

GM quicker

- GMO DNA Extraction Kit for Grain -

マニュアル

Ver. 2.4

Code No. 317-06361

GM quicker は「組換え DNA 技術応用食品
の検査方法」に準拠した試薬です。
(食安発第 0629002 号)



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	3
IV 使用上の注意	3
V プロトコール	3
<トウモロコシ DNA 抽出プロトコール(検査法に準拠したプロトコール)>	4
<トウモロコシ DNA 抽出プロトコール(キット標準プロトコール)>	5
<100 mg トウモロコシ種子粉碎試料からの DNA 抽出プロトコール>	6
<ダイズ DNA 抽出プロトコール(検査法に準拠したプロトコール)>	7
<ダイズ DNA 抽出プロトコール(キット標準プロトコール)>	8
<100 mg ダイズ種子粉碎試料からの DNA 抽出プロトコール>	9
VI データ集	11
1. トウモロコシおよびダイズ種子からの DNA 抽出	11
2. トウモロコシおよびダイズ種子から抽出した DNA の吸収スペクトル	11
3. トウモロコシおよびダイズ種子から抽出した DNA の制限酵素消化	12
4. PCR による内在性遺伝子の検出	12
VII トラブルシューティング	13
VIII 関連製品	14
IX 簡易プロトコール	15

I 製品説明

GM quicker は、トウモロコシやダイズなどの穀粒から 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)の検査においては、DNA を用いた方法が広く普及していますが、これまでの植物 DNA 抽出キットは抽出対象を「葉」としていたため、トウモロコシやダイズなどの穀粒からの DNA 抽出には必ずしも効率的ではありませんでした。

本キットでは、抽出対象を穀粒へ特化させることによって、約 45 分間という短い時間で高い精製度の DNA を抽出することができます。また、本キットは検査用試料の調製におけるクロスコンタミネーションなど、抽出操作上の問題に配慮した設計となっています。さらに、本キットで使用するスピニングカラムは、カラム容積を最大限確保しており、内封されたシリカゲル膜は、十分な DNA 吸着容量と高い溶出効率を確保しています。

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

II キット内容

GE1 Buffer	100 ml	× 3 本
GE2 Buffer	37.5 ml	× 1 本
GB3 Buffer	12.5 ml	× 1 本
GW Buffer	40 ml	× 1 本
TE (pH8.0)	10 ml	× 1 本
RNase A(100mg/ml)	0.5 ml	× 2 本
Spin Column	50 個	
マニュアル	1 部	

* トウモロコシ粉末試料 1g の場合、DNA 抽出を 50 回行うことができます。

ダイズ粉末試料 1g での DNA 抽出を 50 回行う場合には、GE1 Buffer、GE2 Buffer および RNase A が不足しますので別途購入して下さい。

関連製品

314-06371	GE1 Buffer	500 ml	12,000 円
311-06381	GE2 Buffer	200 ml	8,000 円
318-06391	RNase A (100 mg/ml)	0.5 ml×5	19,600 円

III 保存

本キットに含まれる全ての試薬は、室温保存(15℃～25℃)が可能です。RNase A は室温保存が可能です。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。

Spin Column は、製品到着後、直ちにキットから取り出し、冷蔵保存(2～10℃)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いしないで下さい。
- ・ 本キットのお取り扱いは、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>

- ・ 100% エタノール
- ・ イソプロパノール
- ・ 氷
- ・ マイクロピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ 50 ml チューブ
- ・ 2 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
- ・ 冷却遠心機
- ・ ボルテックスミキサー

<トウモロコシ DNA 抽出プロトコール> * 検査法に準拠したプロトコール

* 「組換え DNA 技術応用食品の検査方法」に準拠したプロトコールです(食安発第 0629002 号)。詳細は、厚生労働省が通知している「組換え DNA 技術応用食品の検査方法」をご確認下さい。

- ① トウモロコシ種子をフードミル等で均質に粉砕し、トウモロコシ粉末試料を調製する。
- ② トウモロコシ粉末試料 1.0 g を 50 ml 遠心チューブに量り採り、6 ml の GE1 Buffer および 20 μ l の RNase A をそれぞれ添加する。試料塊がないようにボルテックスミキサーにて 30 秒間攪拌する。^(注1)
- ③ 10 分間 室温で静置する。
- ④ 750 μ l の GE2 Buffer を添加し^(注2)、10~12 回チューブを激しく転倒させ、よく混和する。
- ⑤ 10 分間 氷上に静置する。
- ⑥ 遠心($\geq 5K \times g$, 10 分間, 4°C)する。^(注3)
- ⑦ 上清 4 ml 程度を新しい 50 ml チューブに移す。^(注4)
- ⑧ ⑦で回収した上清から 400 μ l を 1.5 ml マイクロチューブに移し、残った上清は 4°C で保存する。^(注5)
- ⑨ 50 μ l の GB3 Buffer を添加する。
- ⑩ 200 μ l のエタノールを添加し、10~12 回チューブを激しく転倒させ、よく混和する。^(注6)
- ⑪ ⑩の混合液を Spin Column に全量(650 μ l) 移し、遠心($\geq 13K \times g$, 30 秒間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑫ 600 μ l の GW Buffer を Spin Column に添加した後、遠心($\geq 13K \times g$, 60 秒間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑬ Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
- ⑭ Spin Column を乾燥させるため、遠心($\geq 13K \times g$, 3 分間, 4°C)する。
- ⑮ Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
- ⑯ 50 μ l の 水 を Spin Column に滴下した後、3 分間 室温で静置する。
* 回収した DNA を定量 PCR に使用する場合は、水 の代わりに TE(pH8.0) を使用する。
- ⑰ 遠心($\geq 13K \times g$, 60 秒間, 4°C)し、濾液を回収する。
- ⑱ 得られた濾液を DNA 試料原液とする。

