

# PEN-1000 Series 気道検体用

(500ul の気道検体の核酸を10倍に濃縮精製)



BindSol



WashSol



ElutSol

## StepA:前処理

鼻スワブ、唾液500ulを採取し 25ul of **ProteinaseK (10mg/ul)**を加え、加熱ブロックに入れ、55°C で3分処理。その後500ul **BindSol**を加え97°C で2分間熱処理する。



ProteinaseK Heat at 97°C  
At 55°C for 2 min.  
for 3min.

うがい液や喀出痰を材料とする場合は喀痰と等量の10%DTT液を加えし、室温で15分まち、喀痰を水溶化し上澄み500ulを検体として使用する。

## StepB:精製濃縮

**Column1000** を 1ml 容積のPipetteもしくは5mlの注射器に装着する。加熱処理した検体/BindSol 混合液1mlをゆっくりと吸い上げ、ゆっくりと押し出して元の容器に戻す。この操作をもう一度繰り返してカラムに核酸を吸着させる。

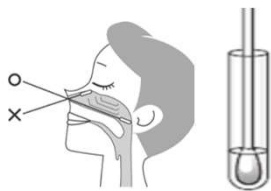
次のWashSol1000ul がはいたTubeから液を吸い上げ、全量をWashSol tubeの入った Tubeに戻す。次に新しいWashSol がはいたTubeから再び同じ操作をして、カラムを洗浄する。

洗浄が終了したら、カラムを乾燥させたのち、50ulのElutSolをゆっくりと吸い上げ、ゆっくりと吐出する。この吸引・吐出をもう一度繰り返して、50ulの10倍濃縮核酸液を回収する。回収液はそのまま遺伝子検査に使用できる。



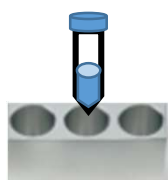
# StepA. 500ul の検体の前処理

## 1. 綿棒採取検体



1. 500ul の生理食塩水がはいったTube綿棒を入れ攪拌後、液を綿棒から搾り取り、500ulを確保する。
2. 25ulのproteinaseK(10mg/ml). を加え、55 °C、3分間、加熱
3. 加熱が終了後、500ul BindSol を加え97°Cでさらに2分間加熱し、酵素と病原体を完全に不活化する。
4. Step B の精製工程に移動する。

### Collect Nasal Swab specimen



Heat at 97°C

Heat



Heat Treated BindSol.  
Move to StepB.

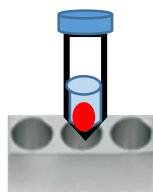
## 2. 唾/口腔洗浄液



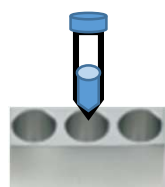
1. 唾液・口腔洗浄液を採取する。500ul をEppendorf Tubelに移す。
2. 25ulのproteinaseK(10mg/ml). を加え、55 °C、3分間、加熱.
3. 加熱が終了後、500ul BindSol を加え97°Cでさらに2分間加熱し、酵素と病原体を完全に不活化する。
4. Step B の精製工程に移動する。



Collect saliva/mouth wash liquid



ProteinaseK at 55°C



Heat at 97°C

Proteinase/Heat



Heat Treated BindSol.  
Move to StepB.

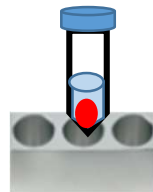
## 3. 膿性のうがい液・喀出痰



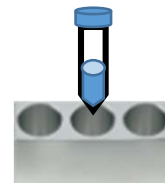
1. うがい液・喀出痰に等量の 10%DTT 液を加え、時折攪拌しながら約15分待ち、500ul をEppendorf Tubelに移す。
2. 25ulのproteinaseK(10mg/ml). を加え、55 °C、3分間、加熱.
3. 加熱が終了後、500ul BindSol を加え97°Cでさらに2分間加熱し、酵素と病原体を完全に不活化する。
4. Step B の精製工程に移動する。



Mix with equal volume 10% DTT to liquefy mucoid sputum



ProteinaseK at 55°C



Heat at 97°C

DTT/Proteinase/Heat



Heat Treated BindSol.  
Move to StepB.

