

MonoFas[®]

研究用試薬キット

バクテリアゲノム DNA 抽出キット VII

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. 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	- 7 -
8. 保証期間	- 8 -

1. 製品説明

MonoFas® シリーズ製品バクテリアゲノム DNA 抽出キット VII をお買い上げ頂きありがとうございます。

本製品は均一な連続孔を持つフィルター型シリカモノリスを固定したモノリス固相カラムで、DNA がシリカに吸着する特性を利用して、グラム陰性菌やグラム陽性菌の培養液から高純度なゲノム DNA の抽出・精製を行うことができます。遠心法を用いて簡単に回収できるので、シンプルな操作でゲノム DNA を精製することができ、得られたゲノム DNA は、そのまま解析などに使用できます。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。

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。

(1) 酵素無し

Cat. No.	A07-0001	A07-0002	A07-0003	A07-0004
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 AP7 (細胞消化) ※1	6 mL	11 mL	22 mL	55 mL
Buffer A7 (細胞消化)	6 mL	11 mL	22 mL	55 mL
Buffer B7 (細胞溶解・吸着) ※1	6 mL	11 mL	22 mL	55 mL
Buffer C7 (洗浄 1)	9 mL	17 mL	33 mL	83 mL
Buffer D7 (洗浄 2)	9 mL	17 mL	33 mL	83 mL
Buffer E7 (溶出)	6 mL	6 mL	11 mL	28 mL

(2) 酵素付

Cat. No.	A07-0301	A07-0302	A07-0303	A07-0304
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 AP7 (細胞消化) ※1	6 mL	11 mL	22 mL	55 mL
Buffer A7 (細胞消化)	6 mL	11 mL	22 mL	55 mL
Buffer B7 (細胞溶解・吸着) ※1	6 mL	11 mL	22 mL	55 mL
Buffer C7 (洗浄 1)	9 mL	17 mL	33 mL	83 mL
Buffer D7 (洗浄 2)	9 mL	17 mL	33 mL	83 mL
Buffer E7 (溶出)	6 mL	6 mL	11 mL	28 mL
Proteinase K 20mg/mL	0.25 mL	0.5 mL	1 mL	2.5 mL
RNase A 20mg/mL	50 µL	100 µL	200 µL	500 µL

* 溶出液を回収するチューブは付属しておりません。別途 1.5 mL~2.0 mL の遠心チューブを用意して下さい。

* Buffer E7 は、10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA (Free) (pH 8.5)です。

*1 Buffer AP7 Buffer B7 の析出有無を確認してください。析出している場合は、約 40°C に温め攪拌溶解してください。

MonoFas® バクテリアゲノム DNA 抽出キット VII

3. 製品仕様

菌類	グラム陰性菌	グラム陽性菌
OD 値	0.6~0.7	0.4~0.5
処理量	250 μ L	600 μ L
DNA 収量	~8.0 μ g	~6.0 μ g
DNA 収量純度	~1.8	~1.7
操作時間	30 分間	38 分間
溶出量	20~100 μ L	20~100 μ L

4. 必要な試薬及び器具

- ① MonoFas[®] バクテリアゲノム DNA 抽出キット VII
- ② Proteinase K (20mg/mL)
- ③ RNase A (20mg/mL)
- ④ エタノール(特級)
- ⑤ 1.5mL 遠心チューブ
- ⑥ 高速マイクロ遠心機(20,000 \times g (15,000 rpm)の遠心が可能なもの)*
- ⑦ ドライバスと 1.5mL チューブ用ヒートブロックまたはウォーターバス(70°Cで使用可能なもの)
- ⑧ ボルテックスミキサー(2,500 rpm 程度の攪拌ができるもの)
- ⑨ マイクロピペット、マイクロピペット用チップ

