

MonoFas[®]

研究用試薬キット

DNA Buccal Swabs Kit

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	- 12 -
8. 保証期間	- 12 -

1. 製品説明

MonoFas® DNA Buccal Swabs Kitは、口腔内の様々なサンプル（スワブ、唾液、喀痰など）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、様々なサンプルの採集方法に合わせた専用プロトコールを適用して頂くことで高純度DNAを短時間で抽出が可能です。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.	A20-0001	A20-0002	A20-0003	A20-0004
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 A20（溶解）	9 mL	17 mL	33 mL	83 mL
Buffer B20（変性・吸着）	9 mL	17 mL	33 mL	83 mL
Buffer C20（洗浄）	14 mL	28 mL	55 mL	138 mL
Buffer D20（溶出）*	6 mL	6 mL	11 mL	28 mL

酵素(Proteinase K)セット

Cat. No.	A20-0201	A20-0202	A20-0203	A20-0204
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 A20（溶解）	9 mL	17 mL	33 mL	83 mL
Buffer B20（変性・吸着）	9 mL	17 mL	33 mL	83 mL
Buffer C20（洗浄）	14 mL	28 mL	55 mL	138 mL
Buffer D20（溶出）*	6 mL	6 mL	11 mL	28 mL
Proteinase K (20mg/mL)	0.5 mL	1.0 mL	2.0 mL	5.0 mL

* 冬季になると Buffer A20 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 D20 は、10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA (Free) (pH 8.5) です。

3. 製品仕様

	Buccal Swab からの DNA 抽出
原理	シリカモノリス法
操作時間	～30分
推奨処理量	サンプル採集方法による
溶出量	10～100 μL
DNA の純度(A260/A280)	1.7～2.3
DNA の純度(A260/A230)	1.7～2.3

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
- 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。
- 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

MonoFas® DNA Stool Kit Ver.02

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

<口腔内サンプルについて>

口腔内から採取されるサンプル（スワブ、唾液、喀痰など）に合わせた専用プロトコールを選択頂くことで、高純度DNAを回収することが可能です。

本キットでは、プロトコール①には、粘性の低いサンプルを対象にした簡易抽出法、プロトコール②には、様々なサンプルに対応した標準抽出法、プロトコール③には、高粘度サンプルを対象にした高純度・高収量抽出法を示す。

プロトコールの選定基準

- | | |
|----------------|------------------------|
| プロトコール① 簡易抽出法 | : 保存上清液、唾液（粘性の低いサンプル） |
| プロトコール② 標準抽出法 | : 保存上清液、喀痰、唾液、Swabサンプル |
| プロトコール③ 高純度抽出法 | : 粘度が高い、夾雑物が多いサンプル |

プロトコール②で高純度のDNAが得られない場合は、プロトコール③でDNA抽出をお試しください。

尚、本キットを利用して、口腔スワブと同様に鼻腔スワブは鼻咽頭スワブからもDNA抽出が可能です。

<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場合があります。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。

