

MonoFas[®]

研究用試薬キット

Food Kit 遺伝子組換え (GMO) 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	- 12 -
8. 保証期間	- 12 -

1. 製品説明

MonoFas® Food Kit 遺伝子組換え (GMO) 検査用キットは、遺伝子組換え原料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、遺伝子組換え食品検査の 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、遺伝子組換え食品の検査以外にも、特定原材料検査、食品微生物検査、原材料検査等への適応も可能です。

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.	A18-0201	A18-0202	A18-0203
回数	25	50	100
スピнкаラム	25 本×1 袋	50 本×1 袋	50 本×2 袋
Buffer A18 (溶解)	40 mL	80 mL	160 mL
Buffer B18 (変性・吸着)	40 mL	80 mL	160 mL
Buffer C18 (洗浄)	14 mL	28 mL	55 mL
Buffer D18 (溶出) *	6 mL	6 mL	11 mL
Proteinase K (20 mg/mL)	0.5 mL	1 mL	2 mL

*Buffer D18 は、10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA (Free) (pH 8.5) です。

3. 製品仕様

	遺伝子組換え食品からの 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	~ 40 分
最大 DNA 結合量	~ 50 µg
推奨処理量	~ 1.0 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 遺伝子組換え (GMO) 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[®] スピнкаラム使用上の注意事項

- 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。
- すべての工程は遠心操作で行ってください。
- スピнка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нка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。
- 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нка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>

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、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碎する方法、又は、試料をフリーズドライ等により乾燥させて粉碎する方法が記載されている。

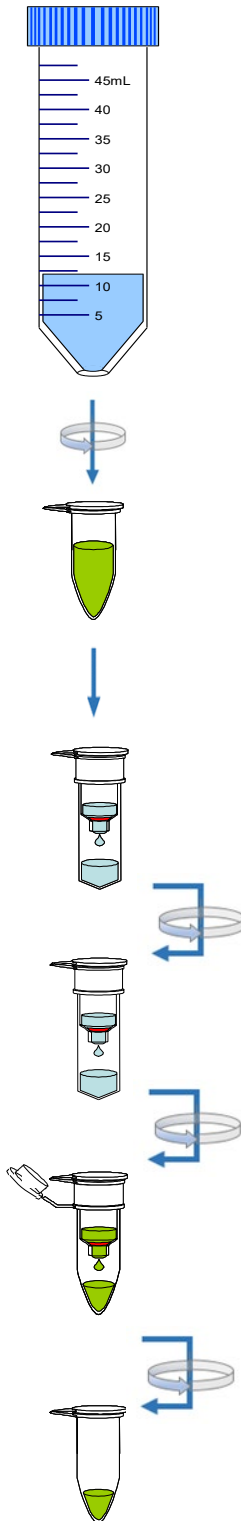
均質化処理が困難試料については、均質化処理過程において、試料と同重量の水を加え、十分に均質化操作を行った後に、凍結乾燥処理を行い、再度粉碎操作を行ったものを調製試料とする方法や試料が液体の場合には、ミキサーミル等を用いた均質化を行った後、凍結乾燥処理に供し、処理後、再びミキサーミル等を用いた粉碎処理を経たものを調製試料とする方法があります。

本キットでは、プロトコール①には、乾燥粉末試料を対象とした抽出方法、プロトコール②には、液体の食品や試料に滅菌水を加えてホモジナイズした試料を対象とした抽出方法、プロトコール③には、少量試料を対象とした抽出方法を示す。また、遺伝子組換え食品の原料は、加工品比べDNA量が十分確保できるため、少量試料を対象としたプロトコール③を推奨します。

<遠心加速度と回転数について>

当社のスピнка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 × g 未満の設定で使用可能です。しかしながら、10,000 × 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場合があります。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нкаラムに残らないように通液させてください。

