

食品・環境分析用

---

**Takara**

**コメ DNA 抽出キット**  
**(精米 20 粒スケール)**  
(コメ判別用 PCR Kit 用)

---

説明書

---

本キットは未加熱の精米 20 粒から DNA の調製を行う際に使用します。最終的に回収された DNA 溶液は、直接 PCR 反応に利用することができます。

本キットを用いた DNA 調製には、劇物であるフェノールやクロロホルムは使用しません。

## I. 内容 (50 回分)

1. Lysis Buffer A	18 ml
2. Lysis Buffer B	7.5 ml
3. Precipitation Buffer	8.5 ml
4. DNA Binding Buffer	50 ml
5. Wash Buffer A	7.5 ml × 2
6. Wash Buffer B	9 ml × 2
7. Elution Buffer	20 ml
8. Miniprep Spin Column	50 個

## II. 保存

常温 (25℃付近が望ましい)

遮光のため、各試薬はキット箱内にて保存してください。

※ 適切に保存し、受取り後 2 年を目途にご使用ください。

## III. キット以外に必要な試薬、機器

- Proteinase K (製品コード 9034)
- RNase A (100 mg/ml に調製して使用) (製品コード 740505 など)
- 滅菌 Milli Q 水
- エタノール (99.5%以上)
- 2-プロパノール
- 55℃および 65℃に設定可能なインキュベーター
- 遠心分離機 (4℃冷却機能つき、各種チューブに対応したもの)
- セイフロック 2 ml チューブ (エッペンドルフ Code. 0030 120.094 など)
- キャップレス 2 ml チューブ (フナコシ Code. MCT-200NC など)
- 1.5 ml チューブ (エッペンドルフ Code. 0030 125.150 など)
- 各種マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ

※ 各種チューブはオートクレーブ滅菌したものをご使用ください。

※ マイクロピペット用チップは、クロスコンタミネーション防止用のフィルター付滅菌済チップをお勧めします。

---

## IV. 使用上の注意

本キットを使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

- ・本製品は食品および環境分析用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないでください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・Lysis Buffer B、DNA Binding Buffer、Wash Buffer Aは低温になると沈殿を生じることがありますので、常温（25℃付近）での保存をお勧めします。沈殿が生じた場合は、40℃程度で加温し沈殿を完全に溶解した後、使用してください。なお、Lysis Buffer Bは攪拌しながら溶解してください。放置状態で加温すると沈殿の溶解が困難になります。
- ・DNA Binding Buffer、Wash Buffer A、1st Wash Buffer（Wash Buffer Aに2-プロパノールを添加して調製）は刺激性がありますので手袋などを着用し、安全に取り扱ってください。また次亜塩素酸などの漂白剤と混ぜないでください。
- ・試薬の分注を行う時は、必ず滅菌した新しいディスプレイサブルチップおよびピペットを用い、試薬のコンタミネーションを防止してください。
- ・米品種や検体状態（精米度合いなど）によって、DNAの収量は異なります。
- ・検体の状態によっては、回収したDNA溶液がPCR阻害物質などを含み、PCRが進行しない場合があります。

