

# MonoFas<sup>®</sup> DNA Stool Kit Ver.02 トラブルシューティング

トラブル	予想原因	対処法
DNA回収量が少ない	① DNAが分解している	新鮮な試料を用いて、再度DNA抽出を行う。 試料採取後、すぐにDNA抽出プロトコルを行うか、速やかに凍結させる。
	② DNAの溶出が効率的でない	Buffer D19を添加する際は、モノリス表面の中央部分に添加し、モノリス全体に行き渡るようにする。 溶出効率を高めるため、スピнкаラムにBuffer D19をピペットで添加後、遠心操作前に室温でスピнкаラムを1分間インキュベートする。
	③ Bufferを間違えて使用している	各工程に使用するBufferをプロトコルの順序に従って使用したかを確認する。
抽出・精製したDNAの純度が悪い	① 夾雑物が多い試料	十分なDNA量を確保できている試料であれば、洗浄工程を1回増やす。1回目洗浄工程後に、再度Buffer C19を500μL添加し、遠心を行う。
	② Buffer B19添加後の遠心で生じた沈殿(不純物)が持ち込まれた	試料によって上清と沈殿物との界面が目視で分かりづらいケースになることがあるので、上の方から慎重に上清を400μL取って新しい遠心チューブに移し、残りの上清を先の細いチップで回収することで、沈殿物の持込みが起き難くなる。
	③ 析出物が持ち込まれた	ビーズ破砕や熱処理をした溶液を温度が高いまま、上清液を回収すると、析出物が生じ難くなり、夾雑物が残留する原因になる。 室温に戻ってから上清を回収し、イソプロパノールと十分に混合する。
	④ 溶出液中にBuffer C19が残留、不純物が混入	スピнкаラムにBuffer C19を500 μL添加後、2~3分間静置してから、遠心する。 最高速度で空遠心を2分間行い、Buffer C19に含まれているエタノールを完全除去する。
	⑤ RNAの残留量が多い	本キットではAmylase, RNase A処理は行わないため、糖やRNAを含まないDNAが必要な場合は、抽出後にRNase A処理を行うと純度が改善する。 RNase A 溶液での処理方法: 溶出液100 μLに対し0.2 μLのRNase A(20mg/mL)溶液を添加し、37°Cで15分間インキュベーションする。
酵素反応効率が低い	① 溶出液中のDNA量が不十分	溶出液中にDNAが少ない場合は、溶出液量を10 μLまで減らし濃縮させる。 使用する試料量を増やして、回収DNA量を増やす。 溶出回数を増やす。(100μLの1回溶出を50μL2回溶出に変更する)
	② PCR増幅反応の効率が悪い	PCR増幅反応にテンプレートとして添加する溶出液の量を調節する。 添加された溶出液量を調節して増幅システムを再度至適化する。
DNA回収量が多い	① PCR増幅反応の感度が低下、増幅が上手く行かない、不純物の影響が大きい	PCR増幅反応にテンプレートとして添加する溶出液の量を調節する。 溶出DNAを滅菌水で希釈して使用する。
	② 試料量が多く、完全に溶解されていない	溶出DNAを希釈する(微量、高純度)。 溶出液量を100 μLまで増加することにより、不純物によるPCR反応阻害を抑制する。