<トウモロコシ DNA 抽出プロトコール> * キット標準プロトコール

- ① トウモロコシ種子をフードミル等で粉砕し、トウモロコシ粉末試料を調製する。
- ② 50 ml チューブで 1.0 g のトウモロコシ粉末試料を秤量し、6 ml の GE1 Buffer および 20 μ l の RNase A をそれぞれ添加する。ボルテックスミキサーにて 30 秒間攪拌する。^(注1)
- ③ 10 分間室温で静置する。
- ④ 750 μ l の GE2 Buffer を添加し^(注2)、10~12 回チューブを激しく転倒させ、よく混和する。
- ⑤ 10 分間氷冷する。
- ⑥ 遠心($\geq 5K \times g$, 10 分間, 4°C)する。^(注3)
- ⑦ 上清 4 ml 程度を新しい 50 ml チューブに移す。^(注4)
- ⑧ ⑦で回収した上清から 400 μ l を 1.5 ml マイクロチューブに移し、残った上清は 4°C で保存する。^(注5)
- ⑨ 50 μ l の GB3 Buffer を添加する。
- ⑩ 200 μ l のエタノールを添加し、10~12 回チューブを激しく転倒させ、よく混和する。^(注6)
- ⑪ ⑩の混合液を Spin Column に全量移し、遠心($\geq 13K \times g$, 30 秒間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑫ 600 μ l の GW Buffer を Spin Column に添加した後、遠心($\geq 13K \times g$, 60 秒間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑬ Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
- ⑭ 50 μ l の TE(pH8.0)を滴下した後、3 分間室温で静置する。
- ⑮ 遠心($\geq 13K \times g$, 60 秒間, 4°C)し、濾液を回収する。

<100mg トウモロコシ種子粉碎試料からの DNA 抽出プロトコール>

* 小スケールプロトコール

- ① トウモロコシ種子をフードミル等で粉碎し、トウモロコシ粉末試料を調製する。
- ② 2 ml チューブで 100 mg のトウモロコシ粉末試料を秤量し、600 μ l の GE1 Buffer および 4 μ l の RNase A をそれぞれ添加する。ボルテックスミキサーにて 30 秒間攪拌する。^(注1)
- ③ 5 分間室温で静置する。
- ④ 75 μ l の GE2 Buffer を添加し^(注2)、10~12 回チューブを激しく転倒させ、よく混和する。
- ⑤ 5 分間氷冷する。
- ⑥ 遠心(13K \times g, 5 分間, 4 $^{\circ}$ C)する。^(注3)
- ⑦ 上清 400 μ l 程度を新しい 1.5 ml チューブに移す。^(注4)
- ⑧ 50 μ l の GB3 Buffer を添加する。
- ⑨ 200 μ l のエタノールを添加し、10~12 回チューブを激しく転倒させ、よく混和する。^(注6)
- ⑩ ⑨の混合液を Spin Column に全量移し、遠心(\geq 13K \times g, 30 秒間, 4 $^{\circ}$ C)し、濾液は廃棄する。
- ⑪ 600 μ l の GW Buffer を Spin Column に添加した後、遠心(\geq 13K \times g, 60 秒間, 4 $^{\circ}$ C)し、濾液は廃棄する。
- ⑫ Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
- ⑬ 50 μ l の TE(pH8.0)を滴下した後、3 分間室温で静置する。
- ⑭ 遠心(\geq 13K \times g, 60 秒間, 4 $^{\circ}$ C)し、濾液を回収する。

<ダイズ DNA 抽出プロトコール> * 検査法に準拠したプロトコール

* 「組換え DNA 技術応用食品の検査方法」に準拠したプロトコールです(食安発第 0629002 号)。詳細は、厚生労働省が通知している「組換え DNA 技術応用食品の検査方法」をご確認下さい。

