

GM quicker 4

- GMO DNA Extraction Kit
for Processing food -

マニュアル
Ver. 3.0

Code No. 316-07791



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	2
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	3
VI	プロトコール	4
	＜プロトコール 1: 乾燥した食品からの DNA 抽出方法＞	5
	＜プロトコール 2: 水分を多く含む食品からの DNA 抽出方法＞	6
VII	データ集	8
VIII	トラブルシューティング	12
IX	関連製品	13
X	参考文献	14

I 製品説明

GM quicker 4 は、食品中の DNA を抽出および精製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にて核酸がシリカへ吸着する原理を応用しており、フェノールやクロロホルムなどの毒性有機溶媒を使用することなく、食品中に含まれる DNA を回収することが可能です。

本キットで使用するスピncラムは、一般的な遠心機のローターが使用可能な範囲で、容積を最大限確保しており、シリカ膜は、食品中の DNA を回収するために十分な吸着能を有しています。

本キットによって得られた DNA は、PCR 法や LAMP 法等の酵素反応に使用することが可能なため、遺伝子組換え食品の検査や、特定原材料検査、食品微生物検査、原材料検査等への適応が期待できます。

II キット内容

GE1 Buffer	100 ml	× 2 本 *
GE2-M Buffer	20 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	× 1 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 本	
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 13 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が、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。ご使用後は蒸発を防ぐために速やかに蓋を閉め、保管して下さい。

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(参考)

プロトコール1：乾燥した食品（フリーズドライ食品等）

- 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 ⑤コーンスナック菓子 ⑥コーンスターチ ⑦ポップコーン ⑧ポテトスナック菓子 ⑨馬鈴薯でん粉

プロトコール2：水分を多く含む食品（液状の食品や滅菌水を加えてホモジナイズした食品）

- ⑩豆腐類及び油揚げ類 ⑪納豆 ⑫豆乳類 ⑬みそ ⑭大豆煮豆 ⑮大豆缶詰及び大豆瓶詰 ⑯冷凍とうもろこし ⑰とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰 ⑱冷凍馬鈴薯

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(カッターミル等)
- ・ 遠心機
- ・ 試験管ミキサー
- ・ 恒温槽

<食品の前処理方法について>

食品検査では、サンプリングの誤差を小さくするため、食品が均一になるように十分ホモジナイズする必要があります。ホモジナイズの方法として、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」<改訂第 3 版>では、試料重量と同じ重量の滅菌水を加えて粉砕する方法、または、試料をフリーズドライ等により乾燥させて粉砕する方法が考えられるとしており、主に滅菌水を加えてカッターミル等でホモジナイズする方法が記載されている。

本キットでは、プロトコール1として、フリーズドライ等の乾燥した食品を対象として開発した方法を記載しており、プロトコール 2として、液体の食品や試料に滅菌水を加えてホモジナイズした食品を対象として開発した方法を記載している。

<プロトコール1：乾燥した食品からのDNA抽出方法>

- ① 50 ml コニカルチューブに 1.0 g の破碎試料を秤量し、4.0 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良く攪拌する(30 秒間以上)。^(注1)
- ② 30 分間、65°Cで加温し、10 分間毎に試験管ミキサーにて 10 秒間最高速で攪拌する。
- ③ 400 μ l の GE2-M Buffer を添加し、試験管ミキサーにて良く攪拌する。
- ④ 遠心($\geq 4K \times g$, 10 分間, 4°C)する。^(注2)
- ⑤ 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)
- ⑥ 600 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。
- ⑦ 遠心($\geq 10K \times g$, 5 分間, 4°C)し、上清を可能な限り 2.0 ml マイクロチューブに回収する。^(注4)
- ⑧ ⑦の上清を Spin Column に 700 μ l 移し、遠心($\geq 10K \times g$, 1分間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑨ ⑦の残りの上清全量を⑧の Spin Column に移し、遠心($\geq 10K \times g$, 1分間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑩ 600 μ l の GW Buffer を Spin Column に添加した後、遠心($\geq 10K \times g$, 1分間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑪ Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
- ⑫ 50 μ l の TE (pH8.0)をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置する。
- ⑬ 遠心($\geq 10K \times g$, 1分間, 4°C)し、濾液を回収する。

