

糞便 DNA 抽出キット

---

---

# ISOSPIN Fecal DNA

マニュアル（第2版）

---

---

Code No. 315-08621

NIPPON GENE CO., LTD.

## I 製品説明

ISOSPIN Fecal DNA（アイソスピン フィーカル ディーエヌイー）は、糞便サンプルから DNA を抽出・精製するためのキットです。

本キットの抽出液は、糞便サンプルからの DNA 抽出のために最適化しています。また、ビーズビーティングによる物理的な破碎の併用によって、強固な細胞壁を有する微生物からも DNA を抽出することが可能です。なお、DNA の物理的な剪断を避けたい場合には、ビーズビーティングを行わない熱処理法による抽出プロトコールをご検討ください。

本キットは、人体に有害なフェノールやクロロホルム等の毒性有機溶媒を使用しないスピンカラムによる DNA 精製方法を採用しており、迅速・簡便に糞便サンプルから高純度に DNA 溶液を得ることができます。

## II キット内容

キット内容品	(50 回用)	備考
FE1 Buffer	35 ml × 1 本	※
FE2 Buffer	4.5 ml × 1 本	
FB Buffer	40 ml × 1 本	
FW Buffer	40 ml × 1 本	
TE (pH8.0)	5 ml × 1 本	
RNase A (100 mg/ml)	0.5 ml × 1 本	(長期保存 冷蔵/冷凍)
Beads Tube	50 本 × 1 袋	
Spin Column	50 本 × 1 袋	上部パーツ：カラム 下部パーツ：Collection Tube

※ FE1 Buffer 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。ときおり混和しながら、容器ごと 37～65℃で加温し、結晶を完全に溶解させてからご使用ください。

## III 保存

### 室温保存

- ・ RNase A は室温保存可能ですが、長期間使用しない場合は冷蔵保存（4℃）もしくは冷凍保存（-20℃）してください。

## 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わないで下さい。
- ・ 本品の取り扱いは、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。
- ・ 製品安全データシート（SDS）につきましては、ニッポンジーンのウェブページ（<http://www.nippongene.com/siyaku/list.html>）にてご覧になれます。

## V プロトコール

全ての遠心操作は室温で行えます。

### <キット以外に必要なもの>

- ・ ビーズ式破碎装置（2 ml チューブ対応のもの）
- ・ イソプロパノール
- ・ マイクロピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ 1.5 ml マイクロチューブ
- ・ 遠心分離機
- ・ ボルテックスミキサー

### <糞便懸濁液対応プロトコールで別途用意するもの>

- ・ 採便キット等を利用した糞便保存液

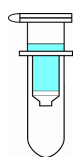
### <熱処理法によるプロトコールで別途用意するもの>

- ・ ヒートブロック
- ・ 2.0 ml マイクロチューブ
- ・ 氷（必要に応じて）

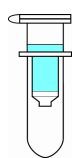
## <標準プロトコール>

ビーズ式破碎装置 (2 ml チューブ対応のもの) が必要です。遠心操作は全て室温で行えます。

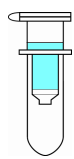
- ① 0.2 g の糞便サンプルを秤量し、Beads Tube に入れる。
- ② 700  $\mu$ l の FE1 Buffer と 10  $\mu$ l の RNase A を添加する。
- ③ **Beads Beat** (4~6 m/s または 4,200~6,800 rpm で 30~45 秒間) する。  
注) 蓋のゆるみは Beads Beating 中の液漏れの原因となるため、Beads Tube の蓋がしっかり閉まっていることを確認してください。
- ④ スピンドアウンした後、90  $\mu$ l の FE2 Buffer を添加し、十分に混合する。  
注) ステップ③で熱が生じている場合、室温に戻ってから FE2 Buffer を添加してください。
- ⑤ 遠心 (12,000  $\times$  g, 15 分間) する。
- ⑥ 上清 500  $\mu$ l を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。  
注) 糞便サンプルの水分含量が少ない場合、500  $\mu$ l の上清を回収できない場合があります。その場合は、ステップ⑦で添加する試薬の液量比を維持してスケールダウンしてください。なお、ステップ⑧以降は量比を変更する必要はありません。
- ⑦ 200  $\mu$ l の FB Buffer と 200  $\mu$ l のイソプロパノールを添加し、転倒混和で十分に混合する。  
注) FB Buffer とイソプロパノールの添加量は、上清の液量に対して 0.4 倍量です。(例えば、上清が 400  $\mu$ l の場合、FB Buffer とイソプロパノールは 160  $\mu$ l ずつ添加します。)



