

GM quicker 3

- GMO DNA Extraction Kit
for Processing food -

マニュアル
Ver. 3.0

Code No. 311-07241



ニッポン・ジーン

目次

I 製品説明	2
II キット内容	2
III 保存	3
IV 使用上の注意	3
V JAS 法表示品目に対応したプロトコールの選択	4
VI プロトコール	4
<プロトコール 1:乾燥試料や吸水性の強い加工食品からの DNA 抽出>	5
<プロトコール 2:水分を比較的多く含む吸水性の弱い加工食品からの DNA 抽出>	6
<プロトコール 3:DNA の残存が少ない加工食品からの DNA 抽出>	7
VII データ集	9
VIII トラブルシューティング	13
IX 関連製品	14

I 製品説明

GM quicker 3は、加工食品からDNAを抽出するためのキットです。本キットは、カオトロピックイオン存在下でDNAがシリカへ吸着する原理(Boom Technology)を採用しており、抽出操作にフェノールやクロロホルムなどの毒性有機溶媒を使用しません。遺伝子組換え作物(Genetically Modified Organisms:GMO)の検査においては、DNAを用いた方法が広く普及していますが、これまでのDNA抽出キットでは断片化したDNAの回収を目的とした設計にはなっていなかったため、物理的もしくは、化学的な要因によって断片化したDNAを含む加工食品からのDNA抽出は必ずしも効率的ではありませんでした。

本キットでは、抽出対象を加工食品へ最適化することによって、約2時間という短い時間でPCRに好適な品質のDNAを抽出することができます。使用するスピncラムは、カラム容積を最大限確保しており、内封されたシリカゲル膜は、十分なDNA吸着容量と高い溶出効率を確保しています。

本キットによって抽出されたDNAは、PCRや制限酵素反応に適用することができます。

II キット内容

GE1 Buffer	100 ml	× 3 本 *
GE2-P Buffer	30 ml	× 1 本
GB3 Buffer	12.5 ml	× 3 本 *
GW Buffer	40 ml	× 1 本 *
TE (pH8.0)	10 ml	× 1 本 *
Proteinase K(20 mg/ml)	1 ml	× 2 本 *
α-Amylase(高濃度品)	0.1 ml	× 1 本 *
RNase A(100 mg/ml)	0.5 ml	× 1 本 *
Spin Column	50 個	
マニュアル	1 部	

* 別途、単品でお買い求めいただけます。詳細については14ページをご参照ください。

III 保存

本キットに含まれる Proteinase K、 α -Amylase 以外の全ての試薬と Spin Column は室温保存 (15°C~25°C)が可能です。Proteinase K、 α -Amylase は冷凍保存(-20°C)して下さい。

RNase A は室温保存が可能です。長期間ご使用にならない場合には、冷蔵保存 (2~10°C)もしくは冷凍保存 (-20°C)して下さい。

GW Buffer にはエタノールが含まれていますので、ご使用後は蒸発を防ぐために必ず蓋を閉めて下さい。

IV 使用上の注意

- 本キットは試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
- 試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱わないで下さい。
- 本キットのお取り扱い、マニュアル記載内容通りに行ってください。
- マニュアル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。

V JAS 法表示品目に対応したプロトコールの選択

プロトコール1：乾燥試料や吸水性の強い加工食品からの DNA 抽出

①凍り豆腐、おから及びゆば ②きな粉 ③大豆いり豆 ④乾燥馬鈴薯

プロトコール2：水分を比較的多く含む吸水性の弱い加工食品からの DNA 抽出

⑤豆腐類及び油揚げ類 ⑥納豆 ⑦豆乳類 ⑧みそ ⑨大豆煮豆 ⑩大豆缶詰及び大豆瓶詰 ⑪冷凍とうもろこし ⑫とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰 ⑬冷凍馬鈴薯