<プロトコール2：水分を多く含む食品からの DNA 抽出方法>

- ① 50 ml コニカルチューブに 1.0 g の破碎試料を秤量し、1.0 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良く攪拌する(30 秒間以上)。(注1)
- ② 30 分間 65°C で加温し、10 分間毎に試験管ミキサーにて 10 秒間最高速で攪拌する。
- ③ 200 μ l の GE2-M Buffer を添加し、試験管ミキサーにて良く攪拌する。
- ④ 遠心($\geq 4K \times g$, 10 分間, 4°C)する。(注2)
- ⑤ 上清 800 μ l を 2.0 ml マイクロチューブに移す。(注3)
- ⑥ 600 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。
- ⑦ 遠心($\geq 10K \times g$, 5 分間, 4°C)し、上清を可能な限り 2.0 ml マイクロチューブに回収する。(注4)
- ⑧ ⑦の上清を Spin Column に 700 μ l 移し、遠心($\geq 10K \times g$, 1分間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑨ ⑦の残りの上清全量を⑧の Spin Column に移し、遠心($\geq 10K \times g$, 1分間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑩ 600 μ l の GW Buffer を Spin Column に添加した後、遠心($\geq 10K \times g$, 1分間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑪ Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
- ⑫ 50 μ l の TE(pH8.0)をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置する。
- ⑬ 遠心($\geq 10K \times g$, 1分間, 4°C)し、濾液を回収する。

- (注1) 攪拌操作が不十分な場合、DNA 収量が著しく減少します。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、しっかりと攪拌して下さい。攪拌が不十分であれば、更に 30～60 秒間攪拌して下さい。
- (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コニカルチューブの最大耐 g を確認して遠心して下さい。
- (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。

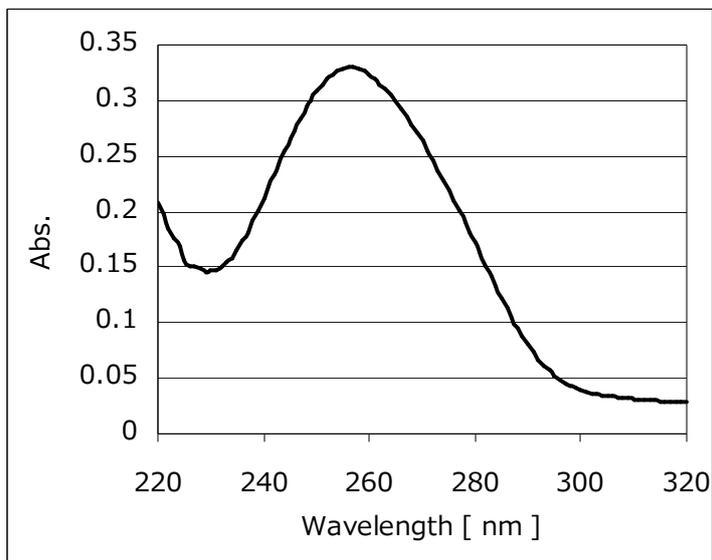


図 1. きな粉から抽出した DNA の吸収スペクトル (プロトコール 1)

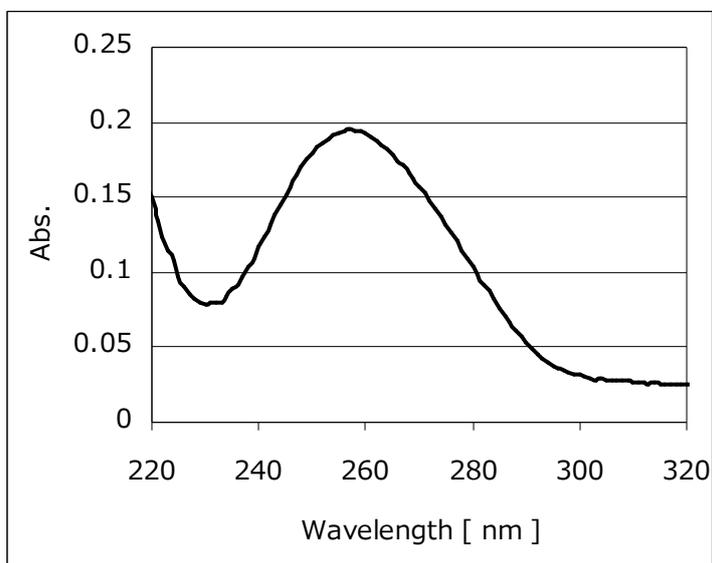


図 2. 豆乳から抽出した DNA の吸収スペクトル (プロトコール 2)

