

新製品 PEN Series 検体濃縮キット

PEN シリーズ試薬は低濃度の DNA や RNA 断片を含む検体の核酸を高濃度に濃縮して遺伝子検査に使用するためのキットです。使い捨て注射器、Silica Tip Colum を用いて濃縮するため、遠心機や吸引機器は不要で、屋外でも使用できます。

■市場の抽出キットと比べた優位性について

- ・高い濃縮率(10 倍、25 倍、50 倍)
- ・遠心機や吸引機器が不要なので養殖水や河川水など屋外検査にも使用もできます。
- ・濃縮精製操作が 10 分から 15 分で完了します。

■使用にあたっての注意事項

- ・キットは 1 検体処理で多検体処理は現状ではできませんが、ピペットやシリンジ操作だけで抽出精製ができるので自動化機器に応用するのに便利な試薬です。
- ・低濃度のフリーDNA, RNA あるいはウイルス検体を濃縮する専用キットです。
- ・浮遊物や細菌等で混濁している試料はカラムが詰まります。透明な試料でも 0.45uM のフィルターで濾過して使用してください。
- ・目的がグラム陽性菌や真菌の場合、Proteinase K + SDS 加熱処理だけでは十分に溶菌できないことが多いので、煮沸処理や、当社の MORA-EXTRACT に使用されているビーズ破碎法で菌体を破碎してから濃縮キットをお試ください。

低濃度核酸濃縮精製キット PENシリーズ

低濃度核酸(100copies/ml以下)に最適化した核酸濃縮精製試薬。SinglePrepは屋外使用に最適化, MultiPrepは大規模検査に最適化



SinglePrep 核酸10倍濃縮精製試薬(1test)

MultiPrep 核酸10倍濃縮精製試薬(100tests)

- 5mlの専用SyringeとColumn1000を使用
- 検体0.5mlを50 μ lに濃縮精製し,合成Actin遺伝子6copies/0.5mlをPCRで検出
- Column1000は提供手順で精製した大腸菌DNA 0.5 μ g/mlを99%以上吸着(ProK/Heat処理後)

SinglePrep 核酸25倍濃縮精製試薬(1test)

MultiPrep 核酸25倍濃縮精製試薬(100tests)

- 5mlの専用SyringeとColumn1000を使用
- 検体1mlを40 μ lに濃縮精製し,合成Actin遺伝子6copies/mlをPCRで検出
- Column1000は提供手順で精製した大腸菌DNA 0.5 μ g/mlを99%以上吸着(ProK/Heat処理後)

SinglePrep 核酸50倍濃縮精製試薬(1test)

MultiPrep 核酸50倍濃縮精製試薬(100tests)

- 10mlの専用SyringeとColumn1000を使用
- 検体2mlを40 μ lに濃縮精製し,合成Actin遺伝子4copies/2mlをPCRで検出
- Column1000は提供手順で精製した大腸菌DNA 1 μ g/2mlを99%以上吸着(ProK/Heat処理後)

SinglePrep 核酸濃縮精製試薬(1test)



種類	本数
Proteinase K	1Tube/1回
BindSol（青）	1Bottle/1回
WashSol（白）	1Bottle/1回
EluteSol	1Tube/1回
Syringe	1本/1回
Column1000	1本/1回
2ml EppenTube	1Tube
1ml EppenTip	1Tip

その他必要なもの:2ml用のHeatblockヒーター、
200ulのPipetteとチップ

MultiPrep 核酸濃縮精製試薬(100tests)



種類	本数・回数
Proteinase K	1Tube/100回
BindSol	1Bottle/100回
WashSol	1Bottle/100回
EluteSol	1Tube/100回
Column1000	100本/100回
Syringe (Option)	100本/箱
2ml丸底Tube (Option)	1000本/箱

その他必要なもの:2ml用のHeatblockヒーター、
200ulのPipette とチップ

MultiPrep25倍核酸濃縮精製試薬

(1ml 検体処理用；100tests)



キットに含まれる物	1回使用量	備 考
BindSol (100ml)	1ml	核酸の結合液。皮膚刺激、手袋を使用して操作。室温遮光保存
WashSol (200ml)	1mlx2本	試薬納入後99.5%の特級ethanolを180ml加えて使用可能なWashSolとする。
ElutSol (5ml)	40ul	4℃で保存。核酸をカラムから溶出させる。
Column1000 (100本)	1本	核酸吸着用カラム
ProteinaseK 0.5ml (20mg/ml)	5ul	検体の蛋白分解 長期保存には4-8℃

購入が必要な必需品	1回使用量	備考
5ml Feeder Syringe (100本/箱)	1本	核酸吸着カラムに装着して使用する専用シリンジ
2ml丸底EppenTube (1000本/箱) 1キット400本使用	4本	検体の加熱処理、吸着、洗浄過程で使用