- ⑧ ⑦の混合液を全量 Spin Column に添加し、遠心 (13,000  $\times$  g, 30 秒間) する。
- ⑨ Spin Column のカラムを外し、Collection Tube 中のろ液を捨てた後、カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。

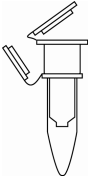


- ⑩ 600  $\mu$ l の FB Buffer を Spin Column に添加し、遠心 (13,000  $\times$  g, 1 分間) する。
- ⑪ ろ液を捨てて、カラムを Collection Tube に再度戻す。



- ⑫ 600  $\mu$ l の FW Buffer を Spin Column に添加し、遠心 (13,000  $\times$  g, 1 分間) する。
- ⑬ ろ液と Collection Tube を捨てる。



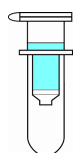


- ⑭ Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に乗せる。
- ⑮ 50  $\mu$ l または 100  $\mu$ l の TE (pH8.0)をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置する。  
注) 濃い DNA 濃度を求める場合は、50  $\mu$ l の TE (pH 8.0) で溶出することを推奨します。
- ⑯ 遠心 (13,000  $\times$  g、1 分間) する。
- ⑰ DNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される。

### <糞便懸濁液対応プロトコール>

採便キット等の保存液に懸濁されたサンプルから高収量の DNA を抽出するためのプロトコールです。ビーズ式破碎装置（2 ml チューブ対応のもの）が必要です。

- ① **200  $\mu$ l の糞便懸濁液**を Beads Tube に入れる。  
注) 採便キット等を使用して保存した糞便試料の場合、糞便保存液をボルテックスミキサー等で懸濁してから使用する。
- ② 700  $\mu$ l の FE1 Buffer と 10  $\mu$ l の RNase A を添加する。
- ③ Beads Beat（4~6 m/s または 4,200~6,800 rpm で **5 分間**）する。  
注) 蓋のゆるみは Beads Beating 中の液漏れの原因となるため、Beads Tube の蓋がしっかりと閉まっていることを確認してください。  
注) **必ずビーズ式破碎装置の操作マニュアルに従って処理してください。**  
1 回のビーズ破碎時間が 5 分以下に制限された装置をご使用の場合、装置マニュアルに従って複数回処理していただき、処理時間が合計 5 分間になるようにしてください。
- ④ スピンドアウンした後、90  $\mu$ l の FE2 Buffer を添加し、十分に混合する。  
注) ステップ③で熱が生じている場合、室温に戻ってから FE2 Buffer を添加してください。
- ⑤ 遠心（12,000 $\times$ g, 15 分間）する。
- ⑥ **上清 600  $\mu$ l** を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。  
注) 糞便サンプルの水分含量が少ない場合、600  $\mu$ l の上清を回収できない場合があります。その場合は、ステップ⑦で添加する試薬の液量比を維持してスケールダウンしてください。なお、ステップ⑩以降は量比を変更する必要はありません。
- ⑦ **240  $\mu$ l** の FB Buffer と **240  $\mu$ l** のイソプロパノールを添加し、転倒混和で十分に混合する。  
注) FB Buffer とイソプロパノールの添加量は、上清の液量に対して 0.4 倍量です。（例えば、上清が 400  $\mu$ l の場合、FB Buffer とイソプロパノールは 160  $\mu$ l ずつ添加します。）



- ⑧ ⑦の混合液を全量（900  $\mu$ l より多い場合は 2 回に分けて）Spin Column に添加し、遠心（13,000 $\times$ g, 30 秒間）する。  
注) 混合液量が 900  $\mu$ l より多い場合はステップ⑧~⑨を繰り返して、1 本の Spin Column に全量を添加して下さい。
- ⑨ Spin Column のカラムを外し、Collection Tube 中のろ液を捨てた後、カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。