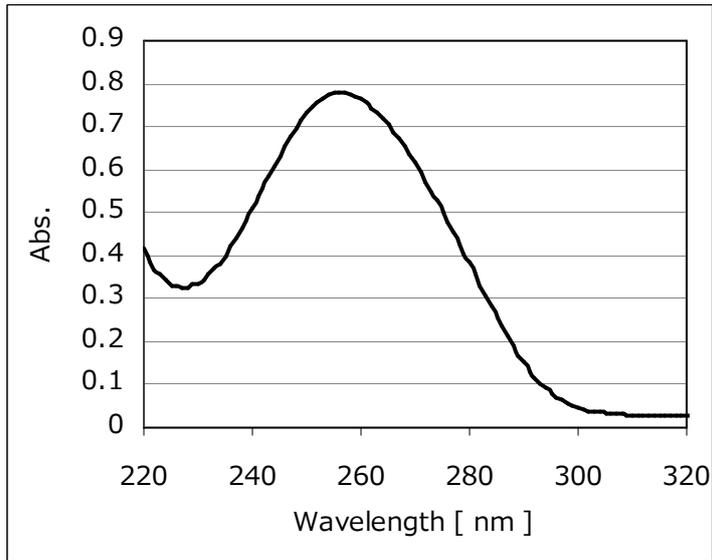


図 3. 粉末コーンスープから抽出した DNA の吸収スペクトル (プロトコール 1)

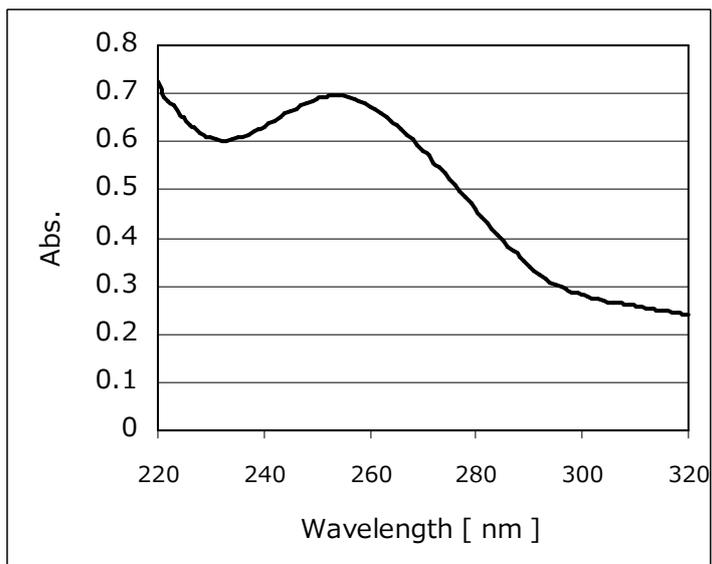
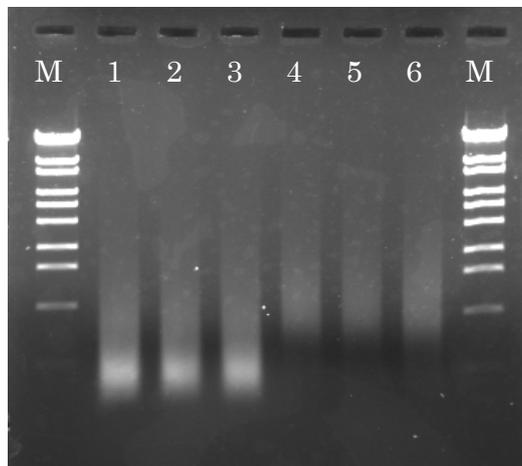


図 4. ポテトスナック菓子から抽出した DNA の吸収スペクトル (プロトコール 1)

