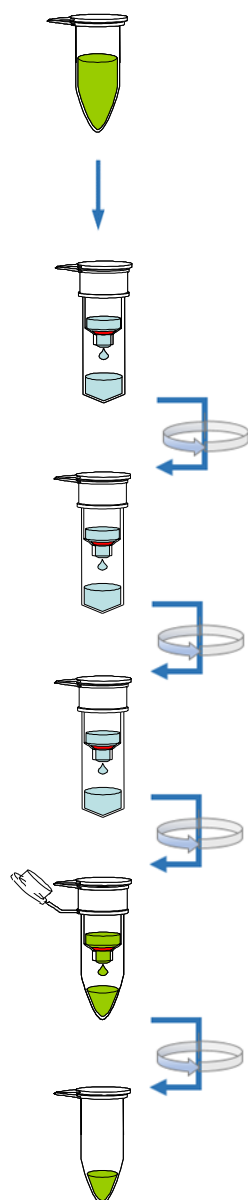
《実験を始める前に》

- ① 試薬・試料の汚染を防ぐために、手袋、マスク、白衣等を着用してください。
- ② 特に断りが無い限り、試料水は冷蔵条件で扱ってください。

《試料水の濃縮》

- ① 試料水 500mL を吸引ろ過する
 - (注) 直径 47mm、孔径 0.22μm または 0.45μm のメンブラン・フィルターを使用する
 - 必要により、ろ過操作等は安全キャビネット内で操作する
- ② フィルターを 5mL の滅菌蒸留水にひたし、試験管ミキサーで 1 分間攪拌し、5mL に濃縮する (100 倍濃縮)
- ③ 濃縮液 5mL のうち 2mL を、2mL 用微量遠心チューブにとる
- ④ 遠心分離する (20,000×g, 5 分間, 4℃)
- ⑤ 1.9mL の上澄みを除去し、100 μL の沈渣を得る
 - (注) 沈渣量が多い場合は数本に分割し、核酸抽出を行う
- ⑥ 100 μL の沈渣に 90 μL の Buffer A を添加混和する
- ⑦ Proteinase K を 10 μL 添加し、65℃で 20~30 分間溶解反応を行う
 - (注) 夾雑物が多い場合や作業の都合によって一晩まで反応時間を延長してもよい
 - ただし核酸分解酵素が働かないように、65℃の温度条件は保った状態がよい
- ⑧ 75℃で 5 分間加温し、直ちにミキサーで激しく攪拌する
 - (注) この操作により、細胞の溶解促進と核酸のせん断を行う
- ⑨ 遠心分離し (20,000×g, 3 分間)、上清 (160~180 μL) を新しい遠心チューブに移す
 - (注) この際、沈殿物を新しいチューブに混入させないようにする
 - この分離操作により、褐色の温泉試料からも試験が可能となる

《DNAの抽出》



新しい遠心チューブに試料水の濃縮工程⑨の上清液全量を移す

- ① Buffer B2 200 μ L ポルテックス混和
- ② エタノール 200 μ L 10回程度強く転倒混和

注) エタノールを添加後は遠心を行わないこと

- ③ 溶解混合液全量をスピncラムにアプライ

$\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心

濾液を捨てスピncラムに再装着

- ⑤ Buffer C2 300 μ L

$\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心

濾液を捨てスピncラムに再装着

- ⑥ Buffer D2 300 μ L

$\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心

スピncラムを新しいサンプリング用遠心チューブに装着

- ⑥ Buffer E2 20 μ L

$\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心

溶出DNAを回収

※抽出・精製 DNA は -20°C で保存してください。

＜注意事項＞

DNA抽出工程

1.5 又は 2.0 mL遠心チューブに⑨工程の上清液全量を移す。

- 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 B2 200 μ Lを添加し、よく攪拌混合（ポルテックス）を行う。
 - ② エタノールを200 μ L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。

Monofas[®] レジオネラ属菌 DNA 抽出キット

- 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。
- ③ 混合液全量をスピncラムにアプライ後、 $\geq 10,000 \times g$ (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。
- ④ 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。
- ⑤ スピncラムの蓋を開け、Buffer C2を300 μL 添加し、 $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心する。
 - 遠心後 Buffer 22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。
- ⑥ 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。
- ⑦ スピncラムの蓋を開け、Buffer D2を300 μL 添加し、 $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心する。
 - 遠心後 Buffer D2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 D2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。
- 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。廃液の入ったコレクションチューブを廃棄する。
- ⑨ 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 D2を20 μL 、モノリス表面の中央に添加する。その後、 $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心する。
- ⑩ 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。

以上でレジオネラ属菌からのDNA抽出は完了です。

注) スピncラムに添加した溶出Buffer D2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°C 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 D2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。

MonoFas[®] レジオネラ属菌 DNA 抽出キット

7. 保存及びその他の注意

- 室温（15℃ ～ 25℃）で保存してください。
- 酵素（Proteinase K）は室温保管が可能ですが、開封後は冷蔵保管（2～8℃）を推奨します。
- 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。
- 本製品はレジオネラ属菌からの 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）の記載内容をご一読ください。
 - 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