# PEN-1000 Series , 500ul 気道検体用 (10 times condensed sample preparation)

1ml pipette に Column1000を装着し、Pipetteの目盛りを1mlにセットする。



1ml Pipette

Column 1000

Step1.

加熱処理した 1000ul BindSol-検体混合液をゆっくりとカラム内に吸い上げる。次にゆっくりと全液をもとのTubeに吐出する。この操作をもう一度繰り返す。



2ml Volume capless  
Eppendorf tube

1ml BindSol-  
specimen Mix.

Step2.

1ml WashSol. がはいったTubeに移動し、吸引し、1ml全量を同じTubeに吐出する。この操作をもう一度繰り返す



1ml WashSol

Step3.

新しい 1ml WashSol. がはいったTubeに移動し、1ml全量を吸引し、全量を同じTubeに吐出する。この操作をもう一度繰り返す。



1ml WashSol

Step4.

Step3のアルコールを完全に押し出し、カラムを乾燥させる。55°Cの過熱ができる環境があれば数分間カラムを乾燥させ、アルコールを飛ばす。

Dry the column

Step5.

50ulのElutSol を空気を吸い込まないように、ゆっくりと吸引し、ゆっくりと吐出する。この操作をもう一度、繰り返し50ulの吐出液を回収する。吐出液はそのままPCRやRT-PCRなどの遺伝子検査に使用できる。



50ul ElutSol

# PEN-1000 Series, 500ul 気道検体の精製

(5mlの使い捨てSyringeを使った核酸の10倍濃縮手順)

Column 1000 を使い捨ての 5ml Syringe に装着  
(Column1000は1mlのEppendorf Pipetteに合うようにつくられているので、結合には針の先端を切断し、Siricon Tubeで隙間を埋める必要がある)



5ml Syringe

Column 1000

## Step1.

加熱処理した 1000ul BindSol-検体混合液をゆっくりとカラム内に吸い上げる。次にゆっくりと全液をもとのTubelに吐出する。この操作をもう一度繰り返す。



2ml Volume capless Eppendorf tube

1ml BindSol-specimen Mix.

## Step2.

1ml WashSol. がはいったTubeに移動し、吸引し、1ml 全量を同じTubelに吐出する。この操作をもう一度繰り返す。



1ml WashSol

## Step3.

新しい 1ml WashSol. がはいったTubeに移動し、1ml 全量を吸引し、全量を同じTubelに吐出する。この操作をもう一度繰り返す。



1ml WashSol

## Step4.

Step3のアルコールを完全に押し出し、カラムを乾燥させる。Syringe の目盛り5mlまで空気を吸い上げ、一気に吐出する。この操作を複数回繰り返してカラムを乾燥させる。

Dry the column

## Step5.




50ulのElutSol を空気を吸い込まないように、ゆっくりと吸引し、ゆっくりと吐出する。この操作をもう一度、繰り返し50ulの吐出液を回収する。吐出液はそのままPCRやRT-PCRなどの遺伝子検査に使用できる。



50ul ElutSol

# PEN-1000 Series 試薬

## (500ul 検体処理用m100tests)

試薬の種類	1回使用量	備考	
<b>BindSol</b> 50ml	500ul	GuanidiumHCl がはいった核酸の結合液。触れると皮膚を刺激するため、手袋を使用して操作する。室温で直射日光を避けて保存	 50ml
<b>WashSol</b> 200ml	1000ul	90% ethanol , PH7.5.がはいったカラム洗浄液 室温保存	 200ml
<b>ElutSol</b> 20ml	50-100ul	ElutSol(PH8.0)は4°Cで保存。核酸をカラムから溶出させる。滅菌済み	 20ml

### 抽出に必要なその他の機器、消耗品(1回分)

- 1) 1回分のBindSolを入れる2mlの蓋無しEppendorf Tube (3本)
- 2) 精製核酸保存用500ulのScrew cap Tube【1本】
- 3) Silica1000 Column: 1本(Kyoto Monotechから購入)
- 4) Proteinase K(10mg/ml) : 宝バイオ、Promegaから入手)
- 5) DTT(10%)液
- 6) 使い捨て5ml Syringe と結合用 Device
- 7) 1ml のPipette
- 8) 2ml用のアルミブロック(55°C・97°Cの加熱に使用)