《プロトコール①乾燥粉末試料からの DNA 抽出方法》



調製試料(均質化处理済) ~1.0 g を遠心管に秤量する

- ① Buffer A18 1.5 mL + Proteinase K 20 μ L ボルテックス混和
- ② 60°C 10 分間加温 (約 2 分毎に 10 秒間ボルテックス混和)
- ③ Buffer B18 1.5 mL ボルテックス混和
- ④ $\geq 4,000 \times g$ (7,000 rpm) 10 分間遠心

- ⑤ 上清約 900 μ L を新しい遠心チューブに移す
- ⑥ エタノール 900 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 2 回に分けてスピ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 C18 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 D18 50~100 μ L

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

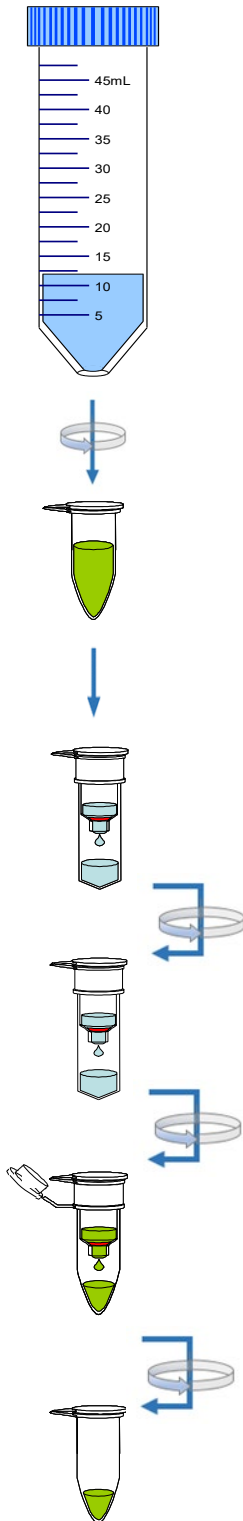
※抽出・精製 DNA は -20°C で保存してください。

<詳細プロトコール>

DNA抽出工程

- ① 乾燥粉末試料 ~1.0 gを15 または 50 mL遠心管に秤量する。
 - 乾燥粉末試料が多すぎた場合、スピnc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。
- ② Buffer A18 1.5 mL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。
- ③ 60°Cで10分間インキュベートを行う。2分間毎に10秒間ボルテックスを行う。
- ④ Buffer B18 1.5 mL添加し、よく攪拌混合（ボルテックス）を行う。
- ⑤ $\geq 4,000 \times g$ (7,000 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。
- ⑥ 上清約900 μ Lを新しい2.0 mL遠心チューブに移す。
- ⑦ 99.5%エタノールを900 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ncラムにアプライして
ください。
- ⑧ 混合液をスピncラムに最大1.0 mLアプライ後、 $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心する。
- ⑨ 遠心機からスピnc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ncラムに再装着する。
- ⑩ 残りの混合液をスピnc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nc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ncラムの蓋を開けて遠心して下さい。
- ⑪ 遠心機からスピnc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ncラムに再装着する。
- ⑫ スピncラムの蓋を開け、Buffer C18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 C18がスピnc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 C18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。
- ⑬ 遠心機からスピnc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。
- ⑭ スピnc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ncラムの蓋を開け、Buffer D18
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。
- ⑮ 遠心機からスピnc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ncラムを廃棄する。

《プロトコール②液体試料からの DNA 抽出方法》



調製試料(均質化处理済) ~1.0 g を遠心管に秤量する

- ① Buffer A18 800 μ L + Proteinase K 20 μ L ボルテックス混和
- ② 60°C 10 分間加温 (約 2 分毎に 10 秒間ボルテックス混和)
- ③ Buffer B18 800 μ L ボルテックス混和
- ④ $\geq 4,000 \times g$ (7,000 rpm) 10 分間遠心

- ⑤ 上清約 900 μ L を新しい遠心チューブに移す
- ⑥ エタノール 900 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 2 回に分けてスピ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 C18 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 D18 50~100 μ L