2. 本キットで抽出した DNA のアガロースゲル電気泳動

ダイズ加工食品（きな粉：プロトコール1および豆乳：プロトコール2）から DNA を抽出した。いずれのダイズ加工食品からも DNA を抽出できた。



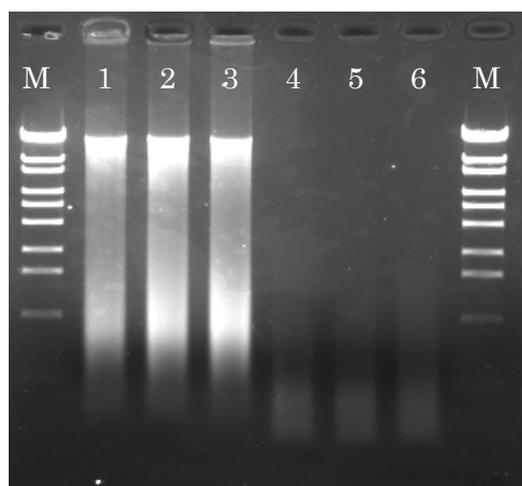
Lane M : OneSTEP Marker 6 (λ / StyI digest)

Lane 1, 2, 3: きな粉由来の DNA

Lane 4, 5, 6: 豆乳由来の DNA

本キットで抽出した DNA 溶液の 1/10 量(5 μ l)を 1% Agarose S で電気泳動した。

トウモロコシ加工食品（粉末コーンスープ：プロトコール1およびホールコーン缶詰：プロトコール2）から DNA を抽出した。いずれのトウモロコシ加工食品からも DNA を抽出できた。



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

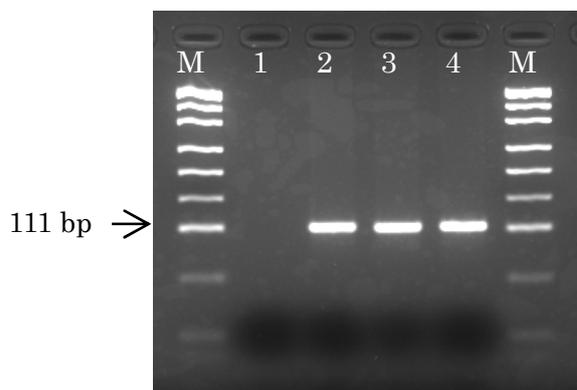
Lane 1, 2, 3: 粉末コーンスープ由来の DNA

Lane 4, 5, 6: ホールコーン缶詰由来の DNA

本キットで抽出した DNA 溶液の 1/10 量(5 μ l)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

ジャガイモ内在性 DNA UGPase オリゴヌクレオチド (Code No.: 310-05991) を用いて、本キットで抽出したポテトスナック菓子由来の DNA 溶液を鋳型として PCR した。PCR の条件は、以下の通り。95°C, 10 min → (95°C, 30 sec → 60°C, 30 sec → 72°C, 30 sec) ×40 Cycle → 72°C, 7 min



Lane M : OneSTEP Marker11 (pUC19/MspI digest)

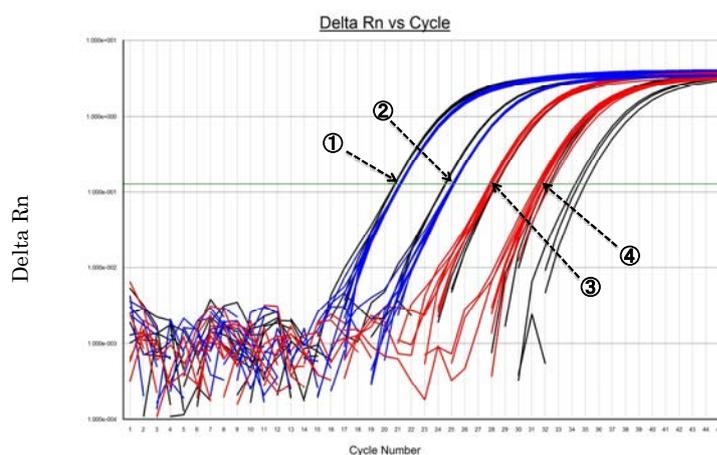
Lane 1 : ネガティブコントロール (TE 溶液)

Lane 2-4 : ポテトスナック菓子

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

4. リアルタイム PCRによる内在性遺伝子の検出

コメ内在性 DNA PLD オリゴヌクレオチドセット 2 (Code No.: 312-07531) を用いて本キットで抽出したビーフン及びライスペーパー由来の DNA の定量試験を行った (n=3)。