プロトコール3：DNA の残存が少ない加工食品からの DNA 抽出

⑭コーンスナック菓子 ⑮コーンスターチ ⑯ポップコーン ⑰ポテトスナック菓子
⑱馬鈴薯でん粉

その他：対象品目の形状が様々で分類が困難な食品

以下の品目については、上記分類を参考にプロトコールを選択してください。

①～⑱までに掲げるものを主な原材料とするもの、大豆（調理用）を主な原材料とするもの、大豆粉を主な原材料とするもの、大豆たんぱくを主な原材料とするもの、枝豆を主な原材料とするもの、大豆もやしを主な原材料とするもの、コーンフラワーを主な原材料とするもの、コーングリッツを主な原材料とするもの（コーンフレークを除く）、とうもろこし（調理用）を主な原材料とするもの、馬鈴薯（調理用）を主な原材料とするもの、アルファルファを主な原材料とするもの、甜菜（調理用）を主な原材料とするもの。

VI プロトコール

<本キット以外に必要な試薬、機器など>

- ・マイクロピペット
- ・ピペットチップ
- ・50 ml コニカルチューブ
- ・2.0 ml マイクロチューブ
- ・1.5 ml マイクロチューブ
- ・フードミル
- ・遠心機
- ・試験管ミキサー
- ・恒温槽

<プロトコール1：乾燥試料や吸水性の強い加工食品からの DNA 抽出>

- ① 試料をフードミル等で粉砕する。
- ② 50 ml コニカルチューブに 1.0 g の粉砕試料を秤量し、4.5 ml の GE1 Buffer、10 μ l の RNase A、2 μ l の α -Amylase および 40 μ l の Proteinase K をそれぞれ添加する。壁面に付着した試料や Buffer をフラッシュ遠心によりチューブの底に集めた後、試験管ミキサーにて均質になるまでよく攪拌する(30 秒間以上)。(注1)
- ③ 30 分間、65°Cで加温し、10 分間毎に 2 回、試験管ミキサーにて 10 秒間最高速で攪拌する。
- ④ 500 μ l の GE2-P Buffer を添加し、試験管ミキサーにてよく混和する。
- ⑤ 遠心($\geq 4K \times g$, 10 分間, 4°C)する。(注2)
- ⑥ 上清 800 μ l を新しい 2.0 ml マイクロチューブに移す。(注3)
- ⑦ 600 μ l の GB3 Buffer を添加し、10~12 回チューブを転倒させ、よく混和する。
- ⑧ 遠心($\geq 10K \times g$, 5 分間, 4°C)し、上清を可能な限り採取する。(注4)
- ⑨ ⑧の上清を Spin Column に 700 μ l 移し、遠心($\geq 10K \times g$, 30 秒間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑩ ⑧の残りの上清全量を⑨の Spin Column に移し、遠心($\geq 10K \times g$, 30 秒間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑪ 600 μ l の GW Buffer を Spin Column に添加した後、遠心($\geq 10K \times g$, 60 秒間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑫ Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
- ⑬ 50 μ l の TE (pH8.0)を滴下した後、3 分間室温で静置する。
- ⑭ 遠心($\geq 10K \times g$, 60 秒間, 4°C)し、濾液を回収する。