## V. 使用方法

### 【試薬の調製】

使用直前に以下の溶液を調製してください。

#### 1. 1st Wash Buffer

Wash Buffer Aのボトル1本につき2-プロパノールを7.5 ml加え、よく混合し調製してください。

添加後は、溶液成分が揮発しないように蓋を十分に締め、20～25℃にて保存してください。

#### 2. 2nd Wash Buffer

Wash Buffer Bのボトル1本につきエタノール（99.5%以上）を21 ml加え、よく混合し調製してください。

添加後は、溶液成分が揮発しないように蓋を十分に締め、20～25℃にて保存してください。

### 【DNA調製プロトコール】

1. 精米20粒をセイフロック2mlチューブに採り、540  $\mu$ lの滅菌MilliQ水を添加する。  
※米粒間に気泡が残らず、各米粒が水に充分浸るように注意してください。
2. 室温で一晩放置する。（25℃付近が好ましい）
3. Lysis Buffer Aを300  $\mu$ l添加する。
4. 塊がなくなるまで、細かく米粒を粉碎する。粉碎懸濁液がチューブの外に飛び散らないように注意する。  
[例] 1 ml容量のチップをチューブ底壁に押し付けることにより先を折り曲げ、そのチップの先で粉碎する。
5. Lysis Buffer Bを120  $\mu$ l添加する。
6. Proteinase K（製品コード9034）を50  $\mu$ l添加（Proteinase Kを量り取ったチップの先を米粉砕物のところまで到達させてから押し出す）し、Proteinase Kを添加したチップにて十分に混合後、55℃で加温する。  
※検体ごとに、Proteinase Kを添加するチップを交換し、混合時は出来るだけ泡立てないように気をつけてください。

7. 55℃にて1時間放置する。その間、約10分後、約20分後、約40分後に転倒混和により十分に懸濁する。  
※ Vortexは行わないでください。できるだけ泡立てないように気をつけてください。
8. 4℃、 $11,200 \times g^{*1}$ にて5分間、遠心分離操作を行う。
9. あらかじめPrecipitation Bufferを147  $\mu$ l分注しておいた1.5 mlチューブに上清470  $\mu$ lを加え、転倒混和後、直ちに氷中保存する。(この段階で白濁する。)  
※ 上清を移す際、液表層の浮遊物がチップ周りに付着しますので、これを新しいチューブに出来るだけ移さないよう注意してください。
10. 氷中で10分間放置する。途中で1度転倒混和し、遠心機にかける前に再度、転倒混和する。チューブ底を上にした際タッピングにてチューブ底近辺の液も完全に混合する。
11. 4℃、 $11,200 \times g^{*1}$ にて10分間、遠心分離操作を行う。
12. あらかじめ100 mg/ml RNase Aを1  $\mu$ l分注しておいた1.5 mlチューブに、上清150  $\mu$ lを移す。
13. タッピングにて軽く混合後、55℃で5分間放置する。
14. 13の溶液にDNA Binding Bufferを855  $\mu$ l添加し、チップにて混合する。
15. キャップレス2 mlチューブにセットしたMiniprep Spin Columnに14の溶液を先ず約500  $\mu$ l添加する。
16. 室温、 $10,000 \times g^{*1}$ にて1分間、遠心分離操作を行う。
17. 濾液を除去した後、14の残りの液をMiniprep Spin Columnに添加する。
18. 室温、 $10,000 \times g^{*1}$ にて1分間、遠心分離操作を行う。
19. Miniprep Spin Columnを新しいキャップレス2 mlチューブに移した後、1st Wash Bufferを500  $\mu$ l添加する。
20. 室温、 $10,000 \times g^{*1}$ にて1分間、遠心分離操作を行う。
21. 濾液を除去した後、600  $\mu$ lの2nd Wash BufferをMiniprep Spin Columnに添加する。
22. 室温、 $10,000 \times g^{*1}$ にて1分間、遠心分離操作を行う。
23. 濾液を除去した後、400  $\mu$ lの2nd Wash BufferをMiniprep Spin Columnに添加する。
24. 室温、 $12,700 \times g^{*1}$ にて3分間、遠心分離操作を行う。
25. Miniprep Spin Columnを新しい1.5 mlチューブに移す。
26. 65℃に温めたElution Bufferを50  $\mu$ l添加し、室温で5分間放置する。(1.5 mlチューブの蓋は開けておく)
27. 1.5 mlチューブの蓋を開けた状態で、室温、 $7,000 \times g^{*1}$ にて1分間、遠心分離操作を行う。
28. Miniprep Spin Columnを除去し、回収液を軽くvortexにて均一にする。以後、4℃にて保存する。
29. 10倍希釈液を調製し、OD<sub>260</sub>およびOD<sub>320</sub><sup>\*2</sup>を測定する。希釈液には、TE<sup>\*3</sup>を滅菌水にて10倍希釈した1/10 TEを用いる。
30. (OD<sub>260</sub> - OD<sub>320</sub>)の値より、 $1 \text{ (OD}_{260} - \text{OD}_{320}) = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ としてDNA量を算出する。  
[計算例] 10倍希釈液の測定値がOD<sub>260</sub> = 0.0524、OD<sub>320</sub> = 0.0092の場合、  
DNAサンプル(原液)の濃度 =  $(0.0524 - 0.0092) \times 50 \text{ (ng}/\mu\text{l}) \times 10$   
= 21.6 (ng/ $\mu$ l)

