

FASMAC

ヨーネ菌 DNA 抽出キット

ヨーネ・ピュアスピン

商品コード: D011-N

取扱説明書

目次

- I. 製品説明
- II. キット内容
- III. 保存
- IV. 本キット以外に必要な機器など
- V. プロトコール（牛糞便からのヨーネ菌 DNA 抽出）
- VI. プロトコールの簡易フロー
- VII. 使用上の注意
- VIII. 参考文献

I 製品説明

本製品は、ビーズ式破碎と界面活性剤の作用によって、ヨーネ菌 (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) から DNA を回収するための抽出キットです。本製品には、DNA の回収に必要な試薬を全て含んでいるため、別途試薬を用意していただく必要がございません。また、本製品は、既存の方法に比べ牛糞便由来の PCR 法に対する阻害物質の影響が少ない精製 DNA を得ることが可能となっています。

【 ヨーネ・ピュアスピンの特徴 】

- ① ヨーネ菌から、DNA を効率良く回収・精製することができます。
- ② 牛糞便由来の PCR 法に対する阻害物質を除去し、精製度の高い DNA を得ることができます。
- ③ ビーズ式破碎に用いるビーズを、チューブに小分けして提供します。煩雑な小分け操作の必要はありません。
- ④ 人体に有害なフェノールやクロロホルム等の有機溶媒を使用しません。
- ⑤ DNA の精製ステップで、一般に使用されるアルコール沈殿を行う必要がありません。
- ⑥ 回収した DNA は、そのまま real-time PCR 法や LAMP 法[†]等の増幅反応に使用することが可能です。

[†] 本製品は、real-time PCR 法や LAMP 法に関する特許使用許可を示唆するものではありません。

II キット内容

包装単位：100 回用

	名 称	容 量	数 量
I	抽出液 ①-A	50 ml	1 本
II	抽出液 ①-B	25 ml	1 本
III	抽出液 ②	8.5 ml	1 本
IV	吸着液 ③	50 ml	1 本
V	洗浄液 ④	70 ml	1 本
VI	溶出液 ⑤ (TE Buffer)	5 ml	1 本
VII	Beads Tube	50 本	2 袋
VIII	Spin Column	50 本	2 袋
IX	Collection Tube	50 本	2 袋
X	取扱説明書	—	1 部

III 保存

- ・ 室温 (15°C ~ 25°C) で保存してください。
- ・ 吸着液③、洗浄液④には、揮発性の高い イソプロパノール、エタノールがそれぞれ含まれています。ご使用後は、蒸発を防ぐために必ず蓋を閉めてください。

IV 本キット以外に必要な機器など

- ・ 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
- ・ 50 ml 遠沈管
- ・ 15 ml チューブ(プール糞便から DNA を抽出する場合)
- ・ ビーズ式破砕機(マルチビーズショッカーなど、ヨーネ病検査マニュアル参照)
- ・ 遠心分離機
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ タイマー

V プロトコール (牛糞便からのヨーネ菌 DNA 抽出)

- (1) 牛糞便 1 g を 50 ml 遠沈管に採取し、滅菌蒸留水を 20 ml 添加、ボルテックスミキサー等で激しく混合攪拌した後、30 分間静置する(牛糞便懸濁液)。
- (2) 付属の **Beads Tube (2.0 ml ビーズチューブ)** に、(1)の 牛糞便懸濁液 の上清より 1 ml を移し、遠心(20K×g, 5 分間, 室温)した後、その上清を除去する。
- (3) (2)の **Beads Tube** に 400 μl の **抽出液 ①-A** を添加する。
- (4) ビーズ式破砕機に(3)の **Beads Tube** をセットし、「4,000 rpm、2 分間」の条件で破砕する。
 - * 上記破砕条件は、マルチビーズショッカーを使用した場合です。他の破砕機を使用される場合は、ヨーネ病検査マニュアル記載の条件に従ってください。
- (5) 遠心(20K×g, 5 分間, 室温)し、上清を新しい 1.5 ml マイクロチューブ(別途準備)へ移す。
 - * 多少ビーズを吸ってもよいので、上清はできるだけ多く回収してください。
 - * (6)で添加する抽出液 ①-B を新しい 1.5 ml マイクロチューブに予め分注しておき、そこに上清を移しても良い。
- (6) 200 μl の **抽出液 ①-B** を添加し、よく混和する(ボルテックスあるいはピペッティング)。
- (7) 75 μl の **抽出液 ②** を添加し、直ちに 10~12 回チューブを転倒し、よく混和する。
- (8) 遠心(20K×g, 10 分間, 室温)する。
- (9) 上清 500 μl を新しい 1.5 ml マイクロチューブ(別途準備)に移す。
 - * (10)で添加する 吸着液 ③ を新しい 1.5 ml マイクロチューブに予め分注しておき、そこに上清を移しても良い。
- (10) 400 μl の **吸着液 ③** を添加し、完全に均一になるまでよく混和する(転倒混和あるいはピペッティング)。
- (11) (10)の混合液 900 μl を 付属の **Spin Column(スピнкаラム)** に移し、遠心(13K×g, 60 秒間, 室温)する。遠心後、**Spin Column** を新しい **Collection Tube** にセットする。
- (12) 600 μl の **洗浄液 ④** を (11)で使用した **Spin Column** に添加した後、遠心(13K×g, 60 秒間, 室温)する。
- (13) (12)の **Spin Column** を新しい 1.5 ml マイクロチューブ(別途準備)にセットする。
- (14) 50 μl の **溶出液 ⑤** を(13)の **Spin Column** に滴下した後、3 分間室温で静置する。
- (15) **Spin Column** を遠心(13K×g, 60 秒間, 室温)し、濾液を回収する。

