

Monofas[®]

研究用試薬キット

DNA Plant 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	- 3 -
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	- 13 -
8. 保証期間	- 13 -

1. 製品説明

MonoFas® DNA Stool Kit Ver.02 は、植物の葉から 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。植物は非常に多種類であり、PCR 阻害となるポリカサッカライド（多糖類）、ポリフェノール、2 次代謝産物、酸性物質などの物質を含んでいます。本キットでは、破碎ビーズに前処理と組合せることで、CTAB、フェノール、クロロホルム抽出などの面倒な処理をせずに多種多様な植物から高純度 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.	A21-0001	A21-0002	A21-0003	A21-0004
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 A21 (溶解)	9 mL	17 mL	33 mL	83 mL
Buffer B21 (変性・吸着)	9 mL	17 mL	33 mL	83 mL
Buffer C21 (洗浄)	14 mL	28 mL	55 mL	138 mL
Buffer D21 (溶出)*	6 mL	6 mL	11 mL	28 mL

* 冬季になると Buffer A21 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 D21 は、10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA (Free) (pH 8.5) です。

3. 製品仕様

	植物の葉からの DNA 抽出
原理	シリカモノリス法
操作時間	~ 20 分
推奨処理量	未処理 ~ 0.2 g 粉末化済 ~ 0.1 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 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
- ペッサル (※)
- 遠心機 ※
- 恒温槽：ドライバス 又は ウォーターバス (70°C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 ($\times g$) 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 ($\times g$) 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°C以下、20分以内
乾燥条件：真空化 100°C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

<植物の前処理方法について>

植物は非常に多種類であり、PCR阻害となるポリカサッカライド（多糖類）、ポリフェノール、2次代謝産物、酸性物質などの物質を含んでいます。高純度DNAを得るためには、適切な前処理を選定する必要があります。

植物サンプルの粉末化

(1) 乾燥磨砕

- ① 植物サンプルを滅菌水で満たした50 mL遠心管内に入れ、ボルテックスを用いてよく洗浄する。この洗浄操作を3回繰り返す。
- ② 試料をキムタオル上に均一に広げ、65°Cに設定した乾燥機で3時間乾燥させる。
- ③ 乾燥したサンプルを-80°Cの冷凍庫で冷却した乳鉢と乳棒を用いて粉状になるまで磨砕する。
※ 乳鉢と乳棒は冷却した状態で使用した方が、磨砕で発生する発熱による植物組織へのダメージを抑えることができます。

(2) 凍結磨砕

- ① 植物サンプルを滅菌水で満たした50 mL遠心管内に入れ、ボルテックスを用いてよく洗浄する。この洗浄操作を3回繰り返す。
- ② 洗浄後サンプル表面の水分をキムタオル等でよく取り除き、液体窒素で凍結させる。液体窒素の代わりにサンプルを5 mm角に刻んで-80 °Cの冷凍庫に20分静置し凍結させる。
- ③ 凍結したサンプルを-80°Cの冷凍庫で冷却した乳鉢と乳棒を用いて粉状になるまで磨砕する。
※ 乳鉢と乳棒は冷却した状態で使用した方が、磨砕で発生する発熱による植物組織へのダメージを抑えることができます。

本キットでは、プロトコール①には、標準抽出方法、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、破砕ビーズ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 標準抽出法 | : 植物の葉全般 |
| プロトコール② 熱処理法 | : 硬い葉や粘性物質の除去が困難な葉 |
| プロトコール③ 破砕ビーズ法 | : 硬い細胞壁を持つ葉 |

葉以外の茎、根などの部位についても適切な前処理を行った上で、プロトコール①~③を利用してDNA抽出することが可能です。

・破砕ビーズについて

植物の場合は組織によって硬さが異なるため、サンプルの種類にあったビーズで選定ことが重要です。破砕ビーズの材質は、ガラス、ジルコニア（セラミック）、ステンレスがあり、直径が同じ場合、破砕力はガラス<セラミック<ステンレスとなります。粒子径が大きいビーズの方が破砕力は高いですが、微小なサンプルの破砕には粒子径の小さなビーズが適しています。

<遠心加速度と回転数について>

当社のスピナ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ニングカ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。

