

MonoFas[®]

研究用試薬キット

アレルギー食品 DNA 抽出キット 13

取扱説明書



株式会社アニモス

目次

1. 製品説明	- 3 -
2. 製品内容	- 3 -
3. 製品仕様	- 3 -
4. 必要な試薬及び器具	- 4 -
5. カラム使用上の注意事項	- 4 -
6. DNA 抽出プロトコールの簡易フロー	- 5 -
7. 保存及びその他の注意	- 7 -
8. 保証期間	- 8 -

1. 製品説明

MonoFas®アレルギー食品 DNA 抽出キット 13 は、アレルギー物質を含む食品やその加工食品粉末から DNA を抽出するキットです。

本製品は均一な連続孔を持つディスク型シリカモノリスを固定したモノリス固相スピнкаラムで、DNA がシリカゲルに吸着する特性を利用してアレルギー食品又は加工食品粉末から DNA の抽出を行います。本製品を使用することにより、アレルギー食品中の DNA を高効率で抽出できます。また不純物の除去率が高く、抽出した DNA 溶液中に無機塩類がないことも本製品の特徴です。本製品で抽出された DNA で、高効率のリアルタイム PCR 増幅が可能です。**MonoFas®**アレルギー食品 DNA 抽出キット 13 の性能を十分に発揮させるため、本取扱説明書をよくお読みの上、正しくお使いください。

2. 製品内容

本製品を受け取りましたら、梱包内容、スピнкаラムの外観、数量、バッファー液等に異常がないか確認してください。内容違い、数量違い、スピнкаラムの外観等に異常がありましたら、すみやかに弊社へご連絡ください。

酵素付

Cat. No.	A13-0201	A13-0202	A13-0203	A13-0204
回数	25	50	100	250
スピнкаラム	25 本×1 袋	50 本×1 袋	50 本×2 袋	50 本×5 袋
Buffer A13 (溶解)	14 mL	28 mL	55 mL	110 mL
Buffer B13 (変性)	6 mL	6 mL	11 mL	28 mL
Buffer C13 (吸着)*	14 mL	28 mL	55 mL	110 mL
Buffer D13 (洗浄)	14 mL	28 mL	55 mL	138 mL
Buffer E13 (溶出)	6 mL	6 mL	11 mL	28 mL
Proteinase K (20mg/mL)	0.5 mL	1 mL	2 mL	5 mL

* 溶出液を回収するチューブは付属していません。別途 1.5 mL~2.0 mL の遠心チューブを用意して下さい。

* Buffer E11 は、10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA (Free) (pH 8.5)です。

3. 製品仕様

	アレルギー食品からの抽出
操作時間	20 分間
最大 DNA 結合量	~ 50 µg
推奨処理量	~ 0.2 g
溶出量	55 µL
DNA 回収量	アレルギー食品又はその加工食品 DNA
DNA の純度	A260/A280 ≒ 1.7~2.1

MonoFas® アレルギー食品 DNA 抽出キット 13

4. 必要な試薬及び器具

- ① MonoFas[®] アレルギー食品 DNA 抽出キット 13
- ② Proteinase K (20mg/mL)
- ③ 1.5mL 遠心チューブ
- ④ 滅菌済 50 mL 遠心管
- ⑤ 高速マイクロ遠心機(20,000 × g (15,000 rpm)の遠心が可能なもの)*
- ⑥ ドライバスと 1.5mL チューブ用ヒートブロックまたはウォーターバス(70°Cで使用可能なもの)
- ⑦ ボルテックスミキサー(2,500 rpm 程度の攪拌ができるもの)
- ⑧ マイクロピペット、マイクロピペット用チップ

* 遠心機によっては使用できないケースがありますので、遠心機の仕様をご確認の上、使用してください。

また本書での以下の基本計算式をもとに相対遠心加速度(×g)と回転数(rpm)を算出しております。

ローターの回転半径は、遠心機によって変わりますので、遠心機取扱説明書のローター仕様ページをご確認ください。

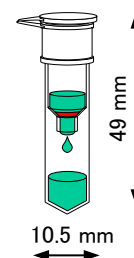
基本計算式

$$RCF = 1.118 \times R \times N^2 \times 10^{-6}$$

RCF: 相対遠心加速度(×g) R: 回転半径(mm) N: 回転数(rpm)