<プロトコール2 : 水分を比較的多く含む吸水性の弱い加工食品からの DNA 抽出>

- ① 試料をフードミル等で粉砕する。
- ② 50 ml コニカルチューブに 1.0 g の粉砕試料を秤量し、1 ml の GE1 Buffer、10 μ l の RNase A、2 μ l の α -Amylase および 20 μ l の Proteinase K をそれぞれ添加する。壁面に付着した試料や Buffer をフラッシュ遠心によりチューブの底に集めた後、試験管ミキサーにて均質になるまでよく攪拌する(30 秒間以上)。(注1)
- ③ 30 分間 65°C で加温し、10 分間毎に 2 回、試験管ミキサーにて 10 秒間最高速で攪拌する。
- ④ 200 μ l の GE2-P Buffer を添加し、試験管ミキサーにてよく混和する。
- ⑤ 遠心($\geq 4K \times g$, 10 分間, 4°C)する。(注2)
- ⑥ 上清 800 μ l を 2.0 ml マイクロチューブに移す。(注3)
- ⑦ 600 μ l の GB3 Buffer を添加し、10~12 回チューブを転倒させ、よく混和する。
- ⑧ 遠心($\geq 10K \times g$, 5 分間, 4°C)し、上清を可能な限り採取する。(注4)
- ⑨ ⑧の上清を Spin Column に 700 μ l 移し、遠心($\geq 10K \times g$, 30 秒間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑩ ⑧の残りの上清全量を⑨の Spin Column に移し、遠心($\geq 10K \times g$, 30 秒間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑪ 600 μ l の GW Buffer を Spin Column に添加した後、遠心($\geq 10K \times g$, 60 秒間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑫ Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
- ⑬ 50 μ l の TE (pH8.0) を滴下した後、3 分間室温で静置する。
- ⑭ 遠心($\geq 10K \times g$, 60 秒間, 4°C)し、濾液を回収する。

<プロトコール3 : DNAの残存が少ない加工食品からのDNA抽出>

- ① 試料をフードミル等で粉砕する。
- ② 50 ml コニカルチューブに 1.0 g の粉砕試料を秤量し、4.0 ml の GE1 Buffer、10 μ l の RNase A、2 μ l の α -Amylase、10 μ l の Proteinase K をそれぞれ添加する。壁面に付着した試料や Buffer を遠心操作によりチューブの底に集めた後、試験管ミキサーにて均質になるまでよく攪拌する(30 秒間以上)。(注1)
- ③ 30 分間 65°C で加温し、10 分間毎に 2 回、試験管ミキサーにて 10 秒間最高速で攪拌する。
- ④ 400 μ l の GE2-P Buffer を添加し、試験管ミキサーにてよく混和する。
- ⑤ 遠心 ($\geq 4K \times g$, 5 分間, 4°C) する。(注2)
- ⑥ 上清 1 ml を新しい 2.0 ml マイクロチューブに移す。(注3)
- ⑦ 750 μ l の GB3 Buffer を添加し、10~12 回チューブを転倒させ、よく混和する。
- ⑧ 遠心 ($\geq 10K \times g$, 5 分間, 4°C) し、上清を可能な限り採取する。(注4)
- ⑨ ⑧の上清を Spin Column に 700 μ l 移し、遠心 ($\geq 10K \times g$, 30 秒間, 4°C) し、濾液は廃棄する。
- ⑩ ⑧の残りの上清全量を⑨の Spin Column に移し、遠心 ($\geq 10K \times g$, 30 秒間, 4°C) し、濾液は廃棄する。
- ⑪ 600 μ l の GW Buffer を Spin Column に添加した後、遠心 ($\geq 10K \times g$, 60 秒間, 4°C) し、濾液は廃棄する。
- ⑫ Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
- ⑬ 50 μ l の TE (pH8.0) を滴下した後、3 分間室温で静置する。
- ⑭ 遠心 ($\geq 10K \times g$, 60 秒間, 室温) し、濾液を回収する。

- (注1) 攪拌操作が不十分な場合、DNAの収量が著しく減少します。また、チューブを試験管ミキサーへ斜めにあてた場合、泡が大量に発生し攪拌効率が低下します。試験管ミキサーに対してチューブを垂直にあて、そのまま 30 秒間、しっかりと攪拌を行って下さい。攪拌が不十分であれば、更に 30～60 秒間攪拌を行って下さい。
- (注2) 使用する冷却遠心機のローターの最高回転数およびチューブの最大耐 g を確認して下さい。
- (注3) 沈殿物や上清表面に浮かんでいる膜状の物質を可能な限り取らないように上清を回収して下さい。
- (注4) 沈殿物や上清表面に浮かんでいる膜状の物質がある場合は可能な限り取らないように上清を新しい 2.0 ml チューブに移して下さい。

