

酒類におけるとうもろこし由来 DNA の残存分析に関する研究

1 研究の目的

とうもろこしを原料として使用した蒸留酒及び醸造酒に、とうもろこし由来の DNA が残存するかどうかを明らかにするため、分析方法を検討した上で、分析を実施する。蒸留酒と醸造酒ではその製法が大きく異なることから、それぞれに適用が妥当と考えられる手法で残存 DNA の評価を行った。

2 蒸留酒に関する研究（過去の研究成果）

(1) 概要

蒸留による精製は原理上、蒸留時の圧力下における各成分の蒸気圧の違いによって成分を分離する。したがって、揮発性を有する成分のほとんどが水及びエタノールからなり、これらと大きく物性の異なる（揮発性）化合物を多量に含有することが考えにくい発酵生成物については、その蒸留工程における挙動は発酵生成物の原料に左右されず、一定であると考えられる。

また、蒸留産物の精製度の高さは蒸留の回数によるが、精製度の低い蒸留液で DNA が検出されない場合、精製度の高い蒸留液（例えば、連続式蒸留（精密蒸留）によるもの）でも当然に DNA は未検出になると考えられる。

(2) 過去の研究成果

蒸留精製前後における DNA の移行に関する先行研究として、藤井ら（2005）の「工業用発酵エタノール中の DNA およびタンパク質の分析」（化学と生物，43，272-275.）がある。当該論文では、人為的に DNA 又はタンパク質を添加したアルコール溶液を蒸留し、DNA 又はタンパク質の蒸留液への移行を検討しており、蒸留液の光学的定量法による分析の結果、DNA、タンパク質いずれも未検出となっている。また、遺伝子組換えトウモロコシを原料とした発酵・単式蒸留試験も実施しており、蒸留液に含まれる DNA を PCR 法により分析した結果、DNA は検出されないことも報告している。

また、当所において別のアプローチによる検討も実施している。奥田ら（2014）の「焼酎製造におけるセシウム等の無機元素の挙動」（醸協，109，808-812.）では当所で試験製造した焼酎において、DNA の構成成分であるリンが検出されないことを報告している。

(3) 考察

以上の研究成果から、DNA は蒸留液に移行しないと判断できる。

3 醸造酒に関する研究

(日本食品化学学会第 24 回総会・学術大会 (平成 30 年 5 月 17 日～18 日) 発表)

(1) 研究概要

とうもろこしを原料として用いる醸造酒としてビール及び発泡酒、リキュール(発泡性) ①、その他の醸造酒①などビール風味を有するもの(以下、「ビール系酒類」という。)を対象として、原料とうもろこし由来の DNA が製品中に残存するか否かを検討した。残存の有無を検討するための対象として、これまで多くの研究で実績のあるとうもろこし内在性遺伝子 *SSI1b* を選択し、当該遺伝子の検出の有無をもって残存しているかどうか判断した。

残存の有無の検討では、DNA の抽出及び精製が極めて重要なステップであるため、他の食品において広く用いられる公知の方法に基づき検討を実施することとしたが、酒類に関して適用可能か否かについての知見が乏しかったため、他食品で用いられる各種公定法の酒類に対する適用可否を検討し、もっとも酒類で検出感度の高い方法を推定した。したがって、本研究は、以下の 2 段階の試験によって構成される。

- ① 食品の公定法の内、酒類の分析に準用した際に最も高感度な方法の決定
- ② 第一段階で決定した方法を用いて、市販ビール系酒類から原料とうもろこし由来の DNA が検出されるか否かの検討

なお、本研究の試験方法は、公定法としては 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(第 3 版)」(以下、「JAS 法」という。)及び消食表第 201 号「安全性審査済みの組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」(以下、「消費者庁法」という。)の別添資料に基づいて作成しているが、いずれもとうもろこし加工品に関しては液体試料の分析方法が明記されていないため、試料の凍結乾燥物を抽出に供することとした。また、公定法以外では、酒類中の DNA の検出実績のある大坪らが報告した手法(以下、「酵素・70%EtOH 法」という。)についても併せて検討を実施した。

(2) 材料と方法

① 実験に使用する器具、試薬

ディスポーザブル製品以外で試料に触れるすべての器具、実験台などは DNA 除去試薬(TakaraBio, DNA-OFF (Code:9036))により処理した。また、試薬については特に記載のないものは和光純薬工業株式会社製の試薬特級グレードのものを用いた。

② 陽性コントロール及び陰性コントロール

陰性コントロールとして、とうもろこしを使用していないビールを用いた。陽性コントロールとして、DNA が比較的長鎖で残存した場合を想定し、American Oil Chemists' Society (AOCS) から購入した T-25 系統由来 genome DNA を本ビールで段階的に希釈した試料と、DNA が比較的断片化が進んだ状態で残存した場合を想定し、T-25 系統由来 genome DNA を鋳型として *SSI1b* 1-5'/*SSI1b* 1-3' で増幅した 151 bp の増幅産物(以下、「*SSI1b* 増幅断片」という。)を本ビールで段階的に希釈した試料を調製した。なお、T-25 系統のゲノムサイズは、2,300 Mbp として、含有コピー数などを計算した。