5. カラム使用上の注意事項

- MonoFas[®] スピнкаラムは落としたり、ぶついたりしないでください。強い衝撃を与えるとシリカモノリスが割れることがあります。
- Buffer の保証期間は未開封、室温保存で購入日より1年間です。
- すべての工程は遠心操作で行ってください。
- オートクレーブ処理を行う場合には 110°C以下、20 分以内で行ってください。
- MonoFas[®] スピнкаラムは従来のタイプより通液抵抗が小さくなっておりますので、液の流出を止める場合にはスピнкаラムの蓋を閉めるようにしてください。
- 遠心機を用いる場合はチューブ類が装置の蓋などに接触しない事を確認の上ご使用ください。サイズは右図をご参照下さい。
- 遠心操作時はチューブの蓋を開けた状態で使用してください。蓋を閉めた状態では、スピнкаラム内が陰圧になるためスムーズに通液されません。
- 精製 DNA を分子生物学的操作に用いる場合には、十分に滅菌された容器や滅菌水などを用いてください。
- 本製品は消耗品ですので再使用はできません。
- ご所属の機関の倫理委員会の規定に従い作業してください。また、カラムの廃棄の際には、遺伝情報が残らないことと、感染症への配慮を考慮してください。
- 余ったバッファーの廃棄方法は、安全データシート(SDS)に記載された通り廃棄ください。

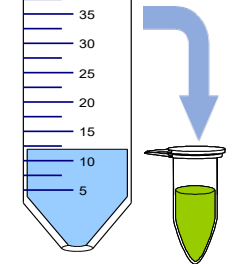


6. DNA 抽出プロトコールの簡易フロー

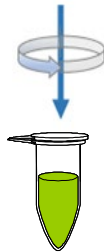
《アレルギー食品粉末 0.2 g からの DNA 抽出方法》

前処理
溶解

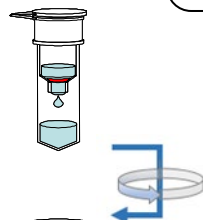
アレルギー食品 5.0 g を滅菌水 25 mL に浸して十分にホモジナイズし、
9,000 xg 10 min. 遠心、上清を除去する。



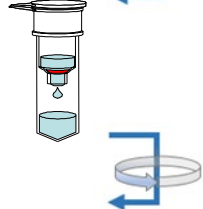
調整



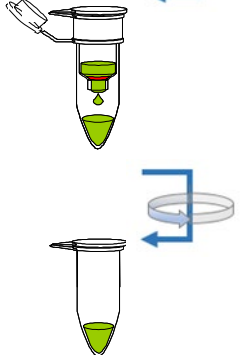
吸着



洗浄



溶出



- ① 0.2 g 沈殿物を 2 mL チューブに入れる
- ② Buffer A13 400 μ L を添加、ホモジナイズ
20 μ L の ProteinaseK を添加、ボルテックス混和
60°C 10 min (2 min. 毎に一回ミキサーで攪拌する。)
- ③ Buffer B13 100 μ L を添加、ボルテックス混和

20,000 xg (15,000 rpm) 5 min. 遠心
- ④ 全ての上清約 500 μ L を新しい遠心チューブに移す。
- ⑤ Buffer C13 400 μ L 添加、5~10 強く転倒混和
- ⑥ 溶解混合液全量を MonoFas カラムにアプライする。

20,000 xg (15,000 rpm) 1 分間遠心
濾液を捨てカラムに再装着する

⑦ Buffer D13 500 μ L

20,000 xg (15,000 rpm) 1 分間遠心
カラムを新しいサンプリングチューブに装着する

⑧ Buffer E13 55 μ L
(27.5 μ L で 2 回溶出推奨)