VII データ集

1. 本キットで抽出した DNA の吸収スペクトル

A₂₆₀ 付近に吸収ピークがあることから、本キットで抽出した DNA は純度が高いことが示唆された。

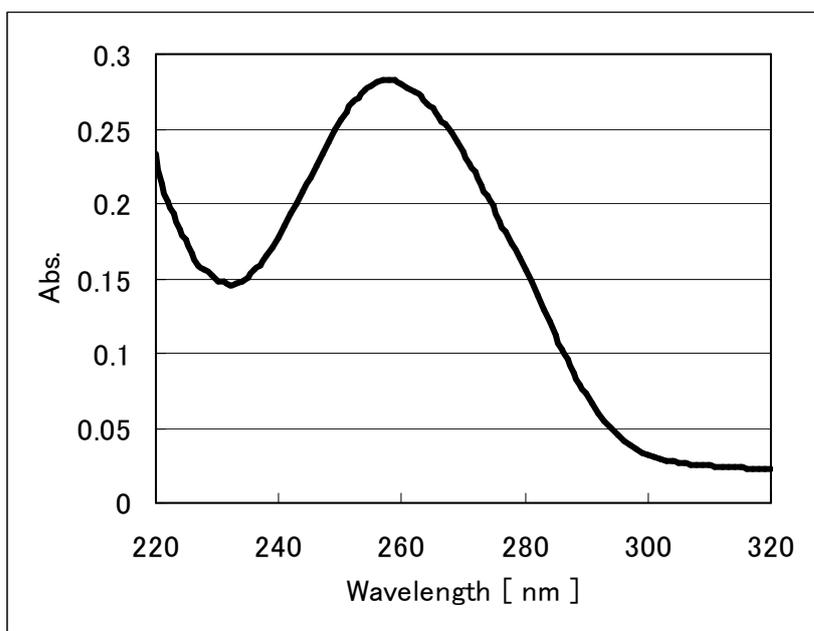


図 1. プロトコール 1 できな粉から抽出した DNA の吸収スペクトル

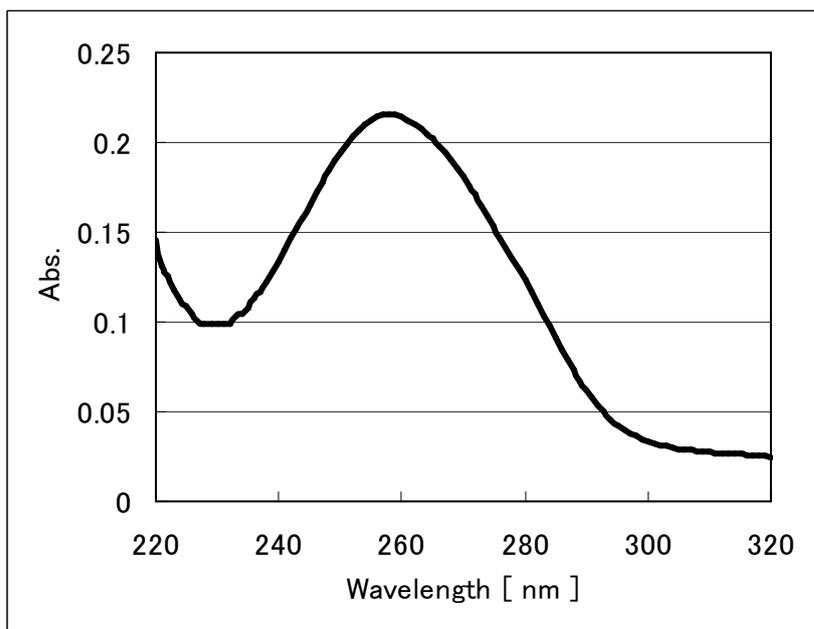