\* 1：遠心力について

ロータ最小径での値です。TOMY精工社製ローター TMA-24の場合、各遠心力はおおよそ下記の回転数で得られます。

$7,000 \times g \rightarrow 10,700 \text{ rpm}$ 、 $10,000 \times g \rightarrow 12,800 \text{ rpm}$   
 $11,200 \times g \rightarrow 13,500 \text{ rpm}$ 、 $12,700 \times g \rightarrow 14,400 \text{ rpm}$

\* 2：吸光度値について

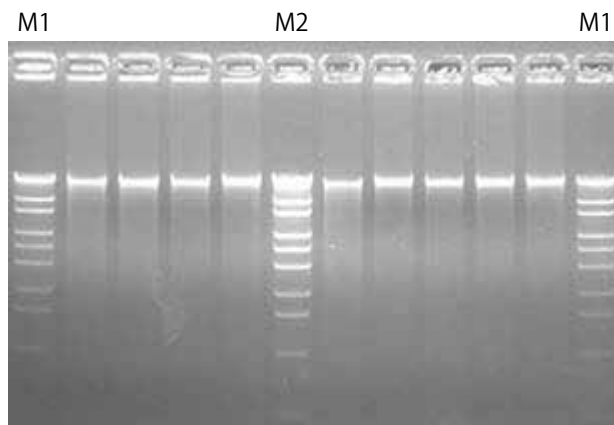
本キットで精米から調製したDNA溶液の10倍希釈液の場合、OD<sub>260</sub>は通常0.1未満の値を示します。小数点第3位まで表示可能な吸光度測定計の使用をお勧めします。また、OD<sub>320</sub>も必ず測定してください。

\* 3：TE      10 mM    Tris-HCl, pH8.0  
              1 mM      EDTA, pH8.0

## VI. DNA 調製結果例

本キットにより調製した DNA 溶液をアガロースゲル電気泳動に供した例です。  
1 ウェルあたり吸光度換算値で 200 ng 相当の DNA 溶液を泳動しました。

### 【抽出結果例】



M1 :  $\lambda$ -*Eco*T14 I digest DNA (100 ng/Lane)  
M2 :  $\lambda$ -*Eco*T14 I digest DNA (200 ng/Lane)  
1% Agarose L03 にて泳動

