

MonoFas[®]

研究用試薬キット

糞便DNA抽出キット X

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. 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[®] 糞便 DNA 抽出キット X は、糞便からゲノム DNA を抽出するキットです。

本製品は均一な連続孔を持つディスク型シリカモノリスを固定したモノリス固相スピнкаラムで、DNA がシリカゲルに吸着する特性を利用して糞便からゲノム DNA の抽出を行います。本製品を使用することで、糞便中のグラム陽性、陰性菌からゲノム DNA を高効率で抽出できます。また不純物の除去率が高く、抽出したゲノム DNA 溶液中に無機塩類がないことも本製品の特徴です。本製品で抽出されたゲノム DNA で、高効率のリアルタイム PCR 増幅が可能です。MonoFas[®] 糞便 DNA 抽出キット X の性能を十分に発揮させるため、本取扱説明書をよくお読みの上、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。

| Cat. No. | A10-0001 | A10-0002 | A10-0003 | A10-0004 |
|-------------------------|------------|------------|------------|------------|
| 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 A10 (懸濁、消化、細胞溶解) | 14 mL | 28 mL | 55 mL | 110 mL |
| Buffer B10 (雑物変性) | 9 mL | 17 mL | 42 mL | 83 mL |
| Buffer C10 (吸着) | 14 mL | 28 mL | 55 mL | 138 mL |
| Buffer D10 (洗浄) | 14 mL | 28 mL | 55 mL | 138 mL |
| Buffer E10 (溶出) | 6 mL | 6 mL | 11 mL | 28 mL |

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

* Buffer E10 は、10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA (Free) (pH 8.5) です。

3. 製品仕様

| | 糞便からの DNA 抽出 |
|------------|---------------------------------------|
| 操作時間 | 10 分間 |
| 最大 DNA 結合量 | ~ 50 µg |
| 溶出量 | 10 ~ 100 µL |
| 推奨処理量 | ~ 300 mg |
| DNA の純度 | $A_{260}/A_{280} \doteq 1.7 \sim 2.3$ |

MonoFas[®] 糞便 DNA 抽出キット X

4. 必要な試薬及び器具

- ① MonoFas[®] 糞便 DNA 抽出キット X
- ② 1.5mL 遠心チューブ
- ③ 高速マイクロ遠心機 (20,000 xg (15,000 rpm) の遠心が可能なもの) *
- ④ 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)
- ⑤ ボルテックスミキサー (2,500 rpm 程度の攪拌ができるもの)
- ⑥ 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。