ABI7500 Fast System による増幅曲線(Base Line 3-15, Th.Line=0.128)

- ① ビーフン DNA(190,000 copies/2.5 μ l) ② 10 倍希釈ビーフン DNA(12,800 copies/2.5 μ l)
③ ライスペーパーDNA(1,840 copies/2.5 μ l) ④ 10 倍希釈ライスペーパーDNA(147 copies/2.5 μ l)

本キットで抽出したコメ加工食品の DNA は、リアルタイム PCR で定量可能であった。

VIII トラブルシューティング

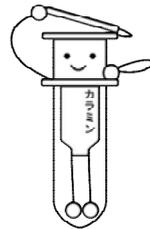
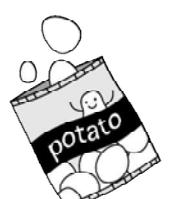
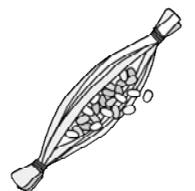
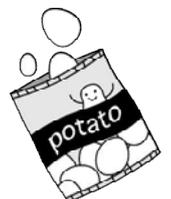
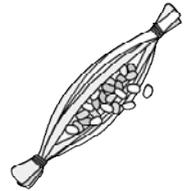
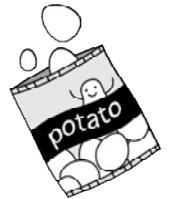
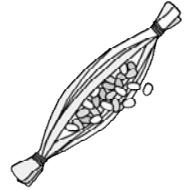
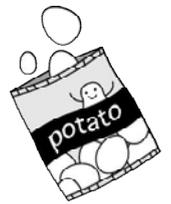
問題	考えられる原因	考えられる対策
遠心分離の後、十分な量の上清を回収できない。	試料に対して GE1 Buffer が足りない。	試料の量を減らすか、GE1 Buffer の量を増やして下さい。
	遠心力が不十分。	遠心 g を上げるか、遠心する時間を長くして下さい。
	粗抽出液が 65℃ から室温に下がっていない。	⑤の上清を回収するための遠心分離の直前に、数分間の氷冷操作で温度を下げると効果的な場合があります。
スピncラムが目詰まりする。	沈殿物や上清表面の浮遊物が混入した。	沈殿物や浮遊物の混入を避けるため、⑤の上清を 1.5 ml もしくは 2.0 ml マイクロチューブへ一旦移し、より強い g にて遠心を行った後、再度上清を回収し、GB3 Buffer を加えて下さい。
		遠心後に放置しておくくと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、遠心を行って下さい。
DNA の収量が少ない。	試料の破砕が不十分。	出来るだけ細かく、均質になるように試料を破砕して下さい。
	抽出効率が悪い。	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。
	溶出が不十分。	TE(pH8.0)をスピncラムへ添加した後、直ぐに遠心分離を行った場合、DNA 収量にばらつきが生じます。室温で数分間静置し、十分溶出した後、遠心分離して下さい。
	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⑦の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 収量の増加が期待出来る。
	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(65℃)に調節して下さい。また、加温操作は熱伝導効率のよいウォーターバスやヒートブロック等の使用を推奨します。
	分解酵素の失活。	Proteinase K および α-Amylase は-20℃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 阻害物の残存。	滅菌水等で希釈した後、PCR を行って下さい。
		スピncラムに試料由来の色素が着色する場合、i) GW Buffer による⑩の洗浄操作を 2 回行うか、ii) ⑩の洗浄操作の後、80% エタノールで洗浄する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
311-07241	<i>GM quicker 3</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
319-08141	Collection Tube	100 回用

X 参考文献

- 1) Yasutaka Minegishi, Junichi Mano, Yasuo Kato, Kazumi Kitta, Hiroshi Akiyama and Reiko Teshima, Japanese Journal of Food Chemistry and Safety, **20**, 96-104 (2013)



お問い合わせ先

株式会社ニッポンジーン
研究試薬部 学術営業課

TEL 076 - 451 - 6548

URL <http://www.nippongene.com/siyaku/>

お問い合わせは、お電話もしくはWEB フォームより承っております。

- ・記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。
- ・「ニッポンジーン」および「NIPPON GENE」は、株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。
- ・その他、製品名等の固有名詞は各社の商標、または登録商標です。