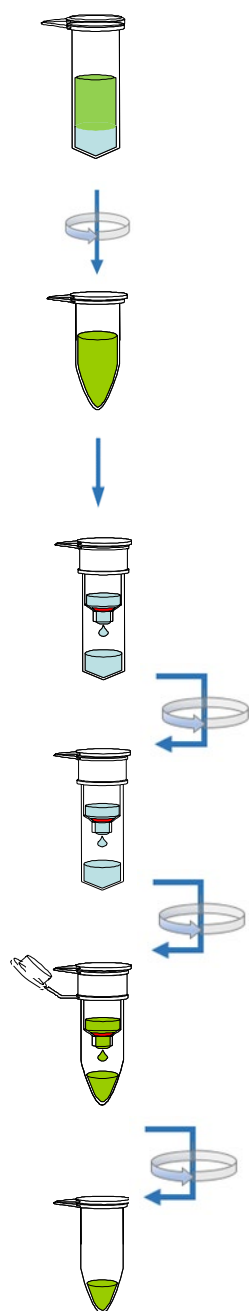
イソプロパノールはエタノールより疎水性が高いため、核酸の溶解度が低く、より少ない量で効果を発揮します。

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標準抽出法での DNA 抽出方法》



遠心チューブにサンプルを秤量

- (1) 新鮮な葉をハサミで細断したサンプル：～ 200 mg
- (2) 粉碎したサンプル：～ 100 mg

① Buffer A21 300 μ L ボルテックス混和

細断したサンプルは、必要に応じてペッスルですり潰すこと

② Buffer B21 300 μ L ボルテックス混和

③ $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 5分間遠心

④ 上清約 500 μ L を新しい遠心チューブに移す

⑤ イソプロパノール 500 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

⑥ 溶解混合液全量をスピнка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нкаラムに再装着

⑦ Buffer C21 500 μ L

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

スピнкаラムを新しいサンプリング用遠心チューブに装着

⑧ Buffer D21 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。

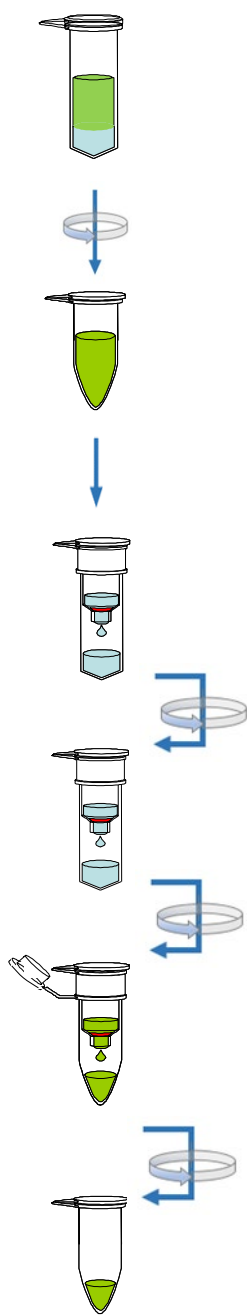
<詳細プロトコール>

DNA抽出工程

1.5 又は 2.0 mL遠心チューブにサンプルを秤量する。

- (1) 新鮮な葉をハサミで細断したサンプル：～ 200 mg
- (2) 粉碎したサンプル：～ 100 mg
 - 試料量が多すぎた場合、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 A21 300 μ Lを添加し、よく攪拌混合（ボルテックス）を行う。
 - 細断したサンプルは、懸濁液中に試料の塊が残っていると収量は低くなるので、ペッスルで念入りにすり潰しから、ボルテックスを行う。
- ② Buffer B21 300 μ Lを添加し、よく攪拌混合（ボルテックス）を行う。
- ③ $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 5分間遠心する。
- ④ 上清約500 μ L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 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。
 - 糞便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、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。
- ⑥ 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。
- ⑦ 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。
- ⑧ スピнкаラムの蓋を開け、Buffer C21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 C21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 C21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。
- ⑩ 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 D21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。
- ⑪ 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》