ステップ⑩以降は、<標準プロトコール>と同じ

### <熱処理法によるプロトコール>

DNA の物理的な剪断を避けたい場合のオプションプロトコールです。

ヒートブロックが必要です。

Beads Tube の代わりに 2.0 ml マイクロチューブを使用できます。

- ① 0.2 g の糞便サンプルを秤量し、Beads Tube もしくは 2.0 ml マイクロチューブに入れる。
- ② 700  $\mu$ l の FE1 Buffer と 10  $\mu$ l の RNase A を添加し、十分に混合する。
- ③ **ヒートブロックで 65°C、1 時間加温する。15 分毎に混和する。**  
注) 糞便サンプルと FE1 Buffer の攪拌不十分は低収量の原因となるため、15 分毎に転倒混和もしくはボルテックスミキサー等でよく混合してください。  
サンプルによっては、混合しても崩れず、懸濁状態にならないことがあります。  
注) 65°Cの処理時間が 1 時間を超えないようにしてください。
- ④ 室温になるまで静置し、スピンドウンしたあと、90  $\mu$ l の FE2 Buffer を添加し、十分に混合する。  
注) ステップ③のあと、室温に戻ってから FE 2 Buffer を添加してください。氷上に置いて室温より低くしてもかまいません。
- ⑤ 遠心 (12,000  $\times$  g, 15 分間) する。
- ⑥ 上清 500  $\mu$ l を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。  
注) 糞便サンプルの水分含量が少ない場合、500  $\mu$ l の上清を回収できない場合があります。その場合は、ステップ⑦で添加する試薬の液量比を維持してスケールダウンしてください。
- ⑦ 200  $\mu$ l の FB Buffer と 200  $\mu$ l のイソプロパノールを添加し、転倒混和で十分に混合する。  
注) FB Buffer とイソプロパノールの添加量は、上清の液量に対して 0.4 倍量です。



ステップ⑧以降は、<標準プロトコール>と同じ

### <簡易・標準プロトコール>

ビーズ式破碎装置 (2 ml チューブ対応のもの) が必要です。遠心操作は全て室温で行えます。

#### Beads Tube に 0.2 g の糞便サンプルを入れる

← 700  $\mu$ l の FE1 Buffer を添加

← 10  $\mu$ l の RNase A を添加

**Beads Beat** (4~6 m/s または 4,200~6,800 rpm で 30~45 秒間)

スピンドウン (室温に戻す)

← 90  $\mu$ l の FE2 Buffer を添加し、十分に混合

← 遠心 (12,000  $\times$  g, 15 分間)

#### 上清 500 $\mu$ l を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す

← 200  $\mu$ l の FB Buffer を添加

← 200  $\mu$ l の イソプロパノールを添加し、転倒混和で十分に混合

#### 混合液 900 $\mu$ l (全量) を Spin Column に添加

← 遠心 (13,000  $\times$  g, 30 秒間)  
ろ液を捨てる

← 600  $\mu$ l の FB Buffer を添加

← 遠心 (13,000  $\times$  g, 1 分間)  
ろ液を捨てる

← 600  $\mu$ l の FW Buffer を Spin Column に添加

← 遠心 (13,000  $\times$  g, 1 分間)  
ろ液を捨てる

#### Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す

← 50  $\mu$ l の TE (pH 8.0) をメンブレン中央に滴下  
室温静置 3 分間

← 遠心 (13,000  $\times$  g, 1 分間)

