

糞便 DNA 抽出キット

ISOFECAL

マニュアル (第 2 版)

Code No. 318-06271

NIPPON GENE CO., LTD.

I 製品説明

ISOFECAL 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存在下での加熱抽出法を採用しています。したがって、強固な細胞壁を持つ微生物からの DNA 抽出は難しい場合がありますので、大腸菌などグラム陰性細菌の検出等にご使用ください。

実際の糞便微生物相をより反映した糞便 DNA を抽出する場合には、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た ISOFECAL for Beads Beating をご使用ください。

II キット内容

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	100 μ l	×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ん。このような場合には、容器ごと 37~65°C 程度でインキュベートし（ときおり混和する）、結晶を完全に溶解させてからご使用ください。

III 保存

ISOFECAL 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。
- ・ 本品のお取り扱い、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。
- ・ 本品は、東京大学 TLO が所有する特許のライセンスを受けて製造販売しております。

V プロトコル

<本品以外に必要な試薬、機器など>

- ・ 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>

- ① 0.2 g の糞便サンプルを 2 ml チューブに入れる。
- ② 1ml の Lysis Solution F を添加する。
- ③ つまようじ等を用いて糞便を懸濁し、1 分間ボルテックスした後、65°C で 1 時間インキュベートする。(注1)。
- ④ 遠心 (12,000 ×g, 5 分間, 室温) する。
- ⑤ 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 (注2)。
- ⑥ 600 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。
- ⑦ 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 (注3)。
- ⑧ 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 (注3)、(注4)。
- ⑨ 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 (注3)、(注5)。
- ⑩ 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) 糞便が完全に懸濁されていることを確認してください。また、インキュベート中、10～20 分おきにボルテックスまたは転倒混和することをお奨めします。

(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⑤～⑦をスケールダウンしてください。

ステップ⑤⑥ 遠心上清 : Purification Solution : クロロホルム = 6 : 4 : 6

ステップ⑦ 水層 : Precipitation Solution = 1 : 1

ステップ⑧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。

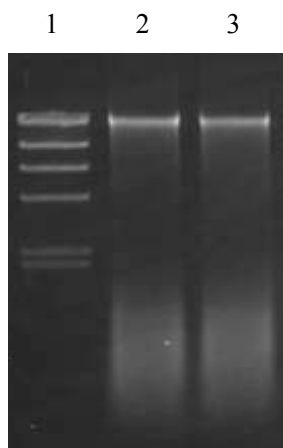
(注4) できるだけ上清を取り除いて下さい。上清に含まれる物質は PCR を阻害する可能性があります。また、DNA の収量が少ない場合、この段階では沈殿を目で見ることはできません。

(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。



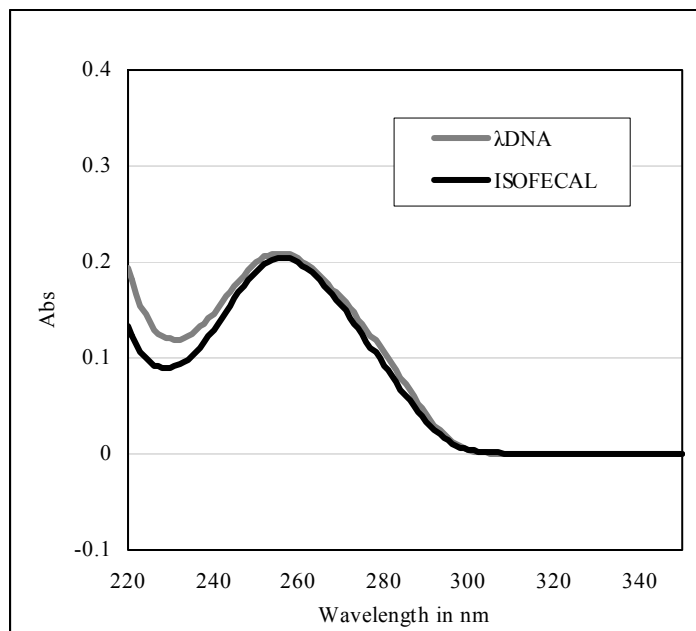
Lane 1. OneSTEP Marker 1 (λ /Hind III digest)

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

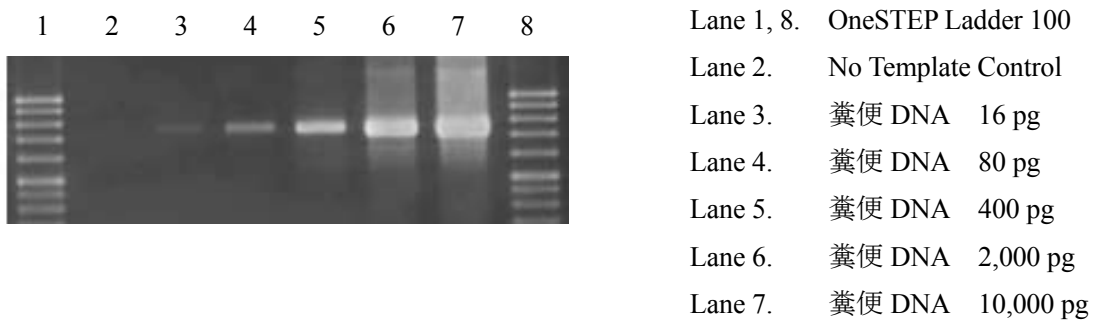
本キットを用いて抽出した成人糞便の DNA と、高純度に精製された Lambda DNA (Code No.318-00414) の吸収スペクトルを比較した。



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。



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⑨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。
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°C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°C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°C）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°C）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°C）で保存することをお奨めします。
チューブから 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
315-06281	ISOFECAL for Beads Beating	50 回用
312-01791	Ethachinmate	0.2ml
310-05251	OneSTEP Marker 1 (λ / <i>Hind</i> III digest)	1,500 μ l
313-05241	OneSTEP Ladder 100 (0.1-2.0 kbp)	500 μ l
312-01193	Agarose S	100g
318-03231	Gene <i>Taq</i> NT	250units

マニュアル記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。

お問い合わせ先

株式会社ニッポンジーン
研究試薬部 学術営業課

TEL 076 - 451 - 6548
www.nippongene.com

お問い合わせは、お電話もしくはWEB フォームより
承っております