(牛プール糞便の作製および DNA 抽出)

- (1) 個体別に牛糞便およそ 1 g を 50 ml 遠沈管に採取し、滅菌蒸留水を 20 ml 添加、ボルテックスミキサー等で激しく混合攪拌した後、30 分間静置する(個別糞便懸濁液)。
- (2) 新しい 15 ml チューブに、(1)の 個別糞便懸濁液 の上清より 1 ml を移し、プールする。
* プール数は 10 検体までとする。
- (3) 遠心(900×g、30 分間、室温)し、上清を 1.5 ml 残して除去した後(プール数が 10 検体の場合は、上清約 8.5 ml を除去する)、沈渣を残した上清で再懸濁する。
- (4) 付属の **Beads Tube(2.0 ml ビーズチューブ)** に、(3)の懸濁液を全量移し、遠心(20K×g、5 分間、室温)した後、上清を除去する。

以降は、プロトコール(牛糞便からのヨーネ菌 DNA 抽出)の(3)以降に従う。

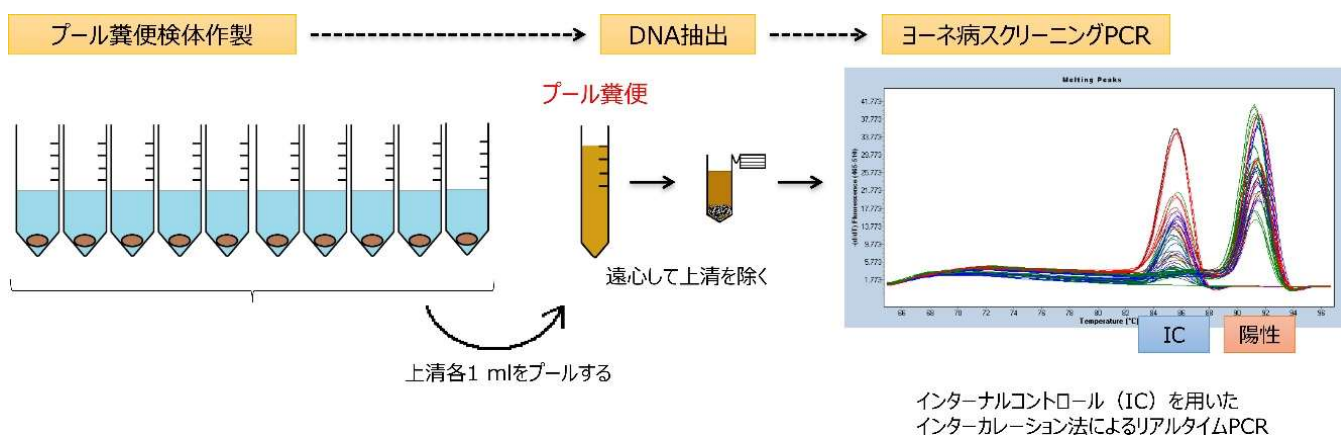
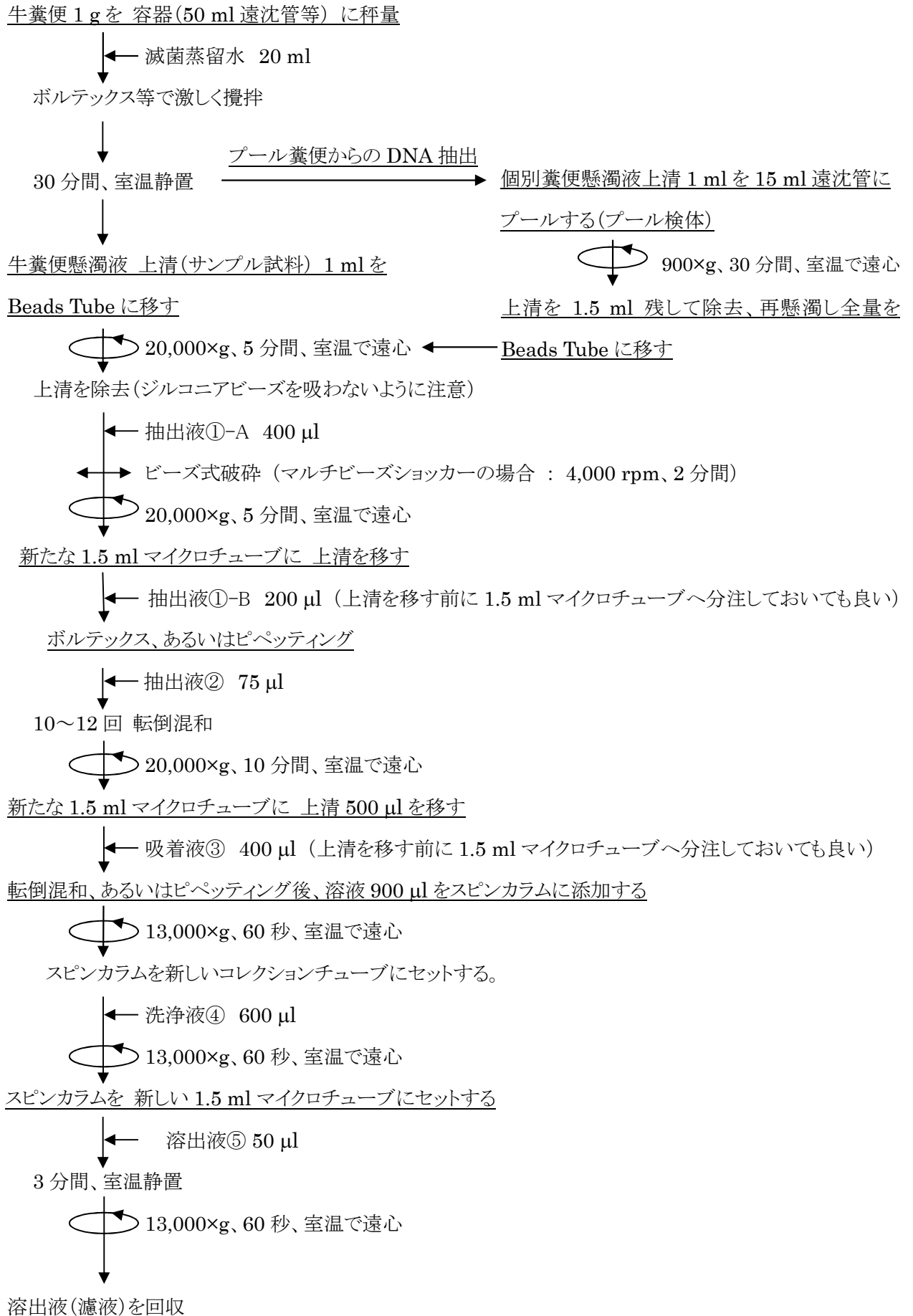