図 2. プロトコール 2 で豆乳から抽出した DNA の吸収スペクトル

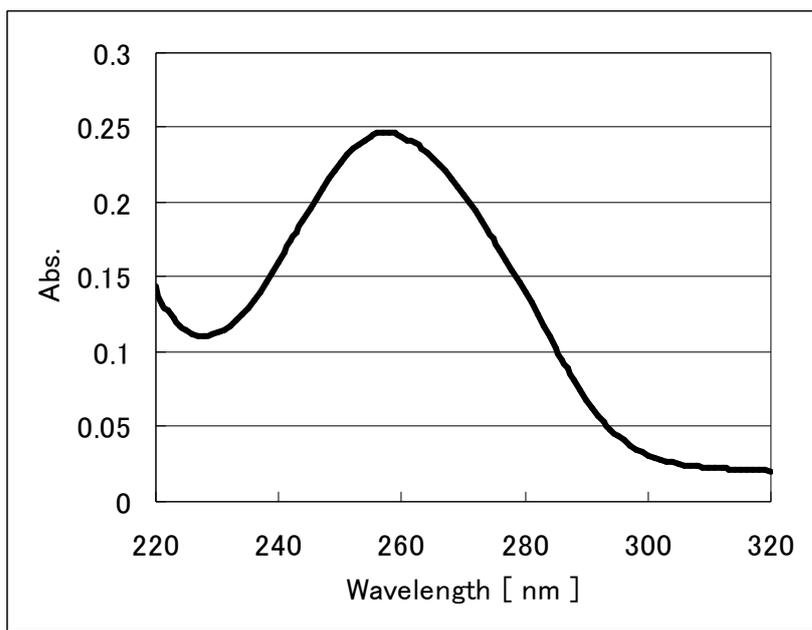


図 3. プロトコール 3 でコーンスナック菓子 A から抽出した DNA の吸収スペクトル

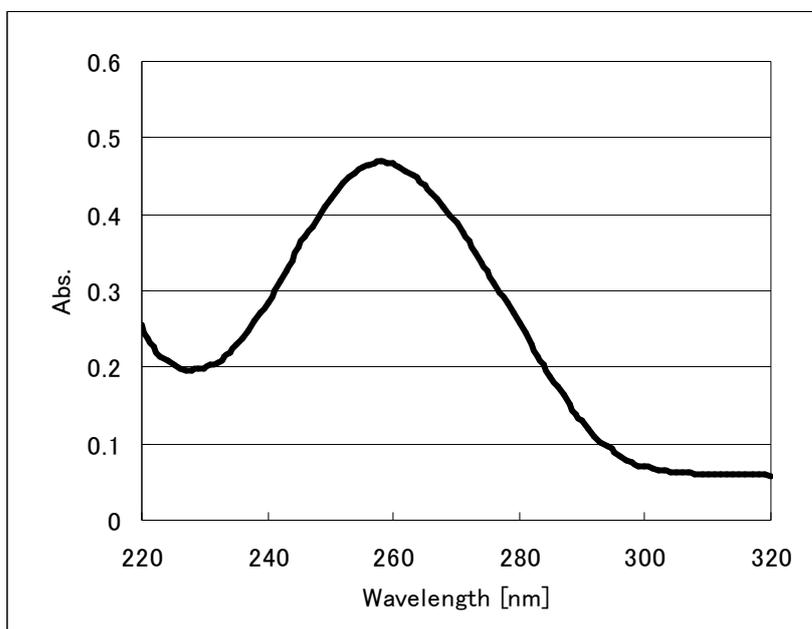
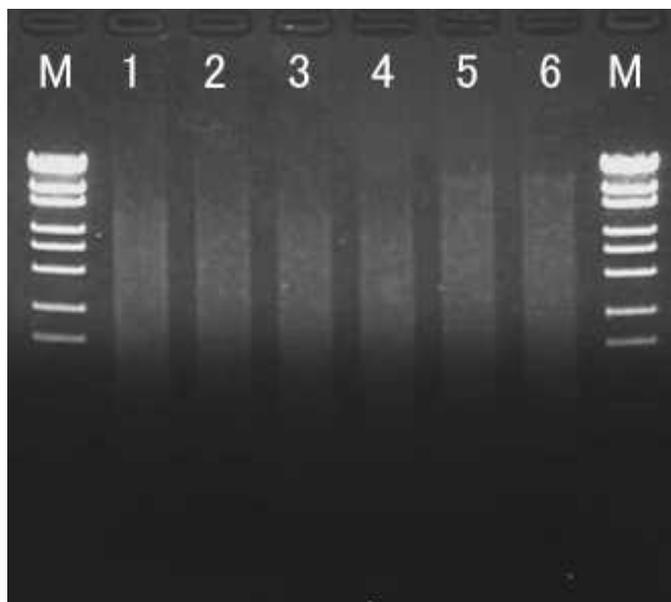