* 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。

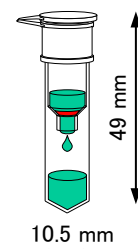
基本計算式

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

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

5. カラム使用上の注意事項

- MonoFas[®] 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。
- Buffer の保証期間は未開封、室温保存で購入日より1年間です。
- すべての工程は遠心操作で行ってください。
- オートクレーブ処理を行う場合には 110°C以下、20 分以内で行ってください。
- MonoFas[®] スピнкаラムは従来のタイプ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。サイズは右図をご参照下さい。
- 遠心操作時はチューブの蓋を開けた状態で使用してください。蓋を閉めた状態では、スピнкаラム内が陰圧になるためスムーズに通液されません。
- 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。



MonoFas[®] バクテリアゲノム DNA 抽出キット VII

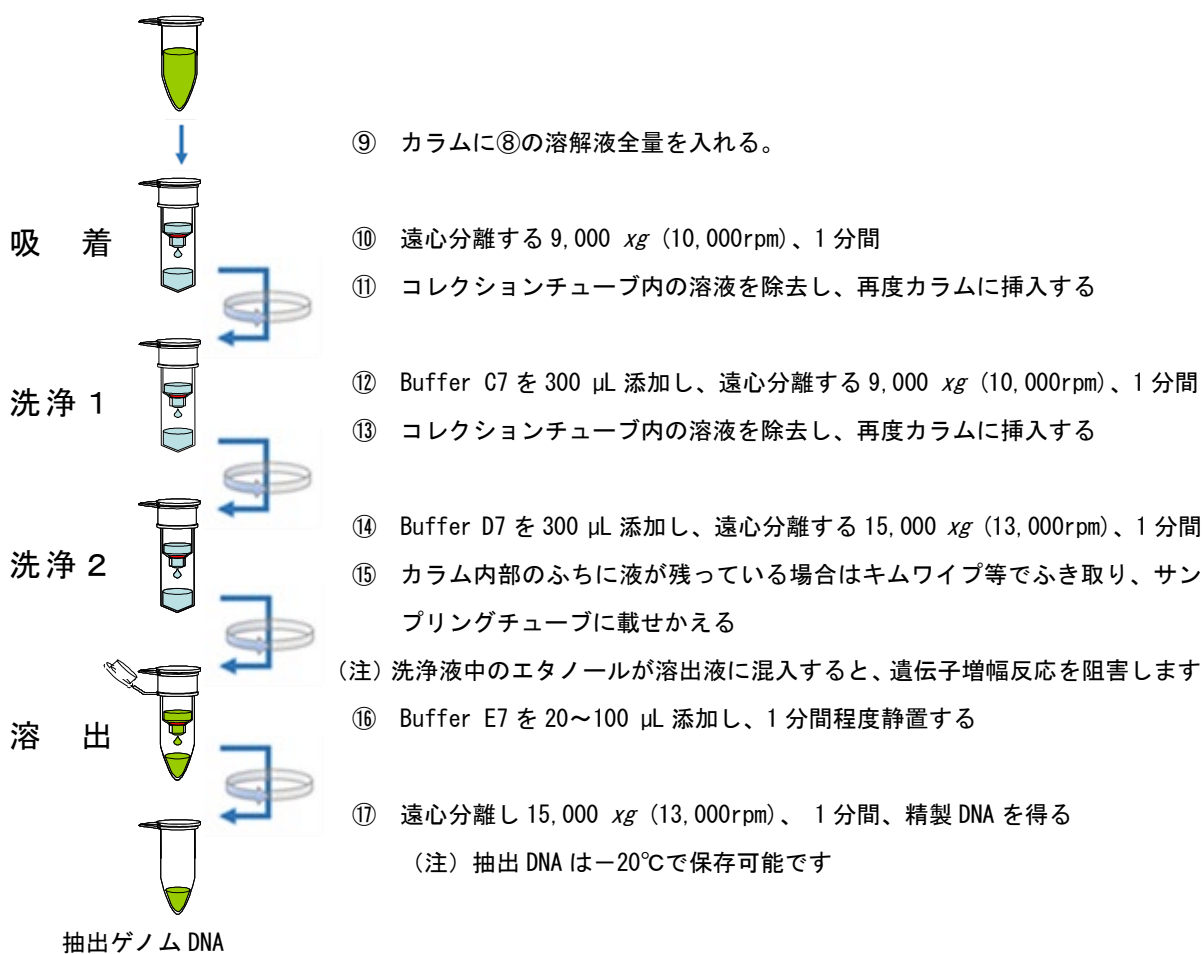
- ご所属の機関の倫理委員会の規定に従い作業してください。また、カラムの廃棄の際には、遺伝情報が残らないことと、感染症への配慮を考慮してください。
- 余ったバッファの廃棄方法は、安全データシート(SDS)に記載された通り廃棄ください。