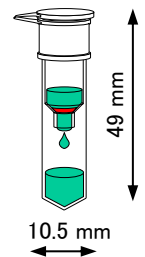
基本計算式

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

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

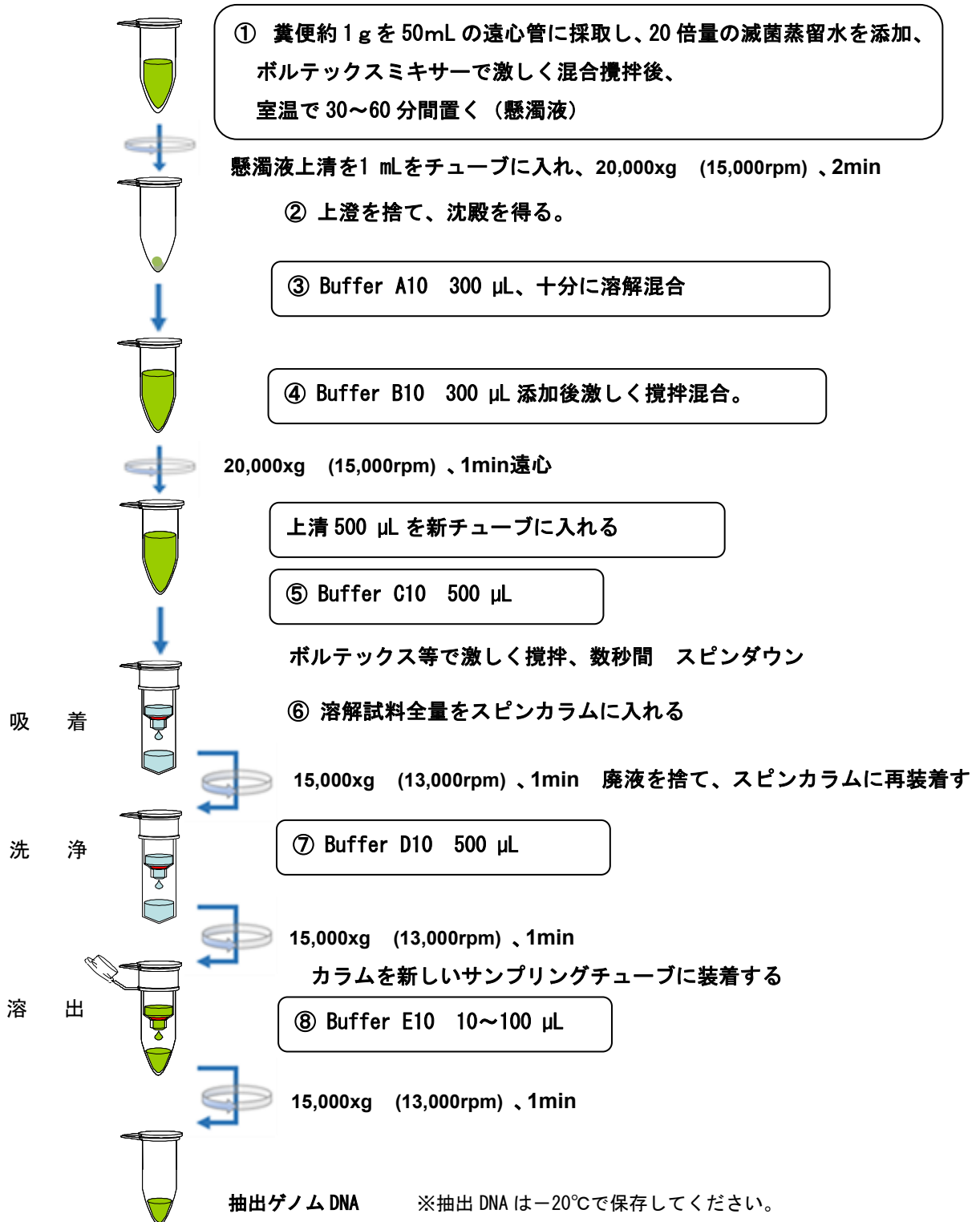
5. カラム使用上の注意事項

- 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、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。
- 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。
- 余ったバッファーの廃棄方法は、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 抽出プロトコールの簡易フロー

《DNA の抽出》



<注意事項>

- ① 新鮮または凍結糞便サンプルを準備する。まず糞便約1gを50 mLの遠心管に採取し、20倍量の滅菌蒸留水を添加、ボルテックスミキサーで激しく混合攪拌後、室温で30~60分間置く（懸濁液）。
- ② 懸濁液上清1 mLを遠心チューブに入れ、20,000xg（15,000 rpm）2分間遠心、上清を捨て、沈殿を得る
- ③ Buffer A10 300 μ Lを添加し、攪拌溶解混合（ボルテックス）する。
注）a. 糞便量が多すぎた場合、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、糞便量を減らして検討してください。また糞便の量が多い場合は、Buffer A10の量を300 μ Lから500 μ Lに変更する。
b. 採材した糞便は、DNA抽出に使用するまで、できるだけ-20℃または-80℃で保存することを推奨する。
- ④ Buffer B10を300 μ L添加後激しく攪拌混合。20,000xg（15,000 rpm）1分間遠心し、上清500 μ Lを新チューブに入れる。
- ⑤ Buffer C10を500 μ L添加し、激しく転倒混和する。数秒間スピンドウンして、キャップや壁についた液を収集する。

注）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。

【ライセート完成】

- ⑥ ライセートを数回ピペッティングし、スピнкаラムに全量添加してください。スピнкаラムの蓋を閉め、20,000xg（15,000 rpm）にて1分間遠心させます。遠心機からカ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。

注）試料によっては凝集物ができることがあります。すべての凝集物ごとカラムへ添加します。遠心後ライセートがカ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。

⑦ 洗浄

注意深くスピнкаラムの蓋を開け、Buffer D10を500 μ L添加してください。カラムの蓋を閉め、15,000xg（13,000 rpm）にて1分間遠心してください。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。

注1）遠心後 Buffer D10がカ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。

注2）Buffer D10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。

注3）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。

⑧ 回収

スピнкаラムをサンプリングチューブにのせかえます。注意深くカラムの蓋を開け、Buffer E10を10 μ L~100 μ L、モノリス表面の中央に添加してください。その後15,000xg（13,000 rpm）で1分間遠心し、溶出する。遠心機からカ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。

以上で糞便中ゲノムDNAの抽出は完了です。

注）スピнкаラムに添加した溶出Buffer E10は、ほぼ全量が回収されます。

- * 回収したゲノム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。
- * 本製品に同封されている Buffer E10 に、RNase・DNase フリー滅菌水に置き換えることができます。その場合、pHにより回収率が変動するためアンモニア水や水酸化カリウムなどで pH 8.5~9.0 に調整してご使用ください。

<糞便に関する注意事項>

- ① 糞便をすぐに使用しない場合は、冷凍保存 (-20℃または-80℃) してください。室温で放置したり、凍結、溶解を繰り返すと、DNA が分解したり、回収量が減少することがあります。
- ② 処理可能量を超えた糞便をオーバーロードしてしまうと、性能が低下し、最悪の場合、カラムの目詰まりを引き起こします。

<使用に関する注意事項>

- ① 所定量の Buffer A10 を使用してください。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、遠心機からカラムと廃液容器を取り外す際は、廃液がカ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ンド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、操作は素早く行ってください。
- 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 本製品は糞便中のグラム陽性、陰性菌ゲノム DNA を抽出するためのキットで、その他の目的にはご使用になれません。

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。
- 本製品は糞便からのゲノム 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 が追加が必要な際には、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:048-606-2829 FAX:048-611-7192 E-mail:monofas@animos.co.jp

MonoFas[®] 糞便DNA抽出キット X