- ① ダイズ種子をフードミル等で均質に粉碎し、ダイズ粉末試料を調製する。
- ② ダイズ粉末試料 1.0 g を 50 ml 遠心チューブに量り採り、12 ml の GE1 Buffer および 40 μ l の RNase A をそれぞれ添加する。試料塊がないようにボルテックスミキサーにて 30 秒間攪拌する。^(注1)
- ③ 10 分間 室温で静置する。
- ④ 1.5 ml の GE2 Buffer を添加し^(注2)、10~12 回チューブを激しく転倒させ、よく混和する。
- ⑤ 10 分間 氷上に静置する。
- ⑥ 遠心($\geq 5K \times g$, 10 分間, 4°C)する。^(注3)
- ⑦ 上清 8 ml 程度を新しい 50 ml チューブに移す。^(注4)
- ⑧ ⑦で回収した上清から 700 μ l を 2.0 ml マイクロチューブに移し、残った上清は 4°C で保存する。^(注5)
- ⑨ 250 μ l の GB3 Buffer を添加する。
- ⑩ 250 μ l の イソプロパノール を添加し、10~12 回チューブを激しく転倒させ、よく混和する。^(注6)
- ⑪ ⑩で得られた混合液から 600 μ l を Spin Column に移し、遠心($\geq 13K \times g$, 30 秒間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑫ ⑩で得られた残りの混合液全量を⑪の Spin Column に移し、遠心($\geq 13K \times g$, 30 秒間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑬ Spin Column に 600 μ l の GW Buffer を添加した後、遠心($\geq 13K \times g$, 60 秒間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑭ Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
- ⑮ 50 μ l の 水 を Spin Column に滴下した後、3 分間 室温で静置する。
* 回収した DNA を定量 PCR に使用する場合は、水の代わりに TE (pH8.0) を使用する。
- ⑯ 遠心($\geq 13K \times g$, 60 秒間, 4°C)し、濾液を回収する。
- ⑰ 得られた濾液を DNA 試料原液とする。

<ダイズ DNA 抽出プロトコール> * キット標準プロトコール

- ① ダイズ種子をフードミル等で粉碎し、ダイズ粉末試料を調製する。
- ② 50 ml チューブで 1.0 g のダイズ粉末試料を秤量し、12 ml の GE1 Buffer および 40 μ l の RNase A をそれぞれ添加する。ボルテックスミキサーにて 30 秒間攪拌する。^(注1)
- ③ 10 分間室温で静置する。
- ④ 1.5 ml の GE2 Buffer を添加し^(注2)、10~12 回チューブを激しく転倒させ、よく混和する。
- ⑤ 10 分間氷冷する。
- ⑥ 遠心($\geq 5K \times g$, 10 分間, 4°C)する。^(注3)
- ⑦ 上清 8 ml 程度を新しい 50 ml チューブに移す。^(注4)
- ⑧ ⑦で回収した上清から 700 μ l を 2.0 ml マイクロチューブに移し、残った上清は 4°C で保存する。^(注5)
- ⑨ 250 μ l の GB3 Buffer を添加する。
- ⑩ 250 μ l の イソプロパノール を添加し、10~12 回チューブを激しく転倒させ、よく混和する。^(注6)
- ⑪ ⑩で得られた 600 μ l の混合液を Spin Column に移し、遠心($\geq 13K \times g$, 30 秒間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑫ ⑩で得られた残りの混合液全量を⑪の Spin Column に移し、遠心($\geq 13K \times g$, 30 秒間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑬ Spin Column に 600 μ l の GW Buffer を添加した後、遠心($\geq 13K \times g$, 60 秒間, 4°C)し、濾液は廃棄する。
- ⑭ Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
- ⑮ 50 μ l の TE (pH8.0)を滴下した後、3 分間室温で静置する。
- ⑯ 遠心($\geq 13K \times g$, 60 秒間, 4°C)し、濾液を回収する。

<100 mg ダイズ種子粉砕試料からの DNA 抽出プロトコール>

* 小スケールプロトコール

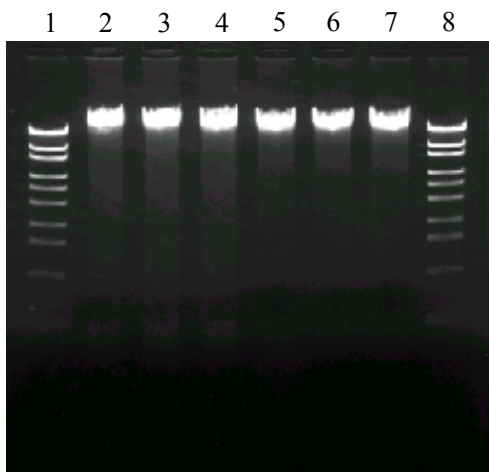
- ① ダイズ種子をフードミル等で粉砕し、ダイズ粉末試料を調製する。
- ② 2 ml チューブで 100 mg のダイズ粉末試料を秤量し、600 μ l の GE1 Buffer および 4 μ l の RNase A をそれぞれ添加する。ボルテックスミキサーにて 30 秒間攪拌する。^(注1)
- ③ 5 分間室温で静置する。
- ④ 75 μ l の GE2 Buffer を添加し^(注2)、10~12 回チューブを激しく転倒させ、よく混和する。
- ⑤ 5 分間氷冷する。
- ⑥ 遠心 ($\geq 13K \times g$, 5 分間, 4°C) する。^(注3)
- ⑦ 上清 400 μ l 程度を新しい 1.5 ml チューブに移す。^(注4)
- ⑧ 150 μ l の GB3 Buffer を添加する。
- ⑨ 150 μ l のイソプロパノールを添加し、10~12 回チューブを激しく転倒させ、よく混和する。^(注6)
- ⑩ ⑨の混合液を Spin Column に全量移し、遠心 ($\geq 13K \times g$, 30 秒間, 4°C) し、濾液は廃棄する。
- ⑪ 600 μ l の GW Buffer を Spin Column に添加した後、遠心 ($\geq 13K \times g$, 60 秒間, 4°C) し、濾液は廃棄する。
- ⑫ Spin Column を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
- ⑬ 50 μ l の TE (pH8.0) を滴下した後、3 分間室温で静置する。
- ⑭ 遠心 ($\geq 13K \times g$, 60 秒間, 4°C) し、濾液を回収する。