6. DNA 抽出プロトコルの簡易フロー

① グラム陽性菌 DNA 抽出プロトコル

<培養液から集菌と酵素処理>

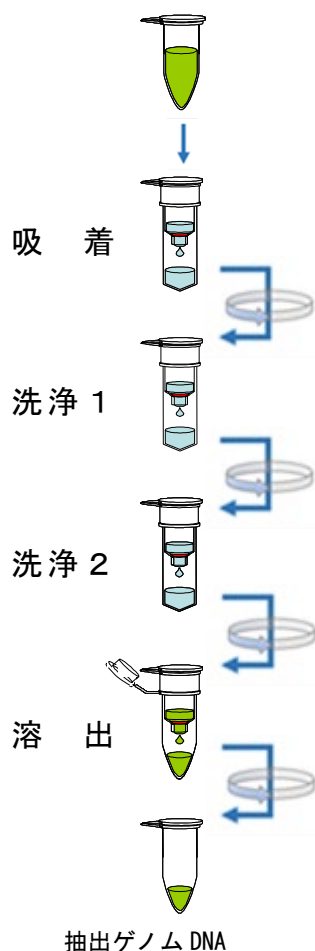
- ① グラム陽性菌培養液～600 μ L を遠心チューブに入れ、20,000 \times g (15,000rpm)、2 分間遠心する。
- ② 上清を捨て、沈殿に 200 μ L の Buffer AP7 を加えて、懸濁 (ボルテックス) する。
- ③ 2 μ L の RNase A (20 mg/mL) を加えて、懸濁後 (ボルテックス)、40°C で 15 分間反応させる。
- ④ 10 μ L の Proteinase K (20 mg/mL) を加えて、懸濁後 (ボルテックス)、60°C で 10 分間反応させる。
- ⑤ 200 μ L の Buffer B7 を加え、懸濁 (ボルテックス) する。
- ⑥ 75°C で 5 分間加熱、懸濁 (ボルテックス) する。
- ⑦ 200 μ L の 100% エタノール を加え、懸濁 (ボルテックス) する。
- ⑧ 遠心チューブを数秒間スピンドウンする。



② グラム陰性菌 DNA 抽出プロトコール

<培養液から集菌と酵素処理>

- ① グラム陰性菌培養液～250 μL を遠心チューブに入れ、20,000 $\times g$ (15,000rpm)、2 分間遠心する。
- ② 上清を捨て、沈殿に 200 μL の Buffer A7 を加えて、懸濁 (ボルテックス) する。
- ③ 10 μL の 20 mg/mL Proteinase K を加えて、懸濁後 (ボルテックス)、60°C で 10 分間反応させる。
- ④ 200 μL の Buffer B7 を加え、懸濁 (ボルテックス) する。
- ⑤ 75°C で 5 分間加熱、懸濁 (ボルテックス) する。
- ⑥ 200 μL の 100%エタノール を加え、懸濁 (ボルテックス) する。
- ⑦ 遠心チューブを数秒間スピンドアウンする。



