

糞便 DNA 抽出キット

---

---

ISOFECAL for Beads Beating

マニュアル (第 1 版)

---

---

Code No. 315-06281

NIPPON GENE CO., LTD.



目次
----

製品説明	-----	1
キット内容	-----	1
保存	-----	2
使用上の注意	-----	2
プロトコル	-----	2
<本品以外に必要な試薬、機器など>	-----	2
<標準プロトコル>	-----	3
データ集	-----	4
1．糞便サンプルからの DNA 抽出	-----	4
2．糞便 DNA のスペクトル	-----	4
3．糞便 DNA の PCR	-----	5
トラブルシューティング	-----	6
関連製品	-----	7

## I 製品説明

ISOFEAL for Beads Beating は糞便サンプルから DNA を抽出するためのキットです。

本キットでは DNA の抽出方法として界面活性剤による化学的な溶菌法と、Beads Beating による物理的な菌体破碎法の併用を採用しています。これによって、強固な細胞壁を持つ微生物からも DNA を抽出することができ、実際の糞便微生物相を反映した糞便 DNA を得ることができます。

ただし、ISOFEAL for Beads Beating で抽出した DNA は Beads Beating によって物理的せん断を受けている可能性がありますので、あらかじめご了承ください。

## II キット内容

Beads Tubes	50 本
Lysis Solution F*	50ml × 1 本
Purification Solution*	20ml × 1 本
Precipitation Solution	40ml × 1 本
Wash Solution	50ml × 1 本
TE ( pH8.0 )	5ml × 1 本
Ethachinmate	100µl × 1 本
マニュアル	1 部

\* Lysis Solution F および Purification Solution 中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ぬ。このような場合には、容器ごと 37 ~ 65 程度でインキュベートし、結晶を完全に溶解させてからご使用ください。

### III 保存

ISOFECAL for Beads Beating に含まれる試薬はすべて室温保存が可能です。

ただし、Precipitation Solution、Wash Solution、Ethachinmate については、使用時のコンタミネーション(カビや雑菌等の混入)に十分注意し、開封後は低温(2~10 )で保存することをお奨めします。

### IV 使用上の注意

- ・ 本品は試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
- ・ 試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱いわないでください。
- ・ 本品のお取扱いは、マニュアル記載内容通りに行ってください。
- ・ マニュアル記載内容と異なったお取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。
- ・ ISOFECAL for Beads Beating における糞便 DNA 抽出法は東京大学 TLO が特許出願中です。ニッポンジーンは糞便 DNA 抽出法に関して東京大学 TLO よりライセンスを受けています。

### V プロトコル

#### <本品以外に必要な試薬、機器など>

- ・ ビーズ式破碎装置(2ml チューブ対応のもの)
- ・ 70%エタノール
- ・ クロロホルム
- ・ マイクロピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ 2ml マイクロチューブ
- ・ インキュベーター
- ・ マイクロ遠心機
- ・ ボルテックスミキサー

## <標準プロトコル>

0.2 g の糞便サンプルを Beads Tube に入れる。

1ml の Lysis Solution F を添加する。

Beads Beat (4 ~ 6 m / 秒間または 4,200 ~ 6,800 rpm で 30 ~ 45 秒間) する<sup>(注1)</sup>。

遠心 (12,000 × g, 5 分間, 室温) する。

上清 600 μl を新しいチューブに移し、400 μl の Purification Solution を添加し、十分に混合する<sup>(注2)</sup>。

600 μl のクロロホルムを添加し、15 秒間ボルテックスした後、遠心 (12,000 × g, 15 分間, 室温) する。

中間層を入れないように注意しながら水層 800 μl を新しいチューブに移し、800 μl の Precipitation Solution を添加して十分に混合し、遠心 (20,000 × g, 15 分間, 4 °C) する<sup>(注3)</sup>。

上清を捨て、1ml の Wash Solution を加えて数回転倒混和し、遠心 (20,000 × g, 10 分間, 4 °C) する<sup>(注3)</sup> (注4)。

上清を捨て、1ml の 70% エタノールと 2 μl の Ethachinmate を加えてボルテックスした後、遠心 (20,000 × g, 5 分間, 4 °C) する<sup>(注3)</sup> (注5)。

