



GM quicker 96

- GMO DNA Extraction Kit for Maize -

マニュアル (第3版)

Code No. 319-07161

*GM quicker 96*は「(別添)安全性審査済みの組換え DNA 技術応用食品の検査方法」及び「(別添)安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法」のナタネ(RT73 B. rapa)の検査方法に準拠した試薬です。

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 プロトコール	3
<トウモロコシ種子 1 粒からの DNA 抽出プロトコール>	4
VI データ集	6
VII トラブルシューティング	8
VIII 関連製品	9

I 製品説明

GM quicker 96 は、トウモロコシ種子粉砕物から 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) の検査等では、DNA を用いた方法が広く普及していますが、これまでのスピнкаラムを用いた DNA 抽出法で同時に大量のサンプルを処理することは必ずしも効率的ではありませんでした。

本キットは、抽出対象をトウモロコシ種子へ特化させることによって、96 粒の種子から約 1.5 時間という短い時間で簡便に高品質な DNA を抽出することが可能です。使用するポリスチレン製の 96 ウェルカラムプレートは、最大 1800×g までの遠心力を許容し、内封されたシリカゲル膜は、十分な DNA 吸着容量を確保しています。

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

II キット内容

96 ウェルプレート×4 回分(最大 384 サンプル抽出可能)

GE1 Buffer	240 ml	× 4 本
GE2-K Buffer	150 ml	× 1 本
GB3 Buffer	120 ml	× 1 本
GW Buffer	150 ml	× 2 本
TE (pH8.0)	50 ml	× 1 本
RNase A (100mg/ml)	0.8 ml	× 4 本
96 ウェルカラムプレート	4 枚	
1.00 ml コレクションプレート	4 枚	
0.35 ml コレクションプレート	4 枚	
コレクションプレートキャップ	4 枚	

III 保存

本キットに含まれる試薬は、96 ウェルカラムプレート以外は、室温保存(15℃～25℃)が可能です。96 ウェルカラムプレートは製品到着後、チャック式袋に密閉した状態で、冷蔵保存(2℃～10℃)して下さい。RNase A は室温保存可能ですが、長期間ご使用にならない場合には、冷蔵保存(2～10℃)もしくは冷凍保存(-20℃)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 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
- ・ マイクロチューブ
- ・ 1 ml 容 96 穴プレート
- ・ フードミルまたはビーズ式破碎機
- ・ プレート遠心機
- ・ ボルテックスミキサー

<トウモロコシ種子 1 粒(およそ 250 mg)からの DNA 抽出プロトコール>

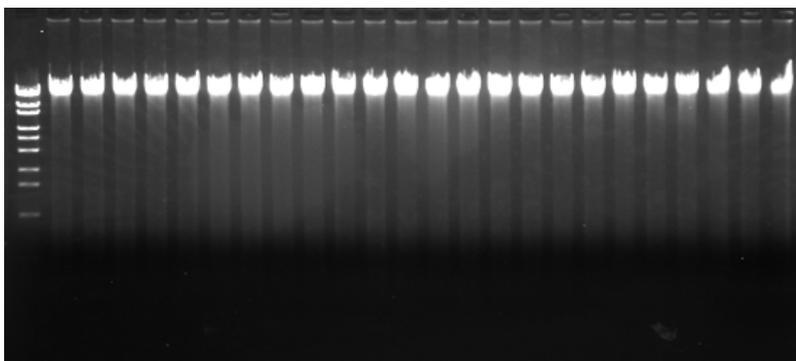
- ① トウモロコシ種子(1 粒)をフードミルまたはビーズ式破砕機等で粉砕する。
- ② トウモロコシ種子粉砕物の入ったチューブに、1.5 ml の GE1 Buffer および 5 μ l の RNase A をそれぞれ添加する。ボルテックスミキサー等にて 30 秒間攪拌する。^(注1)
96 サンプルを同時に抽出する場合は、240 ml の GE1 Buffer に対し、予め 0.8 ml の RNase A を添加し混合した後すぐに、サンプルの入ったチューブへ 1.5 ml ずつ添加しても良い。^(注2)
- ③ 10 分間、室温で静置する。
- ④ 180 μ l の GE2-K Buffer を添加し、ボルテックスミキサー等にてよく混和する。^(注3)
- ⑤ 遠心(1.4~1.8K \times g, 10 分間, 室温)する。
- ⑥ 上清 400 μ l を新しいマイクロチューブもしくは 1 ml 容 96 穴プレートに移す。^(注4)
- ⑦ 250 μ l の GB3 Buffer を添加し、マイクロチューブを 10~12 回激しく転倒させ、よく混和する(1 ml 容 96 穴プレートを使用する場合はピペッティング等にてよく混和する)。
- ⑧ キット添付の 1.00 ml コレクションプレート上に 96 ウェルカラムプレートをセットした後、⑦の混合液 650 μ l を 96 ウェルカラムプレートへ移す。遠心(1.4~1.8K \times g, 20 分間, 室温)^(注5)した後、濾液はピペットチップで廃棄する。
- ⑨ 650 μ l の GW Buffer を(1.00 ml コレクションプレート上にセットした)96 ウェルカラムプレートに添加し、遠心(1.4~1.8K \times g, 10 分間, 室温)した後、濾液は廃棄する。
- ⑩ 96 ウェルカラムプレートを乾燥させるため、遠心(1.4~1.8K \times g, 10 分間, 室温)した後、濾液は廃棄する。
- ⑪ 96 ウェルカラムプレートを 0.35 ml コレクションプレート上にセットする。
- ⑫ 100 μ l の TE (pH8.0)を滴下した後、3 分間室温にて静置する。
- ⑬ 遠心(1.4~1.8K \times g, 10 分間, 室温)した後、濾液を回収する。
サンプルの保存には、付属のコレクションプレートキャップをご使用下さい(コレクションプレートキャップの耐温度は、-80 $^{\circ}$ C~121 $^{\circ}$ Cです)。

