

商品名: Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2

商品コード: 212-006

容量: 50 回分

保存条件: 室温

※本品は室温・暗所(10~30℃)で保管してください。ただし、コンタミネーション防止のため本品開封後は冷蔵(2~10℃)で保管することをお奨めします。

※Bead Tubes は使用する直前までキャップを開けずに保管してください。

保存期限: 1 年

特徴:

Extrap Soil DNA Kit Plus は、土壌、活性汚泥などの環境試料から微生物 DNA を抽出・精製 するためのキットです。本製品は、広範な環境試料から高純度な DNA を高収率で回収できるため、環境試料に存在する微生物の群集構造解析やリアルタイム定量 PCR などのアプリケーションに適しています。

- ・菌体の破砕法としてビーズビートイングを採用しており、広範な微生物種の細胞を破砕して DNA を得ることができます。
- ・土壌粒子への DNA の吸着を抑制する独自の添加剤が含まれており、高い収率で DNA を回収することができます。
- ・DNA の精製に磁性ビーズを採用することにより、簡単な操作での DNA 精製を可能としました。
- ・フェノールやクロロホルム等の有機溶媒を使用しないため、安全にご使用いただけます。

キットの内容:

開封されましたら梱包内容、外観、数量、溶液等に異常がないかご確認ください。

コンポーネント	容量
Bead Tubes	50 本
Extraction Buffer	71 mL
Lysis Solution	4 mL
PP Solution	18 mL
MBs Solution	3 mL
Binding Solution	54 mL
Washing Solution	48 mL

※Extraction Buffer、Lysis Solution、Binding Solution、Washing Solution は結晶が析出する場合がありますが、品質に問題はありませぬ。結晶が析出した場合は、容器ごと 45~60℃程度で加温し、結晶を完全に溶解してください。

※Bead Tubes のチューブ内に水滴が見られる場合がありますが、品質に問題はありませぬ。

本製品以外に必要な試薬、器具、機器等：

1. 試薬

- ・70 %エタノール
- ・溶出液(TEバッファー、滅菌水等)

2. 器具

- ・マイクロピペット
- ・マイクロピペット用チップ
- ・1.5 mLチューブ
- ・2 mLチューブ
- ・マグネティックスタンド1.5 mL用

推奨製品： [#DD100 Magtrap <Magnetic Separator>](#)

3. 機器

- ・細胞破碎装置(2 mLチューブ対応)

推奨製品：FastPrepシリーズ(MP Biomedicals社製)、ビーズクラッシャー μ T-01(タイテック社製)

- ・ボルテックスミキサー
- ・遠心機(最大遠心力14,000 \times g以上)
- ・ヒートブロックまたはウォーターバス

注意：

- ・本製品の使用にあたっては、実験室での一般的な注意事項を厳守し、安全に留意してください。
- ・本製品は研究用試薬です。臨床検査、その他の目的に使用しないようご注意ください。
- ・取扱説明書の記載と異なるお取り扱いによるトラブルについては責任を負いかねます。
- ・試薬には皮膚を刺激する物質が含まれていますので、人によっては皮膚が荒れるなどの症状が出る場合があります。作業を行う際にはグローブを装着してください。
- ・容器の破損や異物が認められたものは使用しないでください。
- ・本品には、土壌へのDNAの吸着を抑制する独自の添加剤が既に含まれています。吸着防止剤として一般的に使用されるスキムミルク等を、さらに添加しないようにしてください。
- ・本キットは、真正細菌由来DNAがほとんど含まれていないため(本キットDNA抽出液 1 μ Lあたり、本キット由来16S rDNAが10コピー程度以下)、細菌含有量が少ない試料を対象にDNA抽出される場合でもご使用いただけます。
- ・Bead Tubesは使用する直前までキャップを開けないでください。
- ・チューブキャップのOリングが外れやすくなっている場合があります。キャップのOリングがついていることを確認の上ご使用ください。
- ・磁性ビーズのDNA吸着容量は、10~20 μ gです。試料中に含まれるDNA量がこれを超える場合は、DNA回収効率が低下しますので、試料の使用量を少なめにしてください。