上清を捨て、風乾した後、沈殿を 100 μl の TE (pH8.0) に溶解する。

(注1) Beads Tube の蓋がしっかり閉まっていることを確認してください。蓋のゆるみは Beads Beating 中の液漏れの原因となります。

(注2) 糞便が Lysis Solution F を吸収してしまい、遠心上清が 600 μl 回収できない場合があります。このような場合は、溶液の比率をそのままにしてステップ ~ をスケールダウンしてください。

ステップ 遠心上清 : Purification Solution : クロロホルム = 6 : 4 : 6

ステップ 水層 : Precipitation Solution = 1 : 1

ステップ 以降は変更なし。

(注3) ご使用の遠心機の最大遠心力が 20,000 × g よりも小さい場合は、遠心機の最大遠心力 (ただし 12,000 × g 以上) で遠心してください。

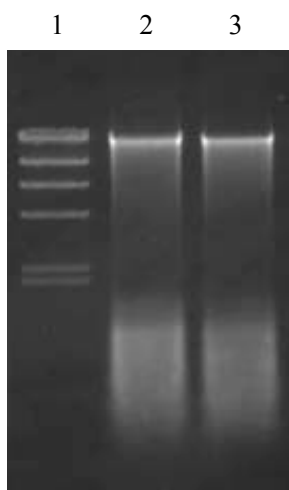
(注4) できるだけ上清を取り除いて下さい。上清に含まれる物質は PCR を阻害する可能性があります。また、DNA の収量が少ない場合、この段階では沈殿を目で見ることができません。

(注5) 70% エタノールに Ethachinmate を加えることで、糞便 DNA を安定して回収することができます。ただし、Ethachinmate を添加しない場合は、ボルテックスを避け、転倒混和によって穏やかに沈殿を洗浄してください。

## VI データ集

### 1. 糞便サンプルからの DNA 抽出

本キットを用いて 0.2 g の成人糞便サンプルから抽出した DNA の 1 / 200 量を 1% Agarose S で電気泳動した。



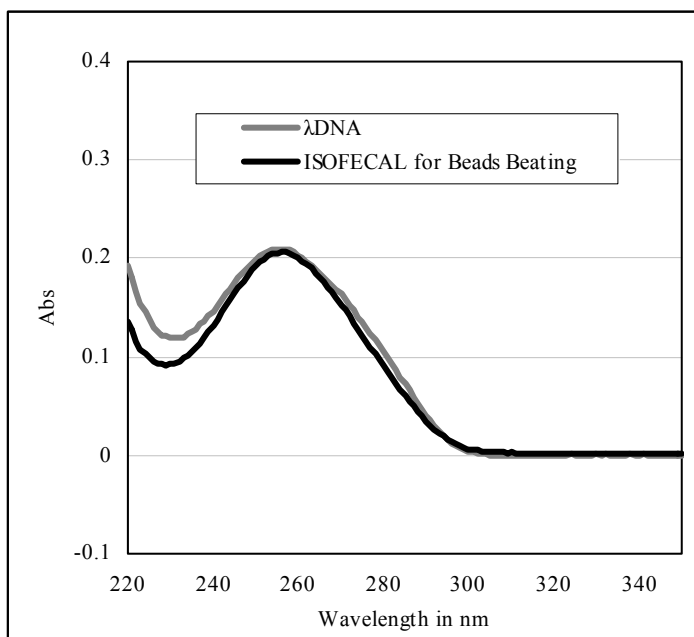
Lane 1. OneSTEP Marker 1 ( / *Hind* digest )

Lane 2. 糞便サンプル No. 1

Lane 3. 糞便サンプル No. 2

### 2. 糞便 DNA の吸収スペクトル

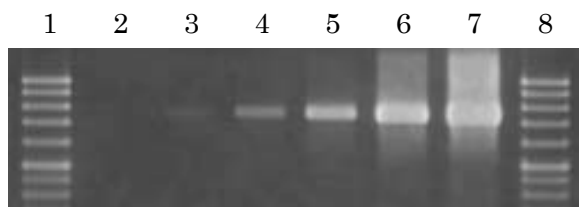
本キットを用いて抽出した成人糞便の DNA と、高純度に精製された Lambda DNA ( Code No.318-00414 ) の吸収スペクトルを比較した。