- (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。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) GE1 Buffer へ RNase A を添加した混合液は、混合後 30 分以上経過すると、RNA の分解効率が著しく低下します。使用后、余った混合液は廃棄し、次の DNA 抽出には使用しないで下さい。
- (注 3) ②の混合液は粘度が高くなっています。添加した GE2-K Buffer が十分に混ざるようにしっかりと攪拌を行って下さい。
- (注 4) 沈殿や浮遊物を可能な限り取らないように上清を回収して下さい。
- (注 5) 使用するプレート遠心機の回転数等を確認し、1.8K×g 以上にならないように十分注意して下さい。また、使用するローターがコレクションプレート上にセットした 96 ウェルカラムプレートに干渉しないことや、使用するローターのバケットの高さがコレクションプレートと 96 ウェルカラムプレートの繋ぎ目よりも高いことを確認して下さい。

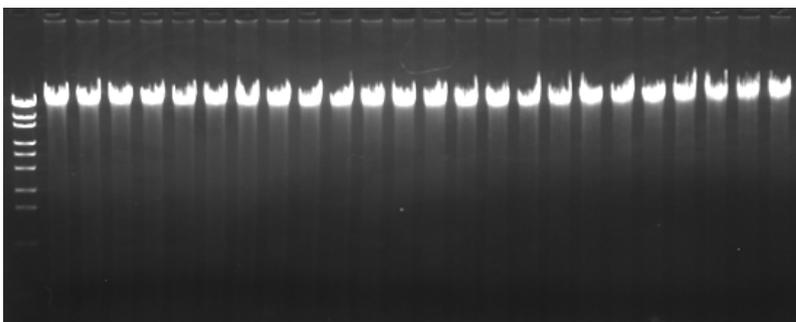
VI データ集

1. トウモロコシ種子からの DNA 抽出

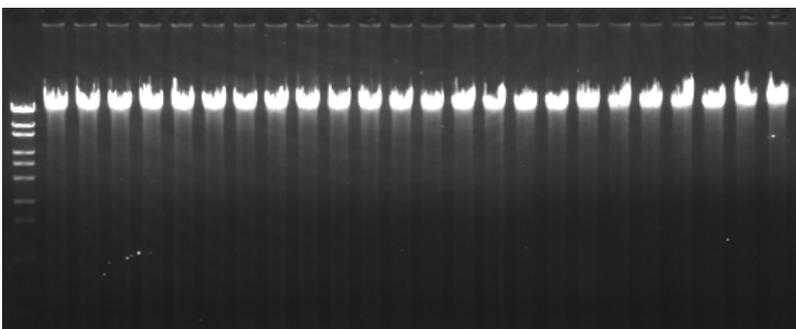
本キットを用いてトウモロコシ種子(甘味種)から DNA 抽出を行った。いずれのウェルも良好に DNA を抽出することができた。