遠心チューブにサンプルを秤量する

- (1) 新鮮な葉をハサミで細断したサンプル：～ 200 mg
- (2) 粉碎したサンプル：～ 100 mg

④ Buffer A21 300 μ L ボルテックス混和

細断したサンプルは、必要に応じてペッスルですり潰すこと

⑤ 70 $^{\circ}$ C 10 分間加温 (約 2 分毎に 10 秒間ボルテックス混和)

⑥ Buffer B21 300 μ L ボルテックス混和

⑦ $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 5 分間遠心

⑦ 上清約 500 μ L を新しい遠心チューブに移す

⑧ イソプロパノール 500 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

⑨ 溶解混合液全量をスピнка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нкаラムに再装着

⑩ Buffer C21 500 μ L

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

スピнкаラムを新しいサンプリング用遠心チューブに装着

⑪ Buffer D21 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。

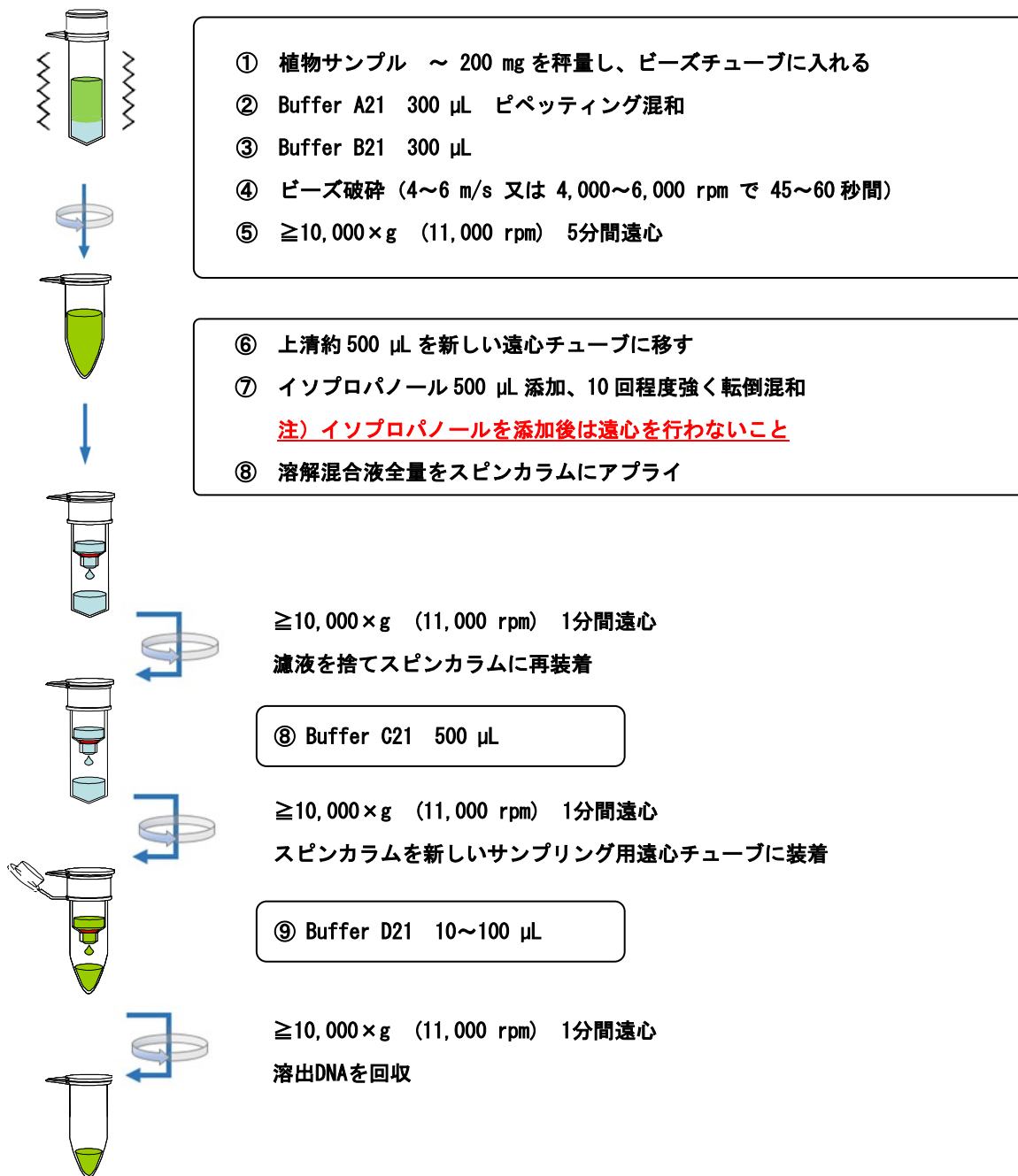
<詳細プロトコール>

DNA抽出工程

1.5 mL遠心チューブにサンプルを秤量する。

- (1) 新鮮な葉をハサミで細断したサンプル：～ 200 mg
- (2) 粉碎したサンプル：～ 100 mg
 - サンプル量が多すぎた場合、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 A21 300 μ Lを添加し、よく攪拌混合（ボルテックス）を行う。
 - 細断したサンプルは、懸濁液中に試料の塊が残っていると収量は低くなるので、ペッスルで念入りにすり潰しから、ボルテックスを行う。
- ② 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。
- ③ Buffer B21 300 μ Lを添加し、よく攪拌混合（ボルテックス）を行う。
- ④ $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 5分間遠心する。
- ⑤ 上清約500 μ Lを新しい1.5 mL遠心チューブに移す。
 - サンプルによっては、500 μ Lの上清を回収できない場合があります。その場合は、ステップ⑥で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、ステップ⑦以降は添加量を変更する必要はありません。
- ⑥ 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。
 - 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。
 - 上清が400 μ Lの場合、イソプロパノールは400 μ L添加します。
- ⑦ 混合液をスピнкаラムに全量添加し、 $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心する。
- ⑧ 遠心機からスピнкаラムと廃液容器を注意深く取り出します。コレクションチューブ内の廃液を捨て、スピнкаラムに再装着してください。
 - 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下さい。
- ⑨ スピнкаラムの蓋を開け、Buffer C21を500 μ L添加し、 $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心する。
- ⑩ 遠心機からカラムと廃液容器を注意深く取り出します。廃液の入った容器を捨ててください。
 - 遠心後 Buffer C21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 C21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 スピнкаラムを1.5 mLサンプリグチューブにのせかえます。スピнкаラムの蓋を開け、Buffer D21を10～100 μ L、モノリス表面の中央に添加してください。その後 $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心する。