その結果、本キットで抽出した糞便 DNA が高純度であることがわかった。

### 3. 糞便 DNA の PCR

本キットを用いて抽出した糞便 DNA (0~10,000 pg) を鋳型として、細菌 16S rRNA 遺伝子断片 (27-1492) を増幅し、増幅産物の 1/5 量を 2% Agarose S で電気泳動した。



- Lane 1, 8. OneSTEP Ladder 100
- Lane 2. No Template Control
- Lane 3. 糞便 DNA 16 pg
- Lane 4. 糞便 DNA 80 pg
- Lane 5. 糞便 DNA 400 pg
- Lane 6. 糞便 DNA 2,000 pg
- Lane 7. 糞便 DNA 10,000 pg

## VII トラブルシューティング

問題	考えられる原因	考えられる対策
糞便 DNA の収量が少ない。	糞便微生物が少ない。	できるだけ新鮮な糞便を使用してください。
	DNA の沈殿が流れている。	プロトコルステップ では DNA の沈殿が剥がれやすい状態になっています。70%エタノールと共に付属の Ethachinmate を使用してください。また、Ethachinmate により沈殿は可視化されますので、沈殿を流してしまわないように目で確認しながら注意深く上清を取り除いてください。
糞便 DNA の分子量が小さい。	Beads Beating の物理的衝撃により DNA がせん断されている。	高分子糞便 DNA を抽出したい場合には界面活性剤存在下での加熱抽出法を採用している ISOFE CAL を使用してください。 ただし、ISOFE CAL では強固な細胞壁を持つ微生物からの DNA 抽出はできません。
Lysis Solution F 中に白い結晶が析出している。	低温によって試薬が析出している。	37~65 程度でインキュベートし、結晶を完全に溶解させてからご使用ください。品質、性能には問題ありません。
Purification Solution 中に白い結晶が析出している。	低温によって試薬が析出している。	37~65 程度でインキュベートし、結晶を完全に溶解させてからご使用ください。品質、性能には問題ありません。
Precipitation Solution 中に浮遊物が見られる。	カビ等のコンタミが起きている。	新しいキットをご購入ください。 本溶液はカビ等が繁殖しやすい溶液組成となっていますので、使用時のコンタミネーションには十分注意し、開封後は低温(2~10 )で保存することをお奨めします。
Wash Solution 中に浮遊物が見られる。	カビ等のコンタミが起きている。	新しいキットをご購入ください。 また、本溶液はカビ等が繁殖しやすい溶液組成となっていますので、使用時のコンタミネーションには十分注意し、開封後は低温(2~10 )で保存することをお奨めします。
Ethachinmate 中に浮遊物が見られる。	カビ等のコンタミが起きている。	新しい Ethachinmate をご購入ください。 また、使用時のコンタミネーションには十分注意し、開封後は低温(2~10 )で保存することをお奨めします。
Beads Tube から Lysis Solution F が溢れる。	糞便の空隙体積が大きい。	糞便サンプルの使用量を 0.2g より減らしてください。

VIII 関連製品
-----------

コード No.	製品名	包装単位	希望納入価格
318-06271	ISOFEAL	50 回用	25,000 円
312-01791	Ethachinmate	0.2ml	15,000 円
310-05251	OneSTEP Marker 1 ( / <i>Hind</i> digest )	1,500 $\mu$ l	9,000 円
313-05241	OneSTEP Ladder 100 ( 0.1-2.0 kbp )	500 $\mu$ l	16,000 円
319-05243	OneSTEP Ladder 100 ( 0.1-2.0 kbp )	500 $\mu$ l $\times$ 2	30,000 円
312-01193	Agarose S	100g	12,000 円
318-03231	Gene <i>Taq</i> NT	250units	22,500 円
314-03233	Gene <i>Taq</i> NT	250units $\times$ 4	79,000 円
314-80251	HOTGoldstar <sup>TM</sup> DNA Polymerase	500units	45,000 円



## 株式会社ニッポンジーン

学術営業部 学術営業課

〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7

TEL (076)451-6548

FAX (076)451-6547

Email [info@nippongene.jp](mailto:info@nippongene.jp)

URL <http://www.nippongene.jp/>