DNA 溶液



## VI トラブルシューティング

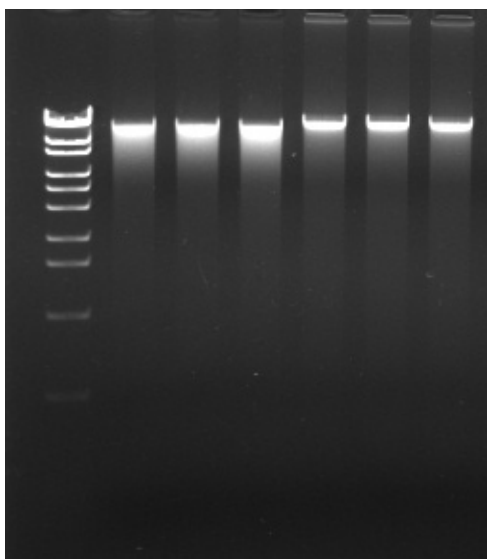
トラブル	原因と対策
低収量	<p>Spin Column のメンブレンに DNA を吸着させるステップ⑧で、添加する混合液（上清：FB Buffer：イソプロパノール=2.5：1：1）の攪拌が不十分である。 混合液の液量比を守り、よく攪拌してから Spin Column へ添加する。</p> <p>TE (pH 8.0) を Spin Column へ添加するステップ⑮の溶出時間が短い場合、DNA 収量にばらつきが生じる。 室温で3分間静置してから遠心する。</p>
低濃度	<p>溶出液量が多い。 20 <math>\mu</math>l ~ 50 <math>\mu</math>l の TE (pH 8.0) で溶出すると DNA 濃度は高くなる。 ただし DNA の回収量は少なくなる。</p>
低純度	<p>ステップ④で、FE2 Buffer の混合が不十分、もしくはビーズビーティングや熱処理法によって溶液の温度が高いまま、FE2 Buffer を添加した。 温度が高いまま FE2 Buffer を添加すると、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 FE2 Buffer を添加し、十分に混合する。</p>
洗浄後もメンブレンに着色がある	<p>Spin Column の洗浄が不十分である。 ステップ⑭に進む前に、FB Buffer と FW Buffer による洗浄（ステップ⑩～⑬）を再度行う。</p>
得られた DNA 溶液を用いた実験がうまくいかない	<p>溶出した DNA 溶液中に FW Buffer（エタノール含有）が残留している。 FW Buffer で洗浄した後のステップ⑬では、カラムにろ液が付着しないよう慎重にコレクションチューブを取り外す。 カラムにろ液が付着した場合は、Spin Column を空回ししてから、次のステップで新しいチューブを装着する。</p> <p>糞便サンプル由来の酵素反応阻害物質が残留している。 得られた DNA 溶液を希釈して使用する。 糞便サンプル量を 0.2 g 以下に減らす。 トラブル「低純度」の原因と対策を参照。</p>
Beads Tube から FE1 Buffer が溢れる	<p>糞便サンプルの空隙体積が大きい。糞便サンプル量を 0.2 g より減らす。</p>

## VII データ

### 1. ヒト糞便 DNA 溶液のアガロースゲル電気泳動結果

本キットを用いて、0.2 g のヒト糞便サンプルから DNA 溶液を得た。吸光度測定値に基づいて定量した 200 ng のサンプルを 1% Agarose S/TAE ゲルで電気泳動した。

M 1 2 3 4 5 6

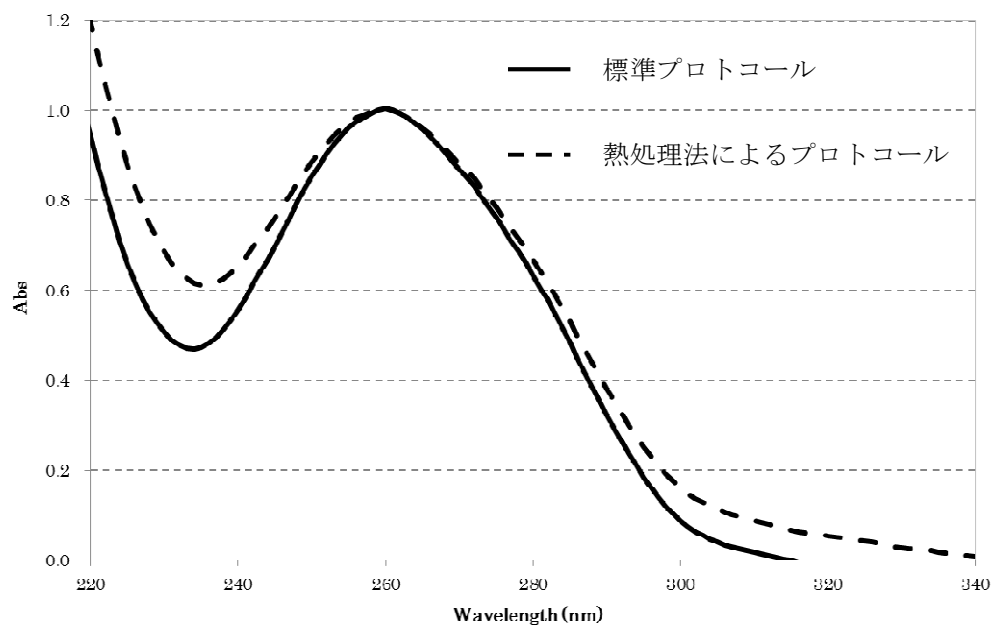


Lane M : OneSTEP Marker 6 (  $\lambda$ /StyI digest )