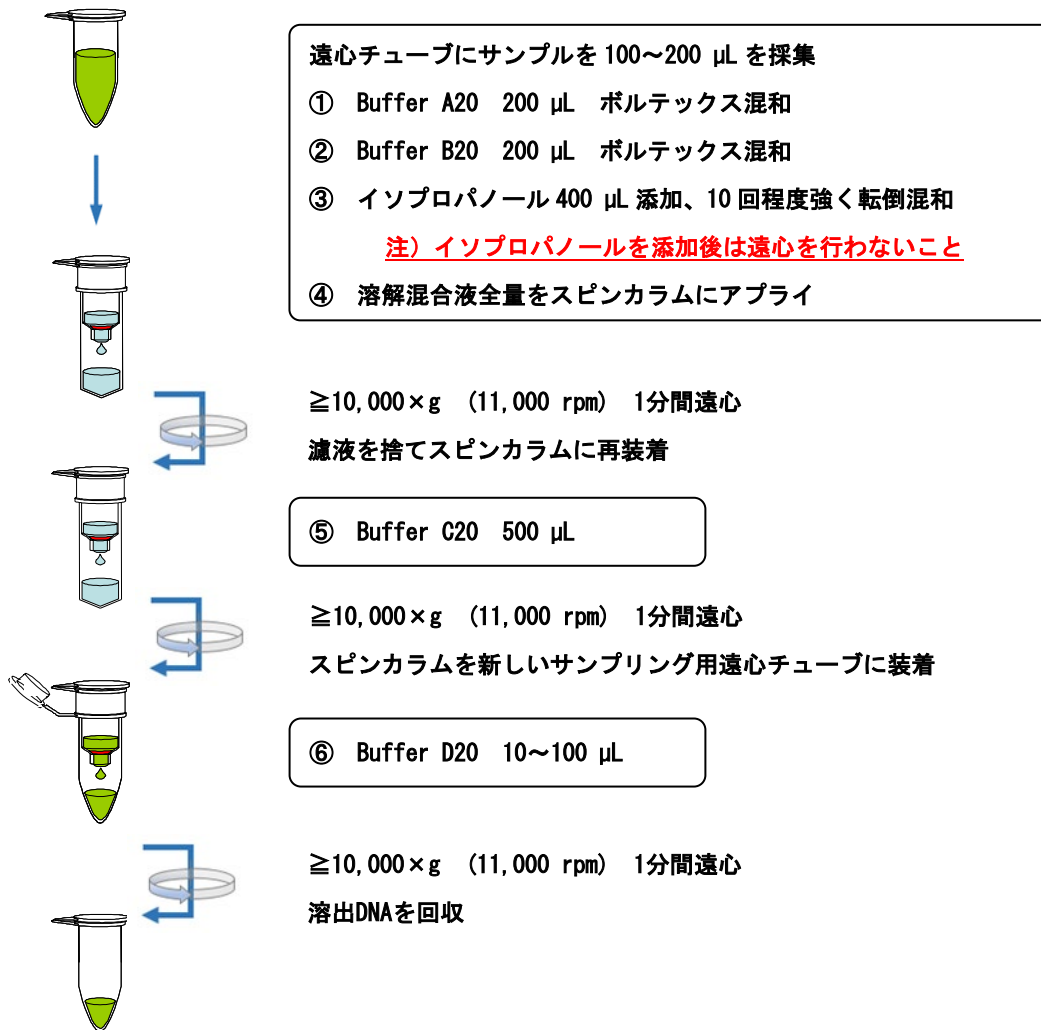
選択の基準

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簡易 DNA 抽出方法》

保存上清液、唾液（粘性の低いサンプル）



※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>

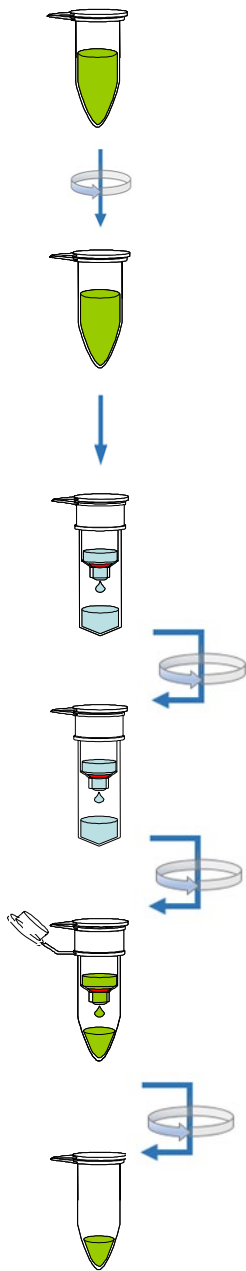
DNA抽出工程

1.5 又は 2.0 mL遠心チューブにサンプルを100~200 μ Lを採集する。

- 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 A20 200 μ Lを添加し、よく攪拌混合（ボルテックス）を行う。
 - ② Buffer B20 200 μ Lを添加し、よく攪拌混合（ボルテックス）を行う。
 - ③ イソプロパノールを400 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。
 - 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。
 - ④ 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。
 - ⑤ 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。
 - ⑥ スピncラムの蓋を開け、Buffer C20を500 μ L添加し、 $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心する。
 - 遠心後 Buffer C20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 C20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。
 - 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。廃液の入ったコレクションチューブを廃棄する。
 - ⑧ 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 D20を10~100 μ L、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。
 - ⑨ 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②標準 DNA 抽出方法》

保存上清液、喀痰、唾液、Swab サンプル



- ① 遠心チューブに滅菌又は精製水 1.0mL を秤量
 - ② 試料 ~500 μ L を採集
 - ③ $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 2分間遠心後上清を除去
 - ④ Buffer A20 180 μ L + Proteinase K 20 μ L ボルテックス混和
 - ⑤ 70°C 10分間加温 (約2分毎に10秒間ボルテックス混和)
 - ⑥ Buffer B20 200 μ L ボルテックス混和
 - ⑦ イソプロパノール 400 μ L 添加、10回程度強く転倒混和
- 注) イソプロパノールを添加後は遠心を行わないこと**
- ⑧ 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
濾液を捨てカラムに再装着