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

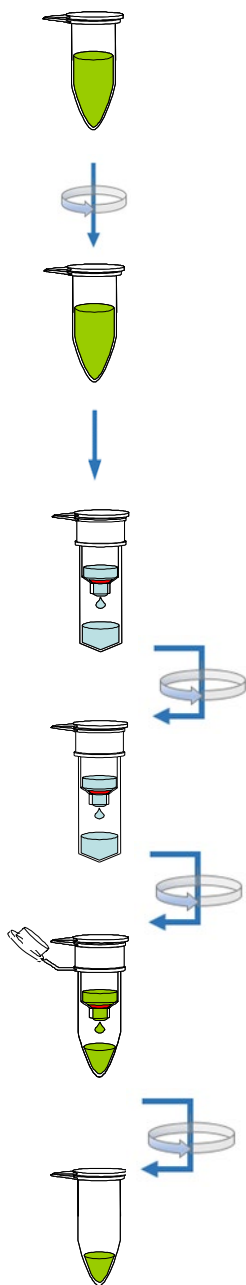
※抽出・精製 DNA は -20°C で保存してください。

<詳細プロトコール>

DNA抽出工程

- ① 乾燥粉末試料 ~1.0 gを15又は50 mL遠心管に秤量する。
 - 液体試料が多すぎた場合、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。
- ② Buffer A18 800 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。
- ③ 60°Cで10分間インキュベートを行う。2分間毎に10秒間ボルテックスを行う。
- ④ Buffer B18 800 μ L添加し、よく攪拌混合（ボルテックス）を行う。
- ⑤ $\geq 4,000 \times g$ (7,000 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。
- ⑥ 上清約900 μ Lを新しい2.0 mL遠心チューブに移す。
- ⑦ 99.5%エタノールを900 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。
- ⑧ 混合液をスピнкаラムに最大1.0 mLアプライ後、 $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 1分間遠心する。
- ⑨ 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。
- ⑩ 残りの混合液をスピ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下さい。
- ⑪ 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。
- ⑫ スピнкаラムの蓋を開け、Buffer C18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 C18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 C18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。
- ⑬ 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。
- ⑭ スピнкаラムを新しい1.5mL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 D18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。
- ⑮ 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。

《プロトコール②少量試料からの DNA 抽出方法》



沈殿物 ~200 mg を遠心チューブに秤量する

- ① Buffer A18 300 μ L + Proteinase K 20 μ L ボルテックス混和
- ② 60°C 10 分間加温 (約 2 分毎に 10 秒間ボルテックス混和)
- ③ Buffer B18 300 μ L ボルテックス混和
- ④ $\geq 10,000 \times g$ (11,000 rpm) 5 分間遠心
- ⑤ 上清約 450 μ L を新しい遠心チューブに移す
- ⑥ エタノール 450 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ンカラムにアプライ

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

濾液を捨てスピンカラムに再装着

⑧ Buffer C18 500 μ L

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

スピンカラムを新しいサンプリング用遠心チューブに装着

⑨ Buffer D18 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 試料 ~200 mgを1.5 又は 2.0 mL遠心チューブに秤量する。
 - 試料が多すぎた場合、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。
- ② Buffer A18 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。
- ③ 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。
- ④ Buffer B18 300 μ L添加し、よく攪拌混合（ボルテックス）を行う。
- ⑤ $\geq 10,000 \times g$ (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。
- ⑥ 上清約450 μ Lを新しい1.5 又は 2.0 mL遠心チューブに移す。
- ⑦ 99.5%エタノールを450 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。
- ⑧ 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。
- ⑨ 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。
- ⑩ スピнкаラムの蓋を開け、Buffer C18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 C18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 C18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。
- ⑪ 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。
- ⑫ 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 D18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。
- ⑬ 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。

以上で遺伝子組換え (GMO) 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 D18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 D18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

MonoFas[®] Food Kit 遺伝子組換え (GMO) 検査用

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ー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）の記載内容をご確認ください。
 - 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® Food Kit 遺伝子組換え(GMO)検査用