図 4. プロトコール 3 でポテトスナック菓子 A から抽出した DNA の吸収スペクトル

2. 本キットで抽出した DNA のアガロースゲル電気泳動

本キットのプロトコール 3 でポテトスナック菓子から DNA を抽出した。いずれのポテトスナック菓子からも DNA を抽出出来た。



Lane M : OneSTEP Marker 6 (λ / StyI digest)

Lane 1, 2 : ポテトスナック菓子 A 由来の DNA

Lane 3, 4 : ポテトスナック菓子 B 由来の DNA

Lane 5, 6 : ポテトスナック菓子 C 由来の DNA

本キットのプロトコール 3 で抽出した DNA 溶液の 1/25 量を 1% Agarose S で電気泳動した。

3. PCRによる内在性遺伝子の検出

ダイズ、トウモロコシ及びジャガイモの内在性遺伝子検出用プライマー対を用いて、本キットで抽出した DNA 溶液を希釈せずに鋳型として用い、PCR を行った。PCR 条件は、農林水産省 JAS 分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」に従った。



Lane M : OneSTEP Marker11 (pUC19/MspI digest)

<ダイズ加工食品>

Lane 1 : きな粉

Lane 4 : 豆腐

Lane 7 : 納豆 A

Lane 2 : 乾燥ゆば

Lane 5 : 豆乳

Lane 8 : 納豆 B

Lane 3 : 凍り豆腐

Lane 6 : 水煮大豆

Lane 9 : 納豆 C

<トウモロコシ加工食品>

Lane 10 : トウモロコシの缶詰

Lane 11 : コーンスナック菓子 A

Lane 12 : コーンスナック菓子 B

Lane 13 : コーンスターチ

<ジャガイモ加工食品>

Lane 14 : ポテトスナック菓子 A

Lane 15 : ポテトスナック菓子 B

Lane 16 : ポテトスナック菓子 C

PCR 産物の一部 (5 μ l) を 3% Agarose 21 ゲルで電気泳動

Lane 1~9 は *Le1* 遺伝子(118 bp)を増幅、Lane 10~13 は *SSIIb* 遺伝子(114 bp)を増幅、

Lane 14~16 は *UGPase* 遺伝子(111 bp)を増幅した。

VIII トラブルシューティング

問題	考えられる原因	考えられる対策
遠心操作の後、十分な量の上清を回収できない。	試料に対する溶液量が足りない。	試料の量を減らして、滅菌水、または GE1 Buffer を適量加えて下さい。
	遠心が不十分。	遠心の g を上げるか、遠心時間を長くして下さい。
	冷却が必要。	上清を回収するための遠心操作の直前に、数分間の氷冷操作で温度を下げると効果的な場合があります。
Spin Column が目詰まりする。	沈殿物や上清表面の浮遊物を過度に持ち込んだ。	沈殿物や浮遊物の Spin Column への持込を避けるため、上清を 1.5 ml もしくは 2.0 ml マイクロチューブへ一旦移し、より強い g にて遠心を行った後、上清を回収し、GB3 Buffer を加えて下さい。
		GB3 Buffer 添加後の遠心上清を回収するときはできるだけ沈殿物や上清表面の浮遊物を含まないようにして下さい。遠心後に放置しておくとし沈殿物が浮遊してくる場合があります。沈殿物が浮遊してきた場合は、上清を回収する前に再度、遠心を行ってください。
DNA の収量が少ない。	試料の粉碎が不十分。	出来るだけ細かく、均質になるように試料を粉碎して下さい。
	抽出効率が低下している。	GE1 Buffer および酵素の添加後は、試験管ミキサーにてよく混合して下さい。また、加温反応中は粘性が低下し、攪拌効率が上がりますので、よく混合して下さい。
		50 ml コニカルチューブを斜めに試験管ミキサーにあてた場合、泡が大量に出て攪拌効率が下がりますので、チューブを試験管ミキサーに垂直にあてよく攪拌を行ってください。
	溶出が不十分。	TE(pH8.0)を Spin Column へ添加した後、直ぐに遠心溶出を行った場合、DNA 収量にばらつきが生じます。一定の DNA 収量を得るため、室温で数分間静置した後、溶出を行ってください。