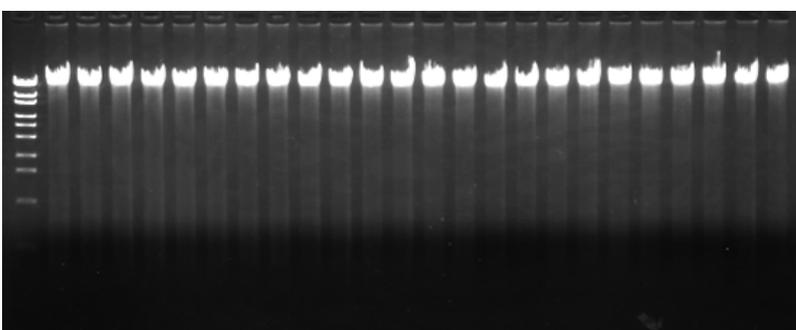
Well : A1-12、B1-12



Well : C1-12、D1-12



Well : E1-12、F1-12



Well : G1-12、H1-12

Marker : OneSTEP Marker 6(λ / *Sfy* I digest)

本キットで回収した DNA 溶液 2.5 μ l を 1% Agarose S で電気泳動した。

2. トウモロコシから抽出した DNA 溶液の吸収スペクトル比と DNA 収量

本キットで抽出したトウモロコシの DNA は、いずれのウェルも $A_{260/280} = 1.8$ 以上であり、高純度な DNA であることが示唆された。

1) トウモロコシ種子(甘味種)から本キットを用いて抽出した DNA の $A_{260/280}$

	260/280 nm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.918	1.913	1.919	1.915	1.923	1.915	1.912	1.920	1.919	1.918	1.921	1.919
B	1.920	1.922	1.918	1.925	1.922	1.954	1.924	1.913	1.922	1.917	1.895	1.917
C	1.920	1.913	1.916	1.924	1.919	1.916	1.924	1.920	1.922	1.920	1.913	1.915
D	1.915	1.915	1.917	1.904	1.912	1.919	1.917	1.918	1.923	1.911	1.912	1.902
E	1.889	1.912	1.904	1.907	1.909	1.911	1.914	1.901	1.908	1.907	1.909	1.894
F	1.904	1.909	1.912	1.911	1.909	1.907	1.909	1.905	1.905	1.908	1.902	1.903
G	1.903	1.908	1.911	1.909	1.912	1.910	1.905	1.906	1.908	1.905	1.905	1.906
H	1.903	1.906	1.901	1.908	1.898	1.902	1.903	1.904	1.910	1.902	1.904	1.901

2) トウモロコシ種子(甘味種)から本キットを用いて抽出した DNA の収量

	DNA Conc. (ng/ μ L)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	77.448	78.950	83.022	80.489	82.226	88.034	90.798	83.620	88.953	87.143	89.845	96.631
B	83.498	87.113	88.313	90.898	80.642	83.558	92.642	92.779	90.647	88.844	89.571	97.796
C	83.947	86.169	93.091	90.790	94.351	87.076	83.531	92.065	95.056	90.847	90.635	98.941
D	83.985	86.643	89.500	76.533	94.320	88.132	75.780	95.701	92.212	89.537	93.336	94.230
E	88.049	90.282	93.296	95.317	93.422	95.516	93.721	97.128	92.712	86.711	97.864	99.170
F	93.700	85.746	83.945	89.073	98.062	96.035	84.753	96.739	94.734	94.373	97.248	97.212
G	93.048	93.933	96.760	99.972	92.001	93.102	94.945	95.895	96.292	96.909	96.118	89.161
H	85.697	95.881	95.638	79.980	94.690	91.497	88.924	87.941	88.054	95.142	95.250	98.677

* TE、100 μ l にて DNA を回収

VII 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
DNAの収量が少ない。	試料の粉砕が不十分。	出来るだけ細かく試料を粉砕して下さい。
	抽出効率が低下している。	GE1 Buffer および RNase A を添加後、よくボルテックス等で攪拌して下さい。
		試料塊が残らないように目視にて確認しながら、攪拌を行って下さい。
溶出が不十分。	TE(pH8.0)を96ウェルカラムプレートへ添加した後、すぐに遠心にてDNAを溶出した場合、DNA収量にばらつきが生じることがあります。一定のDNAの収量を得るためには室温にて3分間静置した後、遠心を行って下さい。	
RNAの混入が多い。	RNase Aの失活。	GE1 BufferとRNase Aは混合した状態では保存できません。それぞれを別々に保存して下さい。 GE1 BufferとRNase Aを混合してから使用する場合は、混合後30分以内にご使用下さい。
OD値が低い。	遠心分離後の沈殿物または、浮遊物を96ウェルカラムプレートに持ち込んでいる。	上清を回収する際は、沈殿をチップの先で触れないように注意深く回収して下さい。

VIII 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
316-07791	<i>GM quicker 4</i>	50 回用
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
319-08141	Collection Tube	100 回用

マニュアル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。

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
www.nippongene.com

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