プロトコル:

1. Bead Tubesに、環境試料0.5g(液体試料の場合は500 μ L)、Extraction Buffer 950 μ L、Lysis Solution 50 μ Lを添加する。
2. ボルテックスミキサーで5秒間攪拌する。
3. ビーズビーティング(4~6 m/秒または4,200 rpm~6,800 rpmで、30~45秒間)
4. 遠心(14,000 \times g, 5分, 4°C)
5. 上清600 μ Lを1.5 mLチューブに移し、PP Solution 300 μ Lを添加する。
6. 5のチューブを10回程度転倒混和し、攪拌。
7. 遠心(14,000 \times g, 5分, 4°C)
8. 上清800 μ Lを2 mLチューブに移す。
9. 8のチューブにMBs Solution 50 μ L、Binding Solution 890 μ Lを添加する。
10. 9のチューブを2分間程度転倒混和し、よく攪拌する。
11. 10のチューブをスピンドウンし、マグネティックスタンドにセットする。
12. 1分以上集磁したのち、マイクロピペットを使用して上清を除去する。
13. 12のチューブにWashing Solution 800 μ Lを添加し、ボルテックスミキサー(低速)で十分に攪拌する。
14. 13のチューブをスピンドウンし、マグネティックスタンドにセットして1分以上集磁したのち、マイクロピペットを使用して上清を除去する。
15. 70 %エタノール溶液1 mLを添加し、ボルテックスミキサー(低速)で十分に攪拌する。
16. 15のチューブをスピンドウンし、マグネティックスタンドで1分以上集磁したのち、マイクロピペットを使用してエタノールを除去する。
17. 15~16の工程を再度繰り返す。
18. チューブの蓋をあけたまま、室温で磁性粒子を10分間程度風乾する。
19. 溶出液(TEバッファー、滅菌水等) 100 μ Lを添加後、ボルテックスミキサー(低速)で十分に攪拌する。
20. 途中で数回攪拌しながら、65°Cのヒートブロック(またはウォーターバス)で5~10分間加温する。
21. マグネティックスタンドにチューブをセットして集磁したのち、溶出液を新しいチューブに移す。

操作の注意点:

(操作1)

コンポスト等の比重の軽い試料の場合、試料をプロトコルに記載の重量分(0.5 g)、Bead Tubesに添加しますと、Bead Tubes内において試料が占める割合が高まり、その結果、破砕ビーズの動きが制限され、細胞破砕が充分に行われず、DNA回収効率が低下する場合があります。上記の状況が想定された場合には、試料の添加量を、破砕ビーズの動きが制限されない程度に減らしていただいた上で、破砕を行って下さい。

(操作1)

菌体濃度が低いと予想される液体試料の場合、メンブレンフィルターを用いて試料中の微生物をろ過・捕捉し、このフィルターからDNAを抽出することをお奨めします。具体的な工程は、まず液体試料を市販のメンブレンフィルターにてろ過します。次に、ピンセット等を用いて、ろ過済のメンブレンフィルターをBead Tubesに挿入します。その後は通常のプロトコルに従い抽出作業を行います。

(操作12)

上清にはPCR阻害物質が含まれていますので、上清をできる限り取り除いてください。ただし、黒い磁性粒子にはDNAが吸着されていますので、磁性粒子を除去しないようご注意ください。

(操作16)

エタノールは、1000 μ Lのピペットチップを使用して大部分を除去した後に、100 μ L以下の容量のピペットチップを使用してできる限りしっかりと取り除いてください。エタノールが残っていると、以降の工程でDNAが溶出しにくくなり、DNAの回収量が低下する恐れがあります。

(操作18)

エタノールが残らないよう、できる限り取り除いてから風乾してください。磁性粒子は風乾してもサラサラになりませんが、そのまま溶出液を添加してください。

(操作19~21)

溶出液を添加すると、DNAが溶出液中に溶出します。