抽出に必要なその他の機器、消耗品

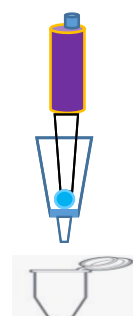
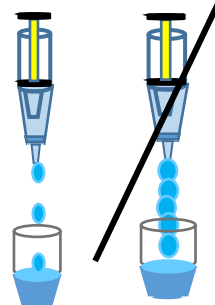
- 1) 精製核酸保存用500ulのScrew cap Tube (100本)
- 2) DTT(10%)液；膿性で粘着性痰が検体の時に必要になる。
- 3) 200ul のPipetteとチップ200本
- 4) 特級試薬エタノール(180ml)
- 5) 検体の煮沸処理用2mlのヒートブロック付ヒーター
- 6) その他、検体採取用綿棒、喀痰喀出用の紙コップ

MultiPrep25倍濃縮精製 (1ml検体を40ulに濃縮精製)

低濃度の核酸(1ug以下の遊離核酸, ウイルス, 細菌)を含んだ検体1mlをカラム1000に吸着させ, 40ulで溶出して, 核酸を25倍濃縮するキット



1. 1mlの検体を2ml 容積のEppendorf tubeに採取する。室温で ProteinaseK(10mg/ml)を 5ul 添加し、混合したのち温度を100℃に上げ、煮沸し、3分間保つ。(＊蛋白混入が多いと予測される場合はProteinaseK添加後、55℃で3分でたんぱく分解し、沸騰水に入れてさらに3分保ち酵素を不活化すれば蛋白分解がより確実にすむ)
2. 煮沸処理水にBindSol 1ml を加え、転倒混和する。
3. 5ml の専用syringeにColumn1000を装着し、加熱処理検体を全量をゆっくりとSilica面の上まで吸い上げ、全量をゆっくりと押し出し、カラムのSilicaに核酸を吸着させる。同じ吸引・吐出をもう一度繰り返す。(＊カラムの先端から水滴が独立して落ちる程度の力で押し出す。水滴が連結して出るような強い力で押し出すと核酸のカラムへの結合率が悪くなる。)
4. WashSol 1mlを2本の2ml容積のEppendorf Tubeに分注する。
5. 1本目のWashSolをカラム付きシリンジに吸い上げ、吐出しカラムを洗浄する。同じWashSolでもう一度吸引/吐出してカラムを洗う。
6. 2本目のWashSolを再びカラムに吸い上げ、吐出してカラムに付着したBindSolを洗浄する。
7. Syringeに最大メモリまで空気を吸引し、強く押し出す。この工程を5-10回繰り返す、カラムに付着したアルコールと水分を完全に押し出し、カラムを乾燥させる。(＊カラム内に水分が残存している場合、カラムをシリンジから取り外し、55℃で数分温めると水分は除去される)
8. カラムをSyringeから取り外し、Pipetteで40ulのElutSolをカラム内のSilica膜の上に滴下し、約5分待機して、シリンジを再装着し、EluteSolを核カラムから押し出し、核酸をシリカから遊離させる。



実施例 1. カラム吸着率: 大腸菌から抽出した染色体DNA 500ngを1mlのTE bufferに懸濁し、検体として、上記の手順でProteinaseK 処理、煮沸処理したのち、BindSol500ul と混合して、カラムに吸着させた。カラムを一回通過させた液のDNA濃度を測定したところ99%以上のDNAが吸着していた。

実施例2. 蛋白の混入とカラム吸着: 1mlのTE bufferに500ngの大腸菌DNAと500ugのAlbuminを加え検体とした。この検体を上記手順でProteinaseK-加熱処理してカラムを通過させた場合と、ProteinaseK, 煮沸処理を省いて、カラムを通過させた。除蛋白工程して吸着させた場合に比べて、除蛋白しなかった方法ではカラムへの核酸の吸着量は4～5割に低下していた。

実施例3. 検出限界: Actin 遺伝子配列の一部110bpを合成し、6copies/mlの溶液を作成した。この溶液10ulをActin primer で増幅を試みたが陰性であった。この溶液1mlを上記精製濃縮プロトコールにしたがって濃縮精製し最終的に40ulのDNA液を回収した。この液の10ulをPCRに使用したところ、Actin の増幅が確認できた。

SinglePrep25倍核酸濃縮精製試薬

(1 ml 検体処理用；1test)