③ 試料の前処理

実験に使用したビール系酒類はすべて凍結乾燥したものを用いた。試料は、まず初め

に滅菌済み個別包装 500 mL 容アイボーイ（アズワン、5-002-34）に 200 mL 程度入れ、吸引鐘で泡が溢れないよう注意深く圧力を調整しつつ減圧し、十分に泡抜きを実施した。その後、 -30°C の冷凍庫に斜めにした状態で置き、適宜回転させながら表面積を大きくなるように凍らせ、凍結乾燥機（Labconco 社製）で凍結乾燥を実施した。得られた凍結乾燥物は、藁さじで粉碎混合し、均一化した。

④ DNA の抽出及び精製

酒類へ準用可能な方法について、以下の 5 つの方法を検討した。各手法の詳細な実験手順は、別紙の 1~5 に示す。

(a) CTAB 法（JAS 法）

(b) DNeasy plant maxi kit 法（Qiagen 社製，JAS 法）

(c) Genomic-tip20/G 法（Qiagen 社製，JAS 法）

(d) GM quicker 法（NIPPON gene 製，消費者庁法）

(e) 酵素・70%エタノール抽出法（酵素・70%EtOH 法）

（市販ビール系酒類の検討には、DNeasy plant maxi kit 法を用いた。）

⑤ DNA の検出

DNA の検出方法は、消費者庁法及び FAMIC 調査研究報告 3703 「トウモロコシ加工品の新規 DNA 抽出法の検討」に準じて、内在性遺伝子 *SSIIB* を対象とした PCR 法を用いた定性的判断を試みた。なお、PCR による増幅を行うため、コンタミネーション防止の観点から、試薬はウラシル-DNA-グリコシラーゼによる前処理を含む TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG plus (TakaraBio) を用いて行った。PCR の反応液組成は、総量 25 μL の系で、それぞれ終濃度 $1\times$ PCR buffer for UNG plus, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM dCTP, 0.6 mM dUTP, 0.5 μM Forward primer (*SSIIB* 1-5', CTCCAATCCTTTGACATCTGC), 0.5 μM Reverse primer (*SSIIB* 1-3', TCGATTCTCTCTGGTGACAGG), 0.5 U Uracil DNA Glycosylase, 0.625 U Takara Taq HS となるように混合し、最後に 2.5 μL の抽出・精製済み鋳型 DNA を添加した。サーマルサイクラーは peqSTAR 96 Universal Gradient (PEQLAB Biotechnologie 社製) を用いて、温度プログラムは、 25°C で 10 分間の UNG 処理、及び 95°C で 2 分間の予備変性後、40 サイクルの 95°C で 30 秒間、 60°C で 30 秒間、 72°C で 30 秒間の PCR 後、 72°C で 7 分間の最終の伸長反応を行った。また、確認試験として実施した *zein* 遺伝子については、「安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法」に完全に準拠して実施した。プライマーは、とうもろこし内在性 DNA Zein オリゴヌクレオチド (NIPPON gene 製 Cat No. 314-05673) を使用した。

結果は、PCR 増幅産物を 3% (w/v) のアガロースゲルを用いた電気泳動法により解析し、核酸染色試薬である GELRED (Biotium) による染色後、目的のバンドがみられるか否かによって判断した。対象遺伝子は、とうもろこし内在性遺伝子 *SSIIB* (*SSIIB* 1-5' /*SSIIB* 1-3', 増幅産物長 151 bp)、及びとうもろこし内在性遺伝子 *zein* (*Zein-n-5'*/*Zein n-3'*, 増幅産物長 157 bp) であるため、バンドの塩基長の判断には 100 bp と 200 bp を含む核酸断片標準試薬 (DNA Ladder 100 bp ミクセル製) を用いた。また、市販ビール系酒類の試験を行う際に PCR の成否を判定するための陽性コントロールとして、*SSIIB* 遺伝子を 10^2 コピー/mL となるように含んだビールから調製した試料を、陰性コントロールは

前述のとおり、とうもろこしを使用していないビールから調製した試料を用いた。

なお、本試験は PCR 産物のコンタミネーションによる擬陽性が生じる可能性が極めて高いため、増幅産物の取り扱い及び結果の判断には十分注意するとともに、PCR の反応液の調製、反応と電気泳動を行う部屋を分けて実施した。

(3) 結果

① 抽出法による検出下限の検討

とうもろこし由来ゲノム DNA、及び *SSI**I**b* 増幅断片をビールで段階的に希釈し調製した陽性コントロールから各種 DNA 抽出精製法で調製した DNA を鋳型として検出下限の検討を行った。ゲノム DNA を添加し作製した陽性コントロールの結果を図 1 に、*SSI**I**b* 増幅断片を添加し作製した陽性コントロールの結果を図 2 に示した。サンプル由来の妨害等は特段見られておらず、他の食品と比較して、酒類において特段感度が悪くなるということとはなかった。また、各手法によって検出感度が大きく異なり、ある程度長鎖を対象とした場合 DNeasy plant maxi kit 法が最も感度が良く (図 1)、断片化された DNA を対象とした場合 DNeasy plant maxi kit 法及び Genomic-tip 20/G 法が最も高感度であった (図 2)。各手法の検出感度をまとめたものが表 1 である。この結果から、市販製品の検討には、最も高感度な検出が可能である DNeasy plant maxi kit 法を用いることとした。