- (注1) 攪拌操作が不十分な場合、DNA の収量が著しく減少します。また、50 ml チューブをボルテックスミキサーへ斜めにあてた場合、泡が大量に発生し攪拌効率が低下します。ボルテックスミキサーに対して 50 ml チューブを垂直にあて、そのまま 30 秒間、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) ②の操作で発生した泡がチューブ内に残っていても、続けて GE2 Buffer を加えて下さい。②の混合液の粘度が高くなっているため、添加した GE2 Buffer が十分に混ざるように転倒混和して下さい。
- (注3) 使用する冷却遠心機のローターの最高回転数および 50 ml チューブの最大耐 g を確認して下さい。50 ml チューブの最大耐 g で遠心操作を行う場合は、事故防止のためにコンニカル型遠沈管対応のローターまたは、コンニカル型遠沈管用アダプターを使用し、予備検討によりチューブの破損が生じないことを確認して下さい。
- (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) DNA が大量に必要な場合、24 時間以内であれば⑦で回収した上清から再度⑧以降の抽出手順を行うことによって、さらに DNA を回収することができます。ただし、4℃ 保存した上清は、白色の沈殿物が析出する場合があります。その場合は、室温でボルテックスミキサーにて攪拌し、十分に溶かしてから抽出操作を行って下さい。
- (注6) GB3 Buffer、続けてエタノール(ダイズからの DNA 抽出の場合はイソプロパノール)の順で添加した後に攪拌操作を行って下さい。その際に析出物が生じて白濁している場合には、液が透明になるまで十分に転倒混和して下さい。

VI データ集

1. トウモロコシおよびダイズ種子からの DNA 抽出

本キットを用いてトウモロコシおよびダイズの種子から DNA 抽出を行った。いずれの種子からも DNA を抽出することができた。



Lane 1, 8 : OneSTEP Marker 6 (λ / *Sty* I digest)

Lane 2~4 : トウモロコシ genomic DNA

Lane 5~7 : ダイズ genomic DNA

*本キットで抽出した DNA の 1 / 25 量を 1% Agarose S で電気泳動した。

2. トウモロコシおよびダイズ種子から抽出した 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 は高純度であることが示唆された。

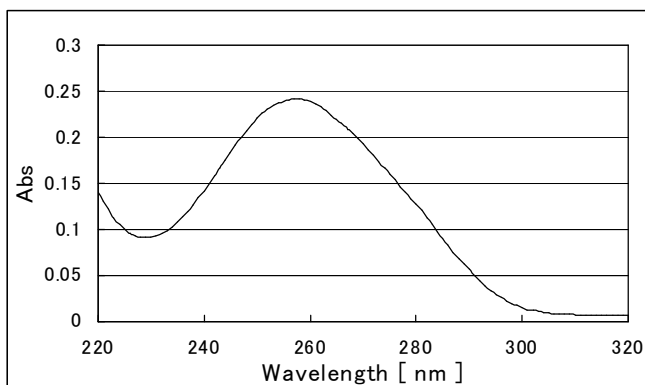


図 1. 本キットでトウモロコシ種子から抽出した DNA の吸収スペクトル

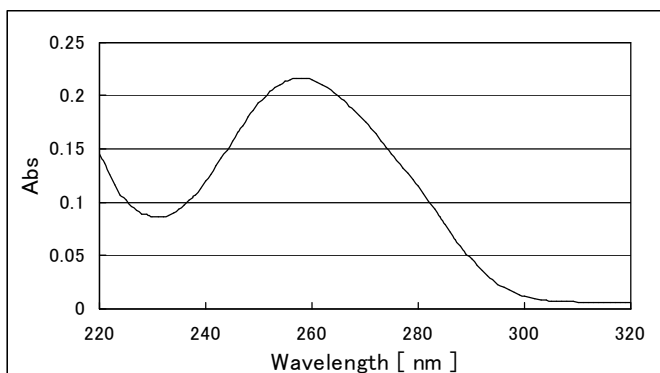
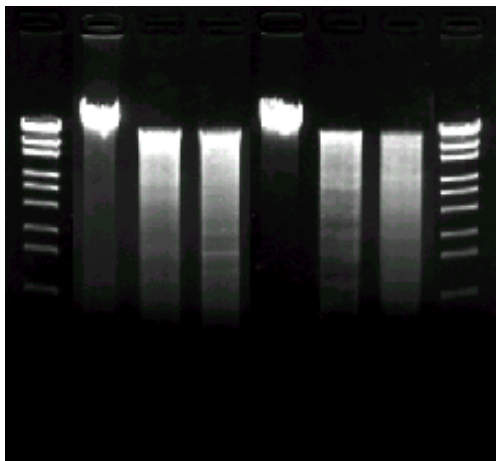