	試料中に含まれる DNA 量が少ない。	試料を 2 本以上用意し、GB3 Buffer 添加後の遠心で上清を回収するまで、それぞれ別々に操作を行う。その後、回収した上清を 1 つにまとめ、Spin Column へ複数回に分けて全量を添加すると DNA 収量の増加が期待される。
	酵素処理温度が低すぎる、もしくは高すぎる。	マニュアル記載の温度に調節して下さい。また、加温操作は比較的、熱伝導効率のよいウォーターバス等をご使用ください。
	酵素が失活している。	Proteinase K および α -Amylase は -20°C で保存して下さい。
RNA の混入が多い。	RNase A が失活している。 GE1 Buffer と RNase A は混合して保存することができません。それぞれを別々に保存して下さい。	
PCR で DNA を増幅できない。	PCR 阻害物を含んでいる。 試料によっては GE1 Buffer に含まれる PCR 阻害物質が残存する場合があります。GE1 Buffer を 2 倍に希釈して下さい。また、収量が極端に少ない場合 TE が PCR 反応の阻害の原因になります。溶出を水で行ってください。また、Spin Column に試料由来の着色が見られる場合は GW Buffer による洗浄操作を 2 回行うと効果的な場合があります。	

IX 関連製品

Code No.	製品名	包装単位
317-06361	<i>GM quicker</i>	50 回用
310-06591	<i>GM quicker 2</i>	50 回用
316-07791	<i>GM quicker 4</i>	50 回用
319-07161	<i>GM quicker 96</i>	96 ウェルプレート×4
317-07341	On-Site Column Set for <i>GM quicker</i>	20 回用
314-06371	GE1 Buffer	500 ml
311-06381	GE2 Buffer	200 ml
318-06391	RNase A (100 mg/ml)	0.5 ml×5
311-06641	GW Buffer	40 ml×2
318-06651	GE2-K Buffer	100 ml
315-06661	GB3 Buffer	12.5 ml×2
312-06671	<i>GM quicker 2</i> Enzyme Set (Proteinase K 2 ml, α -Amylase 0.2 ml)	1 Set
316-90025	TE (pH8.0)	500 ml
318-90105	Distilled Water, Deionized, Sterile	500 ml
312-01193	Agarose S	100 g
313-03242	Agarose 21	25 g
312-06512	Agarose XP	25 g
311-02682	Agarose X	25 g
311-05281	OneSTEP Marker 6	1,500 μ l
318-05791	OneSTEP Marker 4	375 μ l
312-05831	OneSTEP Marker 11	375 μ l
319-0814	Collection Tube	100 回用

X 参考文献

- ・ 「トウモロコン加工品の新規 DNA 抽出法の検討」
詳細は農林水産消費安全技術センター(FAMIC)様の HP に掲載の調査研究報告 第 37 号(平成 25 年 11 月)よりご覧頂けます。
- ・ Comparison of DNA extraction methods for sweet corn and processed sweet corns.
Takabatake R, Noritake H, Noguchi A, Nakamura K, Kondo K, Akiyama H, Teshima R, Mano J, Kitta K.: *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 2013; **54**(4):309-315.