キットに含まれるもの	1回 使用量	備 考
BindSol (1ml) (青)	1ml	核酸の結合液。皮膚刺激性があるので、手袋を使用して操作。使用前に内Capを取り外す。
WashSol (2ml) (白)	2ml	カラムの洗浄液。使用前に内Capを取り外し廃棄する。
Column1000	1本	核酸吸着用カラム。Syringeの先端に装着して使用する。
5ml Syringe	1本	核酸吸着カラムColumn1000を装着して使用する。
ElutSol (100ul)	40ul	4℃で保存。核酸をカラムから溶出させるために40-50ul使用、
ProK (200ulのPCR tubeに10ul)	10ul	検体の蛋白分解。ProKは10ulが200ulのPCRTubeに入っている所以検体の一部(約100ul)を加えてTube内の酵素を全量回収する。長期保存には4～8℃保存
2ml EppenTube	1本	検体加熱処理容器で、55と100℃の加熱に使用する。
1ml EppenTip	1本	検体を2mlのEppenTubeに移す際、Syringeの先端に付けて使用

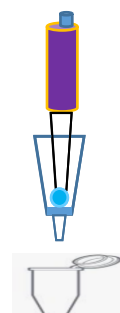
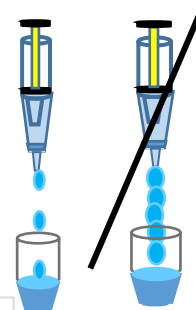
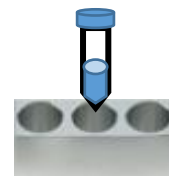
抽出に必要なその他の機器、消耗品

- 1) 200ulのPipetteと2 Tip s (ProKを検体Tubeに移す際と、カラムにEluteSol40-50ulを加える際に使用)。
- 2) 2ml 丸底EppenTube用のヒートブロックとヒーター (50-100℃)
- 3) その他、検体採取用の綿棒、喀痰の喀出用の紙コップ
- 4) 10%DTT液；粘性の高い喀出痰を検査材料として使用する場合、喀痰と等量加えて室温で10-15分保ち、粘度を低下させるために使用

SinglePrep25倍核酸濃縮精製試薬 (1ml検体を25倍濃縮精製)

低濃度の核酸(1ug以下の遊離核酸, ウィルス, 細菌)を含んだ検体0.5mlをカラム1000に吸着させ、50ulで溶出して、核酸を10倍濃縮するキット

1. 1mlの検体を2ml 容積のEppendorf tubeに採取する。ProK(20mg/ml) 10ulを添加し、混合したのち温度を55℃に3分保ち、次に100℃で2分間保つ。
2. BindSol 1ml がはいった容器の内Capを取り外し、加熱処理した検体を全量加え混和する。
3. 5ml SyringeにColumn1000を装着し、加熱処理検体を全量Silica面の上まで吸い上げ、全量をゆっくりと押し出し、カラムのSilicaに核酸を吸着させる。 同し吸引・吐出をもう一度繰り返す。*カラムの先端から水滴が独立して落ちる程度の力で押し出す。水滴が連結して出るような強い力で押し出すと核酸のカラムへの結合率が悪くなる。
4. WashSol1mlの内蓋を取り外し、カラム付きシリンジ内に吸引、吐出しカラムを洗浄する。
5. 残りのWashSolをシリンジ内に吸い上げ、吐出しカラムを洗浄する。
6. シリンジ内に5ml空気を取り込み、強く押し出す。この工程を5-10回繰り返す、カラムに付着したアルコールと水分を完全に押し出し、カラムを乾燥させる。
(*カラム内に水分が残存している場合、カラムをシリンジから取り外し、 55℃で数分保つと乾燥する)
7. カラムをシリンジから取り外し、Pipetteで40-50ulのElutSolをカラム内のSilica膜の表面に滴下し、約3分待機する。ElutSol がはいっていた残りの液をTubeから廃棄し、溶出液を入れるTubeとして準備する。
8. Column をSyringe に再装着し、ElutSolをカラムからゆっくりと押し出し、核酸をシリカから遊離させる。押し出したElutSolはもとのScrewCapTubeに移し、遺伝子検査用として保存する。



実施例1. カラム吸着率:

大腸菌から抽出した染色体DNA 500ngを500ulのTE bufferに懸濁し、検体として、上記の手順でProteinaseK 処理、煮沸処理したのち、BindSol500ul と混合して、カラムに吸着させた。カラムを一回通過させた液のDNA濃度を測定したところ99%以上のDNAが吸着していた。

実施例2. 検出限界:

Actin遺伝子配列の一部110bpを合成し、6copies/mlの溶液を作成した。この溶液10ulをActin primer で増幅を試みたが陰性であったが、この溶液500ulを上記精製濃縮プロトコールにしたがって濃縮精製し最終的に50ulのDNA液を回収した。この液の10ulをPCRに使用したところ、Actin の増幅が確認できた。

実施例3. 蛋白の混入とカラム吸着:

500ulのTE bufferに500ngの大腸菌DNAと500ugのAlbuminを加え検体とした。この結滞を上記手順でProteinaseK-加熱処理してカラムを通過させた場合と、ProteinaseK-煮沸処理を省いて、カラムを通過させた。除蛋白工程して吸着させた場合に比べて、除蛋白しなかった方法ではカラムへの核酸の吸着量は4割に低下していた。