- ⑧ カラムに⑦の溶解液全量を入れる。
 - ⑨ 遠心分離する 9,000 $\times g$ (10,000rpm)、1 分間
 - ⑩ コレクションチューブ内の溶液を除去し、再度カラムに挿入する
 - ⑪ Buffer C7 を 300 μL 添加し、遠心分離する 9,000 $\times g$ (10,000rpm)、1 分間
 - ⑫ コレクションチューブ内の溶液を除去し、再度カラムに挿入する
 - ⑬ Buffer D7 を 300 μL 添加し、遠心分離する 15,000 $\times g$ (13,000rpm)、1 分間
 - ⑭ カラム内部のふちに液が残っている場合はキムワイプ等でふき取り、サンプリングチューブに載せかえる
- (注) 洗浄液中のエタノールが溶出液に混入すると、遺伝子増幅反応を阻害します
- ⑮ Buffer E7 を 20~100 μL 添加し、1 分間程度静置する
 - ⑯ 遠心分離し 15,000 $\times g$ (13,000rpm)、1 分間、精製 DNA を得る
- (注) 抽出 DNA は -20°C で保存可能です

<スピнкаラムの操作概略>

○ スピнкаラムへの吸着

スピнкаラムに処理した溶解液を添加して、9000 $\times g$ (10,000rpm) 30 秒間遠心機処理後、スピнкаラムを回転させながら取り外し、コレクションチューブ内の液体を除去します。スピнкаラムをコレクションチューブに再度挿入します。

○ スピнкаラムの洗浄

Buffer C7 (洗浄 1) 300 μL 、Buffer D7 (洗浄 2) 300 μL を添加し、スピнкаラムを挿入したコレクション

チューブを 15000×g (13,000rpm)、1 分間遠心機処理します。

* Buffer D7 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。

○ スピнкаラムからの溶出

スピнкаラムをサンプリングチューブに挿入し、Buffer E7 (溶出 Buffer) 20~100 μL をモノリス表面の中央に添加し、15000×g (13,000rpm) 1 分間遠心機処理します。

10 μL の溶出 Buffer E7 を用いた場合の溶出液量は約 9 μL です。

Buffer E7 以外のオリジナル溶出液を用いる場合には、必ず pH 8.5~9.0 の範囲であることを確認して下さい。

<使用上の注意>

- * 実験台や器具類、特にピペットから核酸および核酸分解酵素の除去を行ってください。除去剤として、次亜塩素酸溶液や専用の市販品を使用してください。
- * ピペットチップはフィルター付きの製品を使用し、ピペッター本体は目的別 (反応液用、DNA 抽出の精製あるいは添加用、陽性コントロール添加用) に用意してください。
- * プラスチック製の器具は使い捨てとし、ピンセット類は使用時に火炎処理してください。
- * ガラス器具は乾熱滅菌 (160~200℃、2 時間) してください。なお、代替処理法として 3%過酸化水素水あるいは 1,000 mg/L 程度の次亜塩素酸液による薬液処理が可能です。(オートクレーブ処理は、核酸の分解には不十分です)
- * 試薬調製等に用いる精製水はバクテリア由来の DNA に汚染されていないことを予め確認してください。また、核酸分解酵素の不活性化のため、120℃、15 分間のオートクレーブ処理を行ってください。
- * 検体採取・取り扱いについては必要なバイオハザード対策をとってください。
- * 本製品は、バクテリア検出を目的とした環境検査にのみご使用ください。ヒト、動物由来検体の医療・臨床診断の目的では使用できません。
- * 遺伝子検査の知識や経験をもたない場合、検査結果の判定を誤る危険性があります。本製品の使用にあたっては、遺伝子検査の知識・経験を有した技術者の指導の下で検査を実施してください。

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・精製キットは温度変化が小さく、湿気の少ない涼しく清浄な暗所に保管してください。
- 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。
- 本製品はバクテリアゲノムからのゲノム 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) の詳細は弊社 HP (URL <http://www.animos.co.jp>) よりダウンロードして入手願います。

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[®] バクテリアゲノム DNA 抽出キット VII