図 2. 本キットでダイズ種子から抽出した DNA の吸収スペクトル

3. トウモロコシおよびダイズ種子から抽出した DNA の制限酵素消化

本キットで抽出した DNA を制限酵素 *EcoR* I および *Hind*III で消化した。

1 2 3 4 5 6 7 8

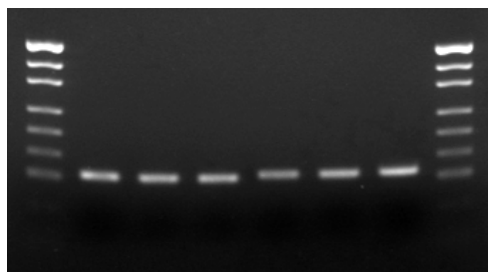


Lane 1, 8 : OneSTEP Marker6 (λ / *Sty* I digest)
Lane 2 : トウモロコシ genomic DNA intact
Lane 3 : トウモロコシ genomic DNA digest / *EcoR* I
Lane 4 : トウモロコシ genomic DNA digest / *Hind*III
Lane 5 : ダイズ genomic DNA intact
Lane 6 : ダイズ genomic DNA / *EcoR* I
Lane 7 : ダイズ genomic DNA / *Hind*III

4. PCR による内在性遺伝子の検出

トウモロコシおよびダイズの内在性遺伝子検出用プライマーを用いて、本キットで抽出した DNA の PCR を行った。PCR 条件は、農林水産省「組換え食品検査・分析マニュアル」に従った。

1 2 3 4 5 6 7 8



Lane 1, 8 : OneSTEP Marker 11(pUC19/*Msp* I digest)
Lane 2~4 : トウモロコシ genomic DNA を鋳型に
SSI1b 遺伝子を増幅 (114 bp)
Lane 5~7 : ダイズ genomic DNA を鋳型に
Le1 遺伝子を増幅 (118 bp)

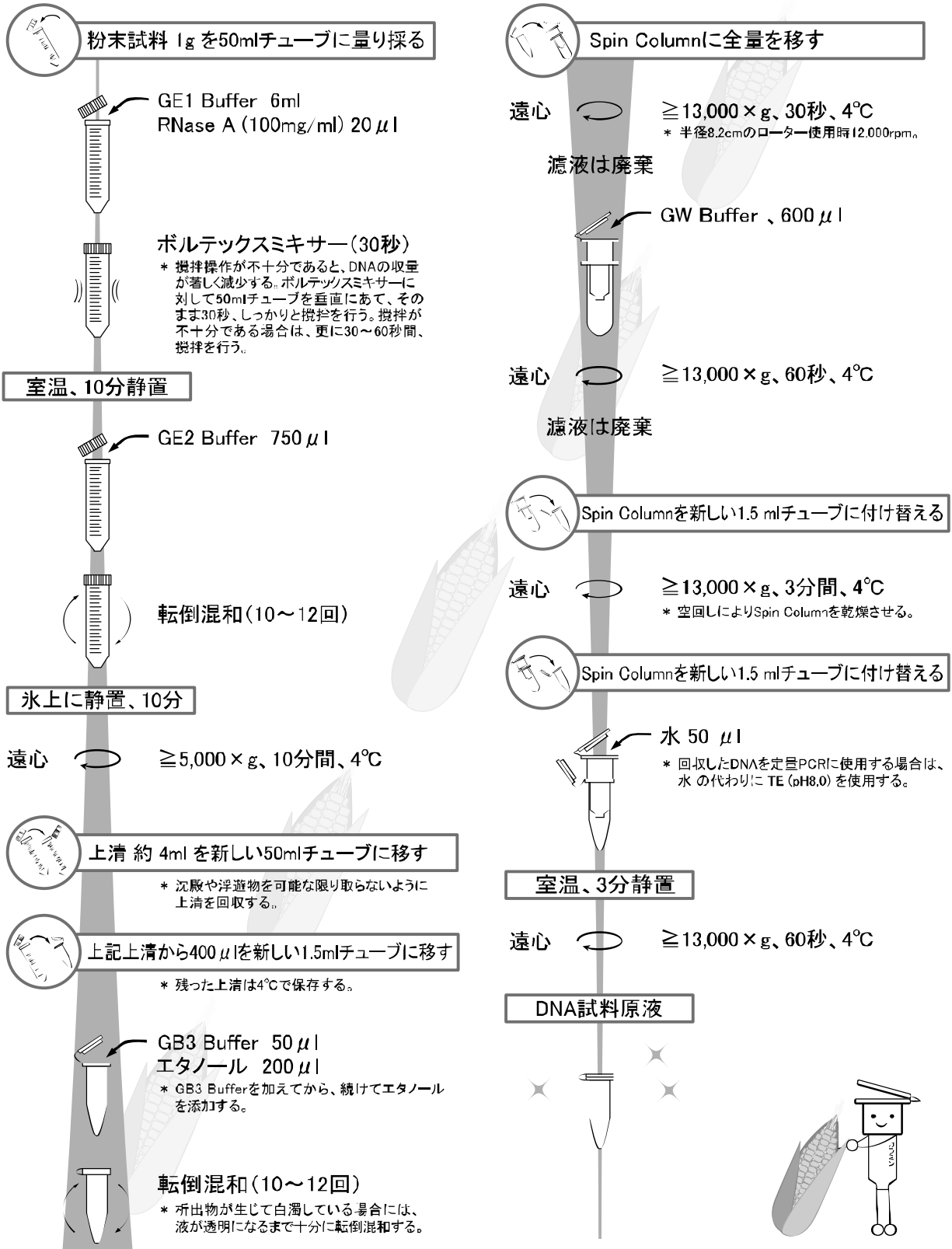
* PCR 産物の一部(5 μ l)を 3% Agarose 21 ゲルで電気泳動。