Lane 1-3 : 標準プロトコールで  
抽出した DNA 溶液

Lane 4-6 : 熱処理法によるプロトコールで  
抽出した DNA 溶液

### 2. ヒト糞便 DNA 溶液の吸収スペクトル



### 3. リアルタイム PCR 法による *Bifidobacterium* 属の検出

本キットを用いて、0.2 g のヒト糞便サンプルから DNA 溶液を得た。吸光度測定値に基づいて定量した 5 ng の DNA を鋳型に *Bifidobacterium* 属を検出するプライマー&プローブおよび DirectAce qPCR Mix plus ROX Tube (Code No:318-07751) を用いてリアルタイム PCR を行った。

PCR 装置 : ABI7500 Fast System (ThermoFisher Scientific 社)

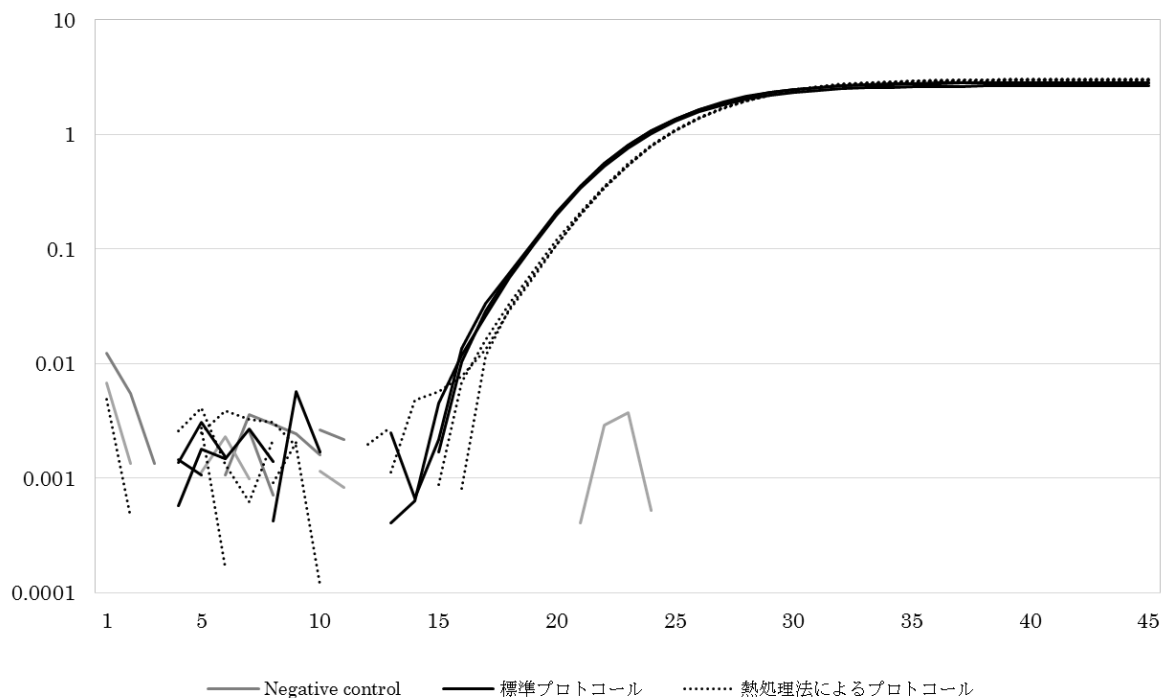
#### <リアルタイム PCR 組成>

2 × DirectAce qPCR Mix No ROX	12.5 μl
50×ROX Passive Reference	0.05 μl
25 μM each Primer Mix	0.5 μl
10 μM Probe (FAM/TAMRA)	0.5 μl
DNA 溶液 (2 ng/μl)	2.5 μl
<b>Total</b>	<b>up to 25.0 μl</b>

#### <リアルタイム PCR 条件>

95°C, 10 min  
 ↓  
 95°C, 30 sec } × 45 Cycles  
 60°C, 1 min }  
 ↓  
 融解曲線解析

#### <増幅曲線>



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

URL <http://www.nippongene.com/siyaku/>

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。