

MonoFas[®]

研究用試薬キット

Food Kit アレルゲン検査用

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. MonoFas®スピнка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	- 8 -
8. 保証期間	- 8 -

1. 製品説明

MonoFas® Food Kit アレルゲン検査用キットは、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。

次世代の高分離フィルターである均一な連続孔を持つシリカモノリス採用し、高効率、高純度を実現しながら、短時間で簡便な抽出操作で行なえるのが特長です。本キットは、アレルギー食品検査の PCR 法において、シリカゲル膜タイプキット法に属しながらイオン交換樹脂タイプキット法と同等の高純度 DNA を短時間で抽出が可能です。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、アレルゲン検査以外にも、GMO 検査、食品微生物検査、原材料検査等への適応も可能です。

MonoFas® Food Kit アレルゲン検査用キット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。

Cat. No.	A17-0201	A17-0202	A17-0203
回数	25	50	100
スピнкаラム	25 本×1 袋	50 本×1 袋	50 本×2 袋
Buffer A17 (溶解)	9 mL	17 mL	33 mL
Buffer B17 (変性・吸着)	9 mL	17 mL	33 mL
Buffer C17 (洗浄)	14 mL	28 mL	55 mL
Buffer D17 (溶出)*	6 mL	6 mL	11 mL
Proteinase K (20 mg/mL)	0.5 mL	1 mL	2 mL

*Buffer D17 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 DNA 抽出
原理	シリカゲル膜タイプキット法 (シリカモノリス法)
操作時間	～35 分
最大 DNA 結存量	～50 µg
推奨処理量	～0.2 g
溶出量	50～100 µL
DNA の純度 (A260/A280)	1.7～2.1
DNA の純度 (A260/A230)	1.7～2.1

MonoFas® Food Kit アレルゲン検査用

4. 必要な試薬及び器具

<本キット以外に必要な試薬、機器>

- 99.5%エタノール（特級グレードを推奨）
- マイクロピペット、マイクロピペット用チップ
- 1.5 又は 2.0 mL 遠心チューブ
- 50 mL 遠心管
- フードミル（カッターミル等）
- 遠心機 ※
- 恒温槽：ドライバス 又は ウォーターバス（70℃で使用可能なもの）
- ボルテックスミキサー（2,500 rpm 程度の攪拌ができるもの）

※ 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. MonoFas®カラム使用上の注意事項

- スピンカラムは落としたり、ぶつけ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。
- すべての工程は遠心操作で行ってください。
- スピンカラムはオートクレーブ処理が可能です。処理後は、真空乾燥機を利用して十分乾燥させてから使用してください。
オートクレーブ条件：110℃以下、20分以内
乾燥条件：真空化 100℃以下 5時間以上
- スピンカラムは汎用のシリカメンブレンカラム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ンカ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。
- 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、スピン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。

6. DNA 抽出プロトコールの簡易フロー

<食品の前処理方法について>

アレルギー食品及びその加工食品の均質化処理した調製試料を準備してください。

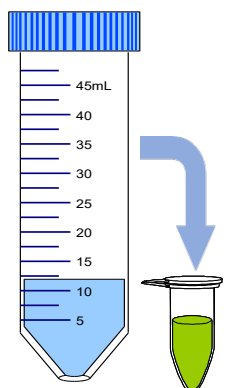
食品検査では、サンプリングの誤差を小さくするため、食品が均一になるように十分ホモジナイズする（均質化処理）必要があります。均質化処理の方法として、消費者庁から通知された「アレルギーを含む食品の検査方法」に基づいた調整方法では、食品一包装単位に含まれる可食部全体を試料とし、試料の全量を粉碎机あるいはミキサーミル等で十分に破碎し、均質混和して調製試料とする方法が記載されている。

均質化処理が困難試料については、均質化処理過程において、試料と同重量の水を加え、十分に均質化操作を行った後に、凍結乾燥処理を行い、再度粉碎操作を行ったものを調製試料とする方法や試料が液体の場合には、ミキサーミル等を用いた均質化を行った後、凍結乾燥処理に供し、処理後、再びミキサーミル等を用いた粉碎処理を経たものを調製試料とする方法があります。

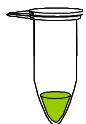
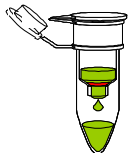
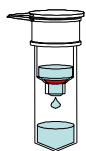
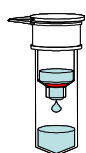
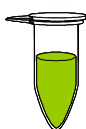
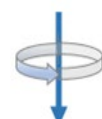
<遠心加速度と回転数について>

当社のスピncラムは通液性に優れているシリカモノリスフィルターを採用しており、汎用の卓上遠心機を用いて、遠心加速度 $10,000 \times g$ 未満の設定で使用可能です。しかしながら、 $10,000 \times g$ 未満の場合、核酸の量や溶液の粘度によって、目詰まりが発生するケースがあります。目詰まりが発生した場合は、必要に応じて遠心加速度を上げる、遠心時間を延長する等の追加遠心を行い、アプライした液体がスピncラムに残らないように通液させてください。