- ⑫ 遠心機からスピнкаラムとサンプリグチューブを注意深く取り出し、カラムを捨てます。

《プロトコール③破砕ビーズ法での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 植物サンプル ~ 0.2 gを秤量し、ビーズチューブに入れる。
 - 試料量が多すぎた場合、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。
- ② Buffer A21 300 μ L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。
- ③ Buffer B21 300 μ Lを添加する
- ④ 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。
 - 植物組織の硬さに合わせ最適な破碎ビーズを用いて破碎を行ってください。
 - 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。
- ⑤ $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 5分間遠心する。
- ⑥ 上清約500 μ Lを新しい1.5 mL遠心チューブに移す。
 - サンプルによっては、500 μ Lの上清を回収できない場合があります。その場合は、ステップ⑥で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、ステップ⑦以降は添加量を変更する必要はありません。
- 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。
 - 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。
 - 上清が400 μ Lの場合、イソプロパノールは400 μ L添加します。
- ⑧ 混合液をスピнкаラムに全量添加し、 $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心する。
- ⑨ 遠心機からスピнкаラムと廃液容器を注意深く取り出します。コレクションチューブ内の廃液を捨て、スピнкаラムに再装着してください。
 - 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下さい。
- ⑩ スピнкаラムの蓋を開け、Buffer C21を500 μ L添加し、 $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心する。
- ⑪ 遠心機からカラムと廃液容器を注意深く取り出します。廃液の入った容器を捨ててください。
 - 遠心後 Buffer C21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 C21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。
- ⑫ スピнкаラムを1.5 mLサンプリングチューブにのせかえます。スピнкаラムの蓋を開け、Buffer D21を10~100 μ L、モノリス表面の中央に添加してください。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チューブを注意深く取り出し、カラムを捨てます。

以上で植物からのDNA抽出は完了です。

注) スピнкаラムに添加した溶出Buffer D21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、回収容器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 D21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）の記載内容をよく読んでください。
 - 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