20,000 xg (15,000 rpm) 1 分間遠心
溶出 DNA を回収する

【対象試料】

- 1 桜えび (素干し)
- 2 桜えび (煮干し)
- 3 かき餅
- 4 スナック菓子
- 5 即席めん
- 6 エビフライ (冷凍)
- 7 かき揚げ (冷凍)
- 8 エビチリソース (冷凍)
- 9 しゅうまい (チルド)
- 10 茶わんむし
- 11 かに缶詰
- 12 スナック菓子
- 13 即席めん (シーフード味)
- 14 ぞうすいの素 (具入り粉末)
- 15 ゆでパスタ (冷凍)
- 16 かに玉の素 (レトルト)
- 17 コロッケ (冷凍)
- 18 しゅうまい (チルド)
- 19 茶わんむし
- 20 かにスープ (レトルト)
- 21 かにからし明太
- 22 落花生
- 23 そば
- 24 小麦

抽出・精製 DNA ※抽出・精製 DNA は -20°C で保存してください。

MonoFas® アレルギー食品 DNA 抽出キット 13

<注意事項>

- ① アレルギー食品及びその加工食品粉末サンプルを準備する。

アレルギー食品又は加工食品 5.0 g粉末試料を50 mLの遠心チューブに入れ、滅菌水25 mLに浸して十分にホモジナイズし、9,000 xg 10 min. 遠心し、上清を除去する。

- ① その 0.2 g沈殿物を2 mLチューブに入れる。

- ② Buffer A13 0.4 mLを添加し、Proteinase K (20 mg/mL) を20 µL入れ、攪拌混合（ボルテックス）、60°Cでインキュベート。10分間加熱する。2分間毎に1回ミキサーで攪拌する。

注) アレルギー食品量が多すぎた場合、カラムの目詰まり、回収量減少、精度低下の可能性があります。

目詰まりした場合は、量を減らして検討してください。またアレルギー食品の量が多い場合はBuffer A13の量を0.4 mLから0.5 mLに変更する。

- ③ Buffer B13を100 µL添加後激しく攪拌混合。20,000 ×g (15,000 rpm) 5分間遠心する。

- ④ 全ての上清約0.5 mLを新しい2 mLの遠心チューブに移す。

- ⑤ Buffer C13を400 µL添加し、激しく5~10強く転倒混和する、数秒間スピンドアウンして、キャップや壁についた液を収集する。

注1) 混和が不充分なときは、タッピング、ピペッティングあるいは転倒混和などでよく混ぜてください。

ライセート完成後は、速やかに抽出操作を行ってください。

注2) 凝集物が出来た場合、凝集物を含めすべてカラムに添加してください。

【ライセート完成】

- ⑥ ライセートを数回ピペッティングし、スピнкаラムに全量添加してください。スピнкаラムを、20,000 ×g (15,000 rpm) にて30秒間遠心させます。遠心機からカラムと廃液容器を注意深く取り出します。コレクションチューブ内の廃液を捨て、スピнкаラムに再装着してください。

注) 遠心後ライセートがカラム内に残っている場合、最高速度で再度遠心操作を行ってください。遠心操作で液が完全に通過しない場合は、スピнкаラムの蓋を開けて遠心して下さい。

- ⑦ 洗浄

注意深くスピнкаラムの蓋を開け、Buffer D13を500 µL添加してください。スピнкаラムを、20,000 ×g (15,000 rpm) にて1分間遠心してください。遠心機からカラムと廃液容器を注意深く取り出します。廃液の入った容器を捨ててください。

注1) 遠心後 Buffer D13がカラム内に残っている場合、最高速度で再度遠心操作を行ってください。

注2) Buffer D13が残余すると回収率が悪くなる場合がありますので注意してください。また、溶出液に混入すると遺伝子増幅反応を阻害するのでご注意ください。

- ⑧ 回収

スピнкаラムをサンプリングチューブにのせかえます。注意深くカラムの蓋を開け、Buffer E13を55 µL、モノリス表面の中央に添加してください。その後20,000 ×g (15,000 rpm) で1分間遠心し、溶出する。遠心機からカラムとサンプリングチューブを注意深く取り出し、カラムを捨てます。