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。	試料の粉碎が不十分。	出来るだけ細かく試料を粉碎して下さい。 また、粉碎試料の粒径が均一であることが望ましいので、必要に応じて「ふるい」等で粒径を揃えて下さい。
	抽出効率が低下している。	GE1 Buffer および RNase A を添加後、よくボルテックスして下さい。特にダイズの場合では、ダマが生じ、抽出液が試料粉末表面に接触出来ない場合があります。
		50 ml チューブを斜めにボルテックスにあてた場合、泡が大量に出て攪拌効率が下がりますので、チューブをボルテックスに垂直にあてよく攪拌を行って下さい。
	溶出が不十分。	TE(pH8.0)を Spin Column へ添加した後、直ぐに遠心溶出を行った場合、DNA 収量にばらつきが生じます。一定の DNA 収量を得るため、室温で数分間静置した後、溶出を行って下さい。
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。
GB3 Buffer を添加後に現れた白色沈殿がインプロパノールおよびエタノール添加後も多量に残存する。	氷冷が不十分。	冷却効率を上げるため、氷と 50 ml チューブの接触面積を大きくして下さい。 また、ダイズの場合は、GE2 Buffer を添加後、粘性が生じるため十分攪拌を行って下さい。 (参考:トウモロコシおよびダイズ以外の試料では、白沈が残る場合があります。この場合、GE2 Buffer を添加後に十分攪拌を行い、遠心分離を行った後、その上清を Spin Column へ移して下さい。)
OD _{260/280} 値が低い。	遠心分離後の沈殿物もしくは浮遊物を Spin Column に持ち込んでいる。	トウモロコシの場合は、50 ml チューブでの遠心分離後、液面に油膜が現れる場合があります。油膜状の物質は、1 ml チップを液面に対し垂直に挿し、ゆっくり持ち上げる事でチップの先に吸着し除去することができます。 また、上清を回収する際は、沈殿をチップ先で挿さないように注意しながら行って下さい。

VIII 関連製品

Code No.	製品名	包装単位	希望納入価格
310-06591	<i>GM quicker 2</i>	50 回用	43,000 円
311-07241	<i>GM quicker 3</i>	50 回用	54,000 円
319-07161	<i>GM quicker 96</i>	96 ウェルプレート×4	120,000 円
317-07341	On-Site Column Set for <i>GM quicker</i>	20 回用	35,000 円
314-06371	GE1 Buffer	500 ml	12,000 円
311-06381	GE2 Buffer	200 ml	8,000 円
318-06391	RNase A (100 mg/ml)	0.5 ml×5	19,600 円
311-06641	GW Buffer	40 ml×2	8,000 円
318-06651	GE2-K Buffer	100 ml	8,000 円
315-06661	GB3 Buffer	12.5 ml×2	8,000 円
312-06671	<i>GM quicker 2</i> Enzyme Set (Proteinase K 2 ml, α -Amylase 0.2 ml)	1 Set	20,000 円
316-90025	TE (pH8.0)	500 ml	9,000 円
318-90105	Distilled Water, Deionized, Sterile	500 ml	9,000 円
312-01193	Agarose S	100 g	13,200 円
313-03242	Agarose 21	25 g	17,200 円
312-06512	Agarose XP	25 g	15,200 円
310-06513	Agarose XP	100 g	37,600 円
311-02682	Agarose X	25 g	20,400 円
311-05281	OneSTEP Marker 6	1,500 μ l	9,000 円
318-05791	OneSTEP Marker 4	375 μ l	9,000 円
312-05831	OneSTEP Marker 11	375 μ l	9,000 円

トウモロコシDNA抽出プロトコール ~ 検査法に準拠した
プロトコール ~

トウモロコシDNA抽出プロトコール ~ キット標準プロトコール ~

 50mlチューブに粉末試料1g入れる

GE1 Buffer 6ml
RNase A (100mg/ml) 20 μ l



ボルテックスミキサー (30秒)
* 攪拌操作が不十分であると、DNAの収量が著しく減少する。ボルテックスミキサーに対して50mlチューブを垂直にあて、そのまま30秒、しっかりと攪拌を行う。攪拌が不十分である場合は、更に30~60秒間、攪拌を行う。