《アレルギー食品及びその加工食品からの DNA 抽出方法》



調製試料(均質化処理済) 5.0 g を滅菌水 25 mL に浸して十分にホモジナイズし、 $\geq 9,000 \times g$ (10,000 rpm) 10 分間遠心後上清を除去する



沈殿物 ~200 mg を遠心チューブに秤量する

- ① Buffer A17 300 μ L + Proteinase K 20 μ L ポルテックス混和
- ② 60°C 10 分間加温 (約 2 分毎に 10 秒間ポルテックス混和)
- ③ Buffer B17 300 μ L ポルテックス混和
- ④ $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 5 分間遠心
- ⑤ 上清約 500 μ L を新しい遠心チューブに移す
- ⑥ エタノール 500 μ L 添加、10 回程度強く転倒混和
- 注) エタノールを添加後は遠心を行わないこと**
- ⑦ 溶解混合液全量をスピнкаラムにアプライ

$\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心
濾液を捨てスピнкаラムに再装着

⑧ Buffer C17 500 μ L

$\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心
スピнкаラムを新しいサンプリング用遠心チューブに装着

⑨ Buffer D17 50~100 μ L

$\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心
溶出DNAを回収

※抽出・精製 DNA は-20°Cで保存してください。

<詳細プロトコール>

DNA抽出工程

- ① 調製試料（均質化処理済）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、 $\geq 9,000 \times g$ (10,000 rpm) 10 分間遠心し、上清を除去する。
 - ② 沈殿物 ~200 mgを1.5 又は 2.0 mL遠心チューブに秤量する。
 - 沈殿物量が多すぎた場合、スピнка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。
 - ③ Buffer A17 300 μ Lを添加し、Proteinase K (20 mg/mL) を20 μ L入れ、攪拌混合（ボルテックス）を行う。
 - ④ 60°Cで10分間インキュベートを行う。2分間毎に10秒間攪拌混合（ボルテックス）を行う。
 - ⑤ Buffer B17 300 μ L添加し、よく攪拌混合（ボルテックス）を行う。
 - ⑥ $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 10分間遠心する。
 - 上清と沈殿物がうまく分離しない場合は、遠心加速度を上げるか、遠心時間を延ばしてください。
 - ⑦ 上清約500 μ Lを新しい1.5 又は 2.0 mL遠心チューブに移す。
 - ⑧ 99.5%エタノールを500 μ L添加し、10回程度強く転倒混和する。
 - 混和が不十分なときは、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。
 - 凝集物が出来た場合、再度遠心することなく、凝集物を含めて、すべてスピнкаラムにアプライしてください。
 - ⑨ 混合液全量をスピнкаラムにアプライ後、 $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心する。
 - 遠心後、液がスピнка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ください。
 - ⑩ 遠心機からスピнкаラムとコレクションチューブを注意深く取り出す。コレクションチューブ内の廃液を捨て、スピнкаラムに再装着する。
 - ⑪ スピнкаラムの蓋を開け、Buffer C17を500 μ L添加し、 $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心する。
 - 遠心後 Buffer C17がスピнка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。
 - Buffer C17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。
 - ⑫ 遠心機からスピнкаラムとコレクションチューブを注意深く取り出す。廃液の入ったコレクションチューブを廃棄する。
 - ⑬ スピнкаラムを新しい1.5 mLサンプリング用遠心チューブに装着後、スピнкаラムの蓋を開け、Buffer D17を50~100 μ L、モノリス表面の中央に添加する。その後、 $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心する。
 - ⑭ 遠心機からスピнкаラムとサンプリング用遠心チューブを注意深く取り出し、スピнкаラムを廃棄する。
- 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 D17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、サンプリング用遠心チューブ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 D17は、RNase・DNaseフリー滅菌水に置き換えることが可能です。その

MonoFas[®] Food Kit アレルゲン検査用

場合、pHにより回収率が変動するためアンモニア水などでpH 8.5~9.0に調整してご使用ください。

<使用に関する注意事項>

- ① 試薬の容量は抽出プロトコルに記載された量を厳守してください。
- ② 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。
- ③ 遠心後、遠心機からスピncラムとコレクションチューブを取り外す際は、廃液がスピnc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ncダウンを行ってください。
- ④ 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。
- ⑤ 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。
- ⑥ 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。

7. 保存及びその他の注意

- 室温（15℃ ~ 25℃）で保存してください。
- 酵素（Proteinase K）は室温保管が可能ですが、開封後は冷蔵保管（2~8℃）を推奨します。
- 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。
- 本製品は口腔内サンプルからの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）の記載内容をよく読んでください。
 - 安全データシート（SDS）の（URL <http://www.animos.co.jp>）よりダウンロードして入手願います。
- 余ったBuffer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。

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が追加で必要な際には、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、ジューエ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® Food Kit アレルゲン検査用