以上でアレルギー食品中DNAの抽出は完了です。

注) スピнкаラムに添加した溶出Buffer E13は、ほぼ全量が回収されます。

注) 回収したDNAをすぐに使用しない場合は、回収容器のキャップをしっかりと閉めた後、-20°Cで保存する

ことをお勧めします。

注) 本製品に同封されているBuffer E13は、RNase・DNaseフリー滅菌水に置き換えることが可能です。その場合、pHにより回収率が変動するためアンモニア水や水酸化カリウムなどでpH 8.5~9.0に調整してご使用ください

<アレルギー食品に関する注意事項>

- ① アレルギー食品から充分量の DNA を回収したい場合は、試料を滅菌水に一晩浸し膨潤させた後、ホモジナイズ、遠心し、上清を除いた沈殿を使用してください。
- ② アレルギー食品を粉末にしないと、DNA の回収量が減少することがありますので、十分に粉碎処理して下さい。
- ③ 処理可能量を超えたアレルギー食品をオーバーロードしてしまうと、性能が低下し、最悪の場合、カラムの目詰まりを引き起こします。

<使用に関する注意事項>

- ② 所定量の Buffer A13 を使用してください。試薬の容量は抽出プロトコールに記載された量を厳守してください。
- ③ コンタミネーションを防ぐために毎回ピペットチップを交換してください。
- ④ 遠心後、遠心機からカラムと廃液容器を取り外す際は、廃液がカラム先端に付着しないよう注意深く取り外してください。付着した場合は軽くスピンドウンを行ってください。
- ⑤ 遠心機内の温度が上昇するのを防ぐため、遠心機の連続運転は避けてください。
- ⑥ 抽出の途中では時間をおかず、操作は速やかに行ってください。
- ⑦ 感染性のおそれのあるサンプルを使用した場合、廃棄物は感染性産業廃棄物に該当しますので、適切な処理を行ってください。
- ⑧ 本製品はアレルギー食品中のゲノム DNA を抽出するためのキットで、その他の目的にはご使用になれません。

7. 保存及びその他の注意

- 室温(15℃ ~ 25℃)で保存してください。
- 洗浄液には、揮発性の高いエタノールが含まれています。ご使用後は、蒸発を防ぐために必ず蓋を閉めてください。
- MonoFas® 抽出・精製キットは温度変化が小さく、湿気の少ない涼しく清浄な暗所に保管してください。
- MonoFas® 抽出・精製キットは厳しい品質管理のもとで製造、検査、包装、出荷しておりますが、万一不具合がありましたら弊社までご連絡ください。
- 本製品はアレルギー食品又はその加工食品中からのゲノム DNA 抽出・精製の目的で製造しております。それ以外の目的での使用および本取扱説明書に基づかない方法では使用しないでください。
- 本試薬キットを使用前に、安全データシート(SDS)の記載内容をご一読ください。安全データシート(SDS)の詳細は弊社 HP(URL <http://www.animos.co.jp>)よりダウンロードして入手願います。

8. 保証期間

- 各種 Buffer の保証期間は未開封、室温保存で購入後 1 年間です。
各種 Buffer が追加が必要な際には、最寄りの支店または営業所までご連絡ください。

ゾルーゲル法によるシリカモノリスは、国立大学法人京都大学 曾我直弘先生、中西和樹先生により開発されました。この技術と、ジールサイエンス株式会社が所有する製品商標及び特許のライセンスを受けて、MonoFas[®] シリーズ製品を株式会社アニモスが開発・製造しています。

お問い合わせ先：株式会社アニモス

〒333-0844 埼玉県川口市上青木 3-12-18

TEL:048-606-2892 FAX:048-611-7192 E-mail:monofas@animos.co.jp

MonoFas[®] アレルギー食品 DNA 抽出キット 13