室温、10分静置


GE2 Buffer 750 μ l




転倒混和 (10~12回)

氷冷、10分静置


遠心  $\geq 5,000 \times g$ 、10分間、4 $^{\circ}$ C

 上清 約 4ml を新しい50mlチューブに移す
* 沈殿や浮遊物を可能な限り取らないように上清を回収する。

 上記上清から400 μ lを新しい1.5mlチューブに移す
* 残った上清は4 $^{\circ}$ Cで保存する。

GB3 Buffer 50 μ l
エタノール 200 μ l
* GB3 Bufferを加えてから、続けてエタノールを添加する。

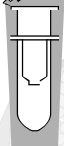
転倒混和 (10~12回)
* 析出物が生じて白濁している場合には、液が透明になるまで1分に転倒混和する。


 Spin Columnに全量に移す

遠心  $\geq 13,000 \times g$ 、30秒、4 $^{\circ}$ C
* 半径8.2cmのローター使用時12,000rpm。


濾液は廃棄

GW Buffer、600 μ l

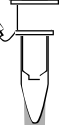


遠心  $\geq 13,000 \times g$ 、60秒、4 $^{\circ}$ C


濾液は廃棄

 Spin Columnを新しい1.5 mlチューブに付け替える

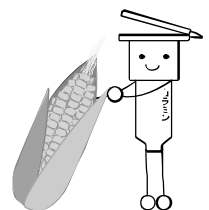
TE 50 μ l



室温、3分静置

遠心  $\geq 13,000 \times g$ 、60秒、4 $^{\circ}$ C

DNA溶液 50 μ l



トウモロコシDNA抽出プロトコール ~ 小スケールプロトコール ~

 2mlチューブに粉末試料100mg入れる

GE1 Buffer 600 μ l
RNase A (100mg/ml) 4 μ l

ボルテックスミキサー(30秒)
* 撹拌操作が不十分であると、DNAの収量が著しく減少する。ボルテックスミキサーに対して2mlチューブを垂直にあて、そのまま30秒、しっかりと撹拌を行う。撹拌が不十分である場合は、更に30~60秒間、撹拌を行う。

室温、5分静置

GE2 Buffer 75 μ l

転倒混和(10~12回)

氷冷、5分静置

遠心  $\geq 13,000 \times g$ 、5分間、4°C
* 半径8.2cmのローター使用時12,000rpm。


 上清400 μ lを新しい1.5mlチューブに移す

* 沈殿や浮遊物を可能な限り取らないように上清を回収する。

GB3 Buffer 50 μ l
エタノール 200 μ l
* GB3 Bufferを加えてから、続けてエタノールを添加する。


転倒混和(10~12回)
* 析出物が生じて白濁している場合には、液が透明になるまで十分に転倒混和する。

 Spin Columnに全量を移す


遠心  $\geq 13,000 \times g$ 、30秒、4°C

濾液は廃棄

GW Buffer、600 μ l


遠心  $\geq 13,000 \times g$ 、60秒、4°C

濾液は廃棄

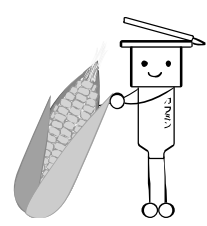
 Spin Columnを新しい1.5mlチューブに付け替える

TE 50 μ l


室温、3分静置

遠心  $\geq 13,000 \times g$ 、60秒、4°C

DNA溶液 50 μ l



ダイズDNA抽出プロトコール ~ 検査法に準拠したプロトコール ~

 粉末試料 1g を50mlチューブに量り採る

GE1 Buffer 12ml
RNase A (100mg/ml) 40 μl



ボルテックスミキサー(30秒)

* 撹拌操作が不十分であると、DNAの収量が著しく減少する。ボルテックスミキサーに対して50mlチューブを垂直にあて、そのまま30秒、しっかりと撹拌を行う。撹拌が不十分である場合は、更に30~60秒間、撹拌を行う。

室温、10分静置


GE2 Buffer 1.5ml




転倒混和(10~12回)

氷冷、10分静置

遠心  $\geq 5,000 \times g$ 、10分間、4°C

 上清 約 8ml を新しい50mlチューブに移す

* 沈殿や浮遊物を可能な限り取らないように上清を回収する。

 上記上清から700 μlを新しい2mlチューブに移す

* 残った上清は4°Cで保存する。


GB3 Buffer 250 μl
イソプロパノール 250 μl



* GB3 Bufferを加えてから、続けてイソプロパノールを添加する。

転倒混和(10~12回)