図. プール糞便を用いたヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法の概要

農研機構 動物衛生研究部門ホームページより引用
<https://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/paratuberculosis/index.html>

VI プロトコールの簡易フロー



[補 足 説 明]

本製品のプロトコールで指定している遠心力に対応した遠心分離機をお持ちでない場合は、お手持ちの遠心分離機の最高速度で遠心分離を行い、遠心時間については、以下の式を参考に算出してください。

遠心時間(分) = (プロトコール指定の遠心加速度(×g) × プロトコール指定の遠心時間(分)) / 実際の遠心加速度(×g)

例) 7分間 ≒ 20K×g × 5分間 / 15K×g

VII 使用上の注意

- (1) 本製品はヨーネ菌の DNA を抽出するためのキットです。その他の目的にはご使用になれません。
- (2) 試薬についての基礎的な知識のある方以外は、取り扱いわないでください。
- (3) 本製品の使用にあたっては、取扱説明書の記載内容どおりに行ってください。
- (4) 取扱説明書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。
- (5) 本製品外箱には使用期限が表示されております。使用期限を守ってご使用ください。
- (6) 廃棄方法は、国または地方自治体の条例に従ってください。

※ 素材 : チューブ(PP)、スピncラム(PP)、ボトル(PP)、ビーズ(ジルコニア)、ラベル(PET)、外箱(紙)、マニュアル(紙)

- (7) **MSDS** の記載内容をご一読の上、ご使用ください。なお、**MSDS** につきましては、弊社 HP (<http://www.fasmac.co.jp/>) よりダウンロードして入手願います。

VIII 参考文献

- 1) ヨーネ病検査マニュアル、ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門
<https://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/paratuberculosis/index.html>

本製品は国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構、株式会社ニッポンジーン、株式会社ファスマックが所有する特許のライセンスを受けて製造販売しています。

発売元：**FASMAC** 株式会社ファスマック

お問い合わせ先：株式会社ファスマック 遺伝子検査事業部

〒243-0041 神奈川県厚木市緑ヶ丘 5-1-3 TEL:046-295-8787 FAX:046-294-3738