⑨ Buffer C20 500 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

⑩ Buffer D20 10~100 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。

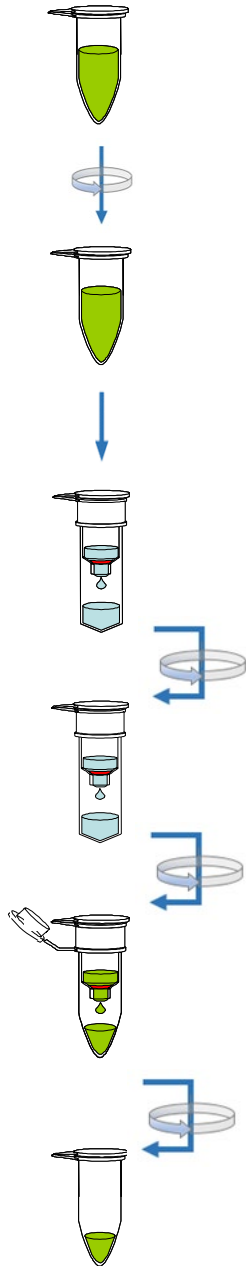
<詳細プロトコール>

DNA抽出工程

- ① 1.5 又は 2.0 mL遠心チューブに滅菌又は精製水1.0 mLに秤量する。
- ② 秤量した滅菌又は精製水にサンプル ~500 μ L を採集する。
 - スワブは、遠心チューブ側面に強く擦り付けるようにしてサンプルを採取してください。
 - 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。
- ③ $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 2分間遠心後上清を除去する。
- ④ Buffer A20 180 μ Lを添加し、Proteinase K (20 mg/mL) を20 μ L入れ、攪拌混合（ボルテックス）を行う。
- ⑤ 70°Cで10分間インキュベートを行う。2分間毎に10秒間攪拌混合（ボルテックス）を行う。
- ⑥ Buffer B20 200 μ Lを添加し、よく攪拌混合（ボルテックス）を行う。
- ⑦ イソプロパノールを400 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。
 - 凝集物が出来た場合、追加遠心することなく、凝集物を含めすべてカラムに添加してください。
- ⑧ 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。
- 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。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。
- ⑩ スピncラムの蓋を開け、Buffer C20を500 μ L添加し、 $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心する。
 - 遠心後 Buffer C20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 C20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。
- ⑪ 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
- ⑫ 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 D20を10~100 μ L、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。
- ⑬ 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高純度抽出法 DNA 抽出方法》

粘度が高い、夾雑物が多いサンプル



- ① 遠心チューブにサンプル～500 μL を秤量
- ② Buffer A20 280 μL + Proteinase K 20 μL ボルテックス混和
- ③ 70°C 20 分間加温 (約 5 分毎に 30 秒間ボルテックス混和)
- ④ Buffer B20 300 μL ボルテックス混和
- ⑤ $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 2 分間遠心
- ⑥ 上清約 500 μL を新しい遠心チューブに移す
- ⑦ イソプロパノール 500 μL 添加、10 回程度強く転倒混和
注) イソプロパノールを添加後は遠心を行わないこと
- ⑧ 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

⑨ Buffer C20 500 μL

$\geq 10,000 \times g$ (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

⑩ Buffer D20 10～100 μL

$\geq 10,000 \times g$ (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。

<詳細プロトコール>

DNA抽出工程

- ① 1.5 又は 2.0 mL遠心チューブにサンプル ~500 μ Lを秤量する。
 - 粘性が高い喀痰については、喀痰に対して容量で1~3倍量のPBS(-)を加えボルテックスミキサーおよび激しい転倒混和により懸濁し、その懸濁を使用してください。
 - 試料が多すぎた場合、カラムの目詰まり、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。
- ② Buffer A20 280 μ Lを添加し、Proteinase K (20 mg/mL) を20 μ L入れ、攪拌混合（ボルテックス）を行う。
- ③ 70°Cで20分間インキュベートを行う。5分間毎に30秒間攪拌混合（ボルテックス）を行う。
- ④ Buffer B20 300 μ Lを添加し、よく攪拌混合（ボルテックス）を行う。
- ⑤ $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 2分間遠心する。
- ⑥ 上清約 500 μ L を新しい 1.5 又は 2.0 mL 遠心チューブに移す。
- ⑦ イソプロパノールを500 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。
 - 試料の水分含量が少ない場合、500 μ L 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、追加遠心することなく、凝集物を含めすべてカラムに添加してください。
- ⑧ 混合液全量をスピнка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。
- ⑨ 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。
- ⑩ スピнкаラムの蓋を開け、Buffer C20を500 μ L添加し、 $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心する。
 - 遠心後 Buffer C20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 C20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。
- ⑪ 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
- ⑫ 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 D20を10~100 μ L、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。
- ⑬ 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。

以上で口腔内サンプルからのDNA抽出は完了です。

注) スピнкаラムに添加した溶出Buffer D20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 D20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。
- 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。
- 本製品は口腔内サンプルからの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

MonoFas® DNA Stool Kit Ver.02