* 析出物が生じて白濁している場合には、液が透明になるまで十分に転倒混和する。

 混合液 600 μl をSpin Columnに移す

遠心  $\geq 13,000 \times g$ 、30秒、4°C
* 半径8.2cmのローター使用時12,000rpm。

濾液は廃棄

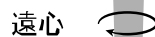
 残りの混合液を全量Spin Columnに移す

遠心  $\geq 13,000 \times g$ 、30秒、4°C


濾液は廃棄

GW Buffer、600 μl



遠心  $\geq 13,000 \times g$ 、60秒、4°C

濾液は廃棄

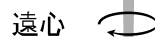
 Spin Columnを新しい1.5 mlチューブに付け替える

水 50 μl

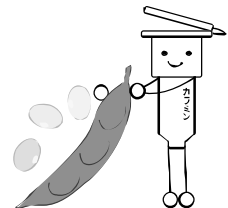


* 回収したDNAを定量PCRに使用する場合は、水の代わりにTE (pH8.0)を使用する。

室温、3分静置

遠心  $\geq 13,000 \times g$ 、60秒、4°C

DNA試料原液



ダイズDNA抽出プロトコール ~ キット標準プロトコール ~

50mlチューブに粉末試料1g入れる

GE1 Buffer 12ml
RNase A (100mg/ml) 40 μ l



ボルテックスミキサー(30秒)
* 撹拌操作が不十分であると、DNAの収量が著しく減少する。ボルテックスミキサーに対して50mlチューブを垂直にあて、そのまま30秒、しっかりと撹拌を行う。撹拌が不十分である場合は、更に30~60秒間、撹拌を行う。

室温、10分静置

GE2 Buffer 1.5ml



転倒混和(10~12回)

氷冷、10分静置

遠心 $\geq 5,000 \times g$ 、10分間、4°C

上清 約 8ml を新しい50mlチューブに移す
* 沈殿や浮遊物を可能な限り取らないように上清を回収する。

上記上清から700 μ l を新しい2mlチューブに移す
* 残った上清は4°Cで保存する。

GB3 Buffer 250 μ l
イソプロパノール 250 μ l



転倒混和(10~12回)
* 析出物が生じて白濁している場合には、液が透明になるまで一分に転倒混和する。

混合液 600 μ l をSpin Columnに移す

遠心 $\geq 13,000 \times g$ 、30秒、4°C
* 半径8.2cmのローター使用時12,000rpm。

濾液は廃棄

残りの混合液を全量Spin Columnに移す

遠心 $\geq 13,000 \times g$ 、30秒、4°C

濾液は廃棄

GW Buffer、600 μ l



遠心 $\geq 13,000 \times g$ 、60秒、4°C

濾液は廃棄

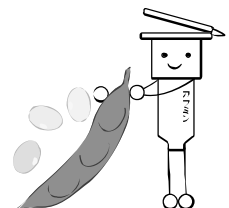
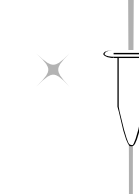
Spin Columnを新しい1.5 mlチューブに付け替える

TE 50 μ l

室温、3分静置

遠心 $\geq 13,000 \times g$ 、60秒、4°C

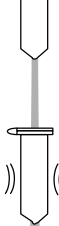
DNA溶液 50 μ l



ダイズDNA抽出プロトコール ~ 小スケールプロトコール ~

 2mlチューブに粉末試料100mg入れる

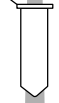
GE1 Buffer 600 μ l
RNase A (100mg/ml) 4 μ l



ボルテックスミキサー(30秒)
* 攪拌操作が不十分であると、DNAの収量が著しく減少する。ボルテックスミキサーに対して2mlチューブを垂直にあて、そのまま30秒、しっかりと攪拌を行う。攪拌が不十分である場合は、更に30~60秒間、攪拌を行う。

室温、5分静置


GE2 Buffer 75 μ l



転倒混和(10~12回)

氷冷、5分静置


遠心 $\geq 13,000 \times g$ 、5分間、4 $^{\circ}$ C
* 半径9.2cmのローター使用時12,000rpm。

 上清400 μ lを新しい1.5mlチューブに移す
* 沈殿や浮遊物を可能な限り取らないように上清を回収する。

GB3 Buffer 150 μ l
イソプロパノール 150 μ l
* GB3 Bufferを加えてから、続けてイソプロパノールを添加する。

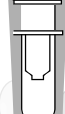


転倒混和(10~12回)
* 析出物が生じて白濁している場合には、液が透明になるまで十分に転倒混和する。


 Spin Columnに全量を移す

遠心 $\geq 13,000 \times g$ 、30秒、4 $^{\circ}$ C
濾液は廃棄

GW Buffer、600 μ l



遠心 $\geq 13,000 \times g$ 、60秒、4 $^{\circ}$ C
濾液は廃棄

 Spin Columnを新しい1.5 mlチューブに付け替える

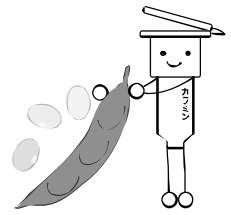
TE 50 μ l



室温、3分静置

遠心 $\geq 13,000 \times g$ 、60秒、4 $^{\circ}$ C

DNA溶液 50 μ l

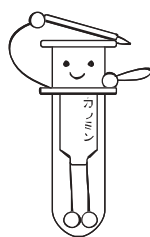


< メモ欄 >

< メモ欄 >



ニッポン・ジーン



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

〒930-0834 富山県富山市問屋町1-8-7
T E L : 076 (451) 6548
F A X : 076 (451) 6547
E-mail : info@nippongene.com
U R L : <http://www.nippongene.com/>

- ・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。