

Maxwell[®] RSC Fecal Microbiome DNA Kit (カタログ番号 AS1700) 簡易マニュアル

ご用意いただくもの

- ボルテックスミキサー
- ピペットマン (P-20、P-200、P-1000)とそれらのチップ
- 95℃に設定したヒートブロックインキュベーター
- 56℃に設定したヒートブロックインキュベーター
- (オプション) ジルコニアビーズもしくはシリカビーズ (直径 0.1~0.7mm)

サンプルの調製手順

1. 100~300mgの糞便を2ml遠心チューブに移す。
2. 1ml Lysis Bufferと40μl Proteinase K Solutionを加え、30秒間のボルテックスにより十分に攪拌する。
3. 95℃のヒートブロックで、5分間のインキュベーションを行う。
4. ヒートブロックから取り出し、室温において、2分間のクールダウンを行う。
5. 1分間のボルテックスにより完全に攪拌する。
6. 56℃のヒートブロックで、5分間のインキュベーションを行う。
7. このインキュベーションの間に、3ページ目の「カートリッジの準備と精製工程」を進める。
8. インキュベーション後、最高速度 (> 10,000 ×g)で室温、5分間の遠心を行う。

サンプルの調製手順（ビーズ破碎を使った場合）

1. 300mg以下の固形サンプル、または600μl以下の液状サンプルをビーズ破碎チューブに加える。
2. 1ml Lysis Bufferと40μl Proteinase K Solutionを加え、キャップを固く締める。
3. ビーズ破碎チューブをボルテックスに水平方向にセットする。

最高速度(〜3,000rpm)で30分間のビーズ破碎を行う。

※ 高速の破碎機器をご使用場合は、3〜5分毎に冷却が必要です（チューブの破損やDNAの断片化を防ぐため）。

4. 95℃のヒートブロックで、5分間のインキュベーションを行う。
5. ヒートブロックから取り出し、室温において、2分間のクールダウンを行う。
6. 1分間のボルテックスにより完全に攪拌する。
7. 56℃のヒートブロックで、5分間のインキュベーションを行う。
8. このインキュベーションの間に、3ページ目の「カートリッジの準備と精製工程」を進める。
9. インキュベーション後、最高速度 (> 10,000 ×g)で室温、5分間の遠心を行う。

カートリッジの準備と精製工程

1. 検体数分のカートリッジをMaxwell® RSC/CSC Deck Trayに立て、順にそのアルミシールを剥がす。

カートリッジの両端がカチッというまで、しっかりとセットする

注意：サンプル数が16より少ない場合には、Trayに左右バランスよく置いてください。

2. 同数のElution Tubeをセットし、100µlのElution Bufferを加える。

Elution Tubeはグッと強く一番下まで押し込んでください。

Elution Bufferの量を減らした場合、磁性ビーズの持ち込みの割合が高くなることが予想されるため、**標準として100µl Elution Bufferでの溶出をお勧めします。**

また、Elution Tubeのフタは絶対に閉めないでください。

3. カートリッジのウエル8に、プランジャーを置く。

4. 300µlのBinding Bufferを同じくカートリッジのウエル#1に加える。

ウエル1は最も大きなウエルです。カートリッジラベルに一番近く、Elution tubeからは最も遠い位置にあります。



5. 20µlのRNase Aをカートリッジのウエル#3に加える。

6. 遠心後の上澄みから300µlだけを取って、カートリッジのウエル#1に加える。

数回のピペッティングにより攪拌してください。

遠心チューブの底にある固形物および液体表面にある油分は加えないようにしてください。

7. Maxwell® RSC/CSC Deck TrayをMaxwell® RSC Instrument本体にセットし、精製操作をスタートする。

精製終了後

1. Maxwell® RSC/CSC Deck Trayを取り出す。Elution Tubeのフタを閉め、適切に保管する。

磁性体ビーズの混入がみられた場合、10,000×gで2分間の遠心操作により除くことができます。

2. カートリッジおよびプランジャーを廃棄する。