## VII. 備考

本キットを用いて調製した DNA 溶液を、弊社のコメ判別用 PCR キットに使用する場合は、以下をご参照ください。

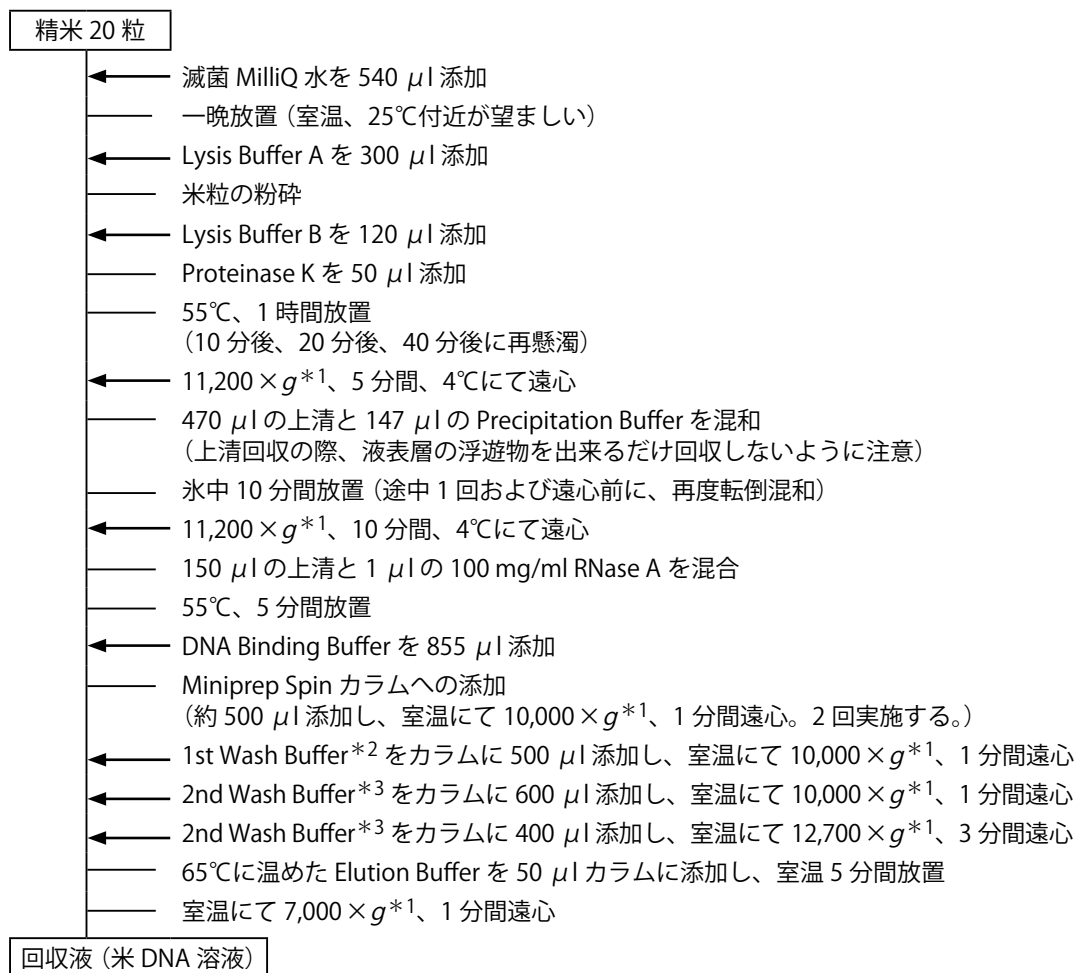
### 【コメ判別用 PCR Kit I (製品コード RR211A)】

1 反応あたり、吸光度換算値で 10 ng 相当の DNA 溶液を鋳型 DNA として用いてください。また、電気泳動には、Loading Buffer 添加後の PCR 反応液 5  $\mu$ l を 1 ウェルあたりに用いてください。

### 【コメ判別用 PCR Kit II (製品コード RR213A)】

1 反応あたり、吸光度換算値で 10 ng 相当の DNA 溶液を鋳型 DNA として用いてください。また、電気泳動には、Loading Buffer 添加後の PCR 反応液 10  $\mu$ l を 1 ウェルあたりに用いてください。

<操作フローチャート>



\* 1 : 遠心力はロータ最小径での値です。

\* 2 : 1st Wash Buffer

Wash Buffer A のボトル 1 本につき 2- プロパノールを 7.5 ml 添加、十分に混合して調製してください。

添加後は、溶液成分が揮発しないように蓋を十分に締め、20 ~ 25°C にて保存してください。

\* 3 : 2nd Wash Buffer

Wash Buffer B のボトル 1 本につき エタノール (99.5%以上) を 21 ml 添加、十分に混合して調製してください。

添加後は、溶液成分が揮発しないように蓋を十分に締め、20 ~ 25°C にて保存してください。

## VIII. 関連製品

Proteinase K (製品コード 9034)

コメ DNA 抽出キット (製品コード 9197) (精米、玄米 1 粒スケール)

## IX. 注意

- ・本製品は食品分析および環境分析用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**テクニカルサポートライン**

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

---

**タカラバイオ株式会社**