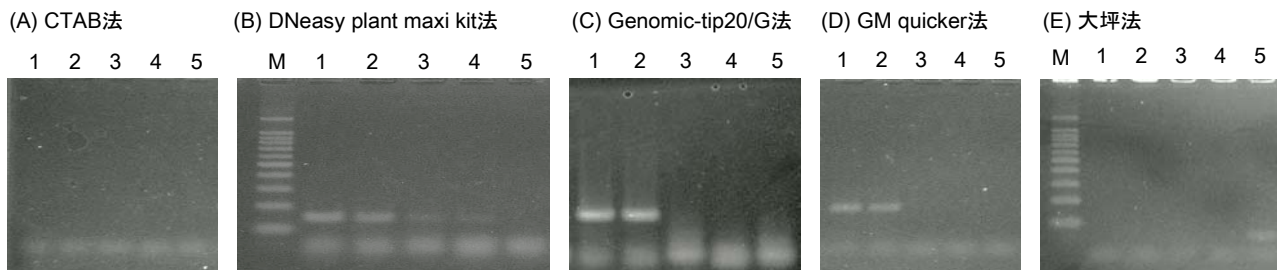


図1 ゲノム DNA で作製した陽性コントロールによる検出下限検討結果

Lane No. 1: 3.0×10^{-2} ng/ μ L (approx. 1.19×10^4 copies/mL), No. 2: 3.0×10^{-3} ng/ μ L (approx. 1.19×10^3 copies/mL),
 No. 3: 3.0×10^{-4} ng/ μ L (approx. 1.19×10^2 copies/mL), No. 4: 3.0×10^{-5} ng/ μ L (approx. 1.19×10^1 copies/mL),
 No. 5: 3.0×10^{-6} ng/ μ L (approx. 1.19 copies/mL).

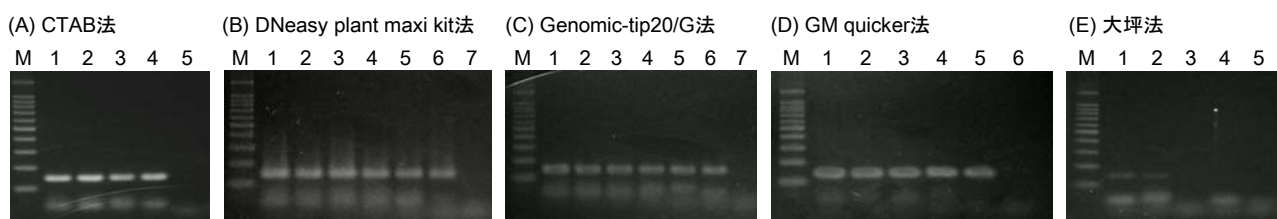


図2 検出対象遺伝子 (*SSI1b*) の PCR 増幅断片で作製した陽性コントロールによる検出下限検討結果

Lane No. 1: 1.0×10^7 copies/mL, No. 2: 1.0×10^6 copies/mL, No. 3: 1.0×10^5 copies/mL, No. 4: 1.0×10^4 copies/mL,
 No. 5: 1.0×10^3 copies/mL, No. 6: 1.0×10^2 copies/mL, No. 7: 1.0×10^1 copies/mL,

表1 各種 DNA 抽出法による検出感度の比較

方 法	結 果 (単位コピー数/ml)	
	ゲノム DNA	断片化 DNA
CTAB 法	検出できず ^a	1.00×10^4
DNeasy plant maxi kit 法	約 1.19×10^1	1.00×10^2
Genomic-tip20/G 法	約 1.19×10^3	1.00×10^2
GM quicker 法	約 1.19×10^3	1.00×10^3
酵素・70%EtOH 法	検出できず ^a	1.00×10^6

② 市販ビール系酒類における原料とうもろこし由来 DNA の残存の検討

試験を行うビール系酒類として、地域限定商品及び季節限定商品を除く通年商品中でコーン、スターチいずれかの記載のある商品全銘柄の調達を試みたところ、予約限定販売、及びコンビニ限定商品で周辺地域での販売が終了していたものを除く全 19 点の試料を購入できた。当該 19 点の試料について、各 DNA 抽出精製法の検出感度推定と同様の手順で原料とうもろこし由来 *SSI1b* 遺伝子の検出を試みたところ、試験したすべての試料で当該遺伝子由来増幅産物は検出されなかった (図 3)。また、確認試験として、とうもろこしの別の内在性遺伝子であり、これまでに多くの使用実績のある *zein* 遺伝子を対象として、検出を試みたところ、いずれの試料からも増幅産物は検出されなかった (図 4)。*SSI1b* 遺伝子及び、*zein* 遺伝子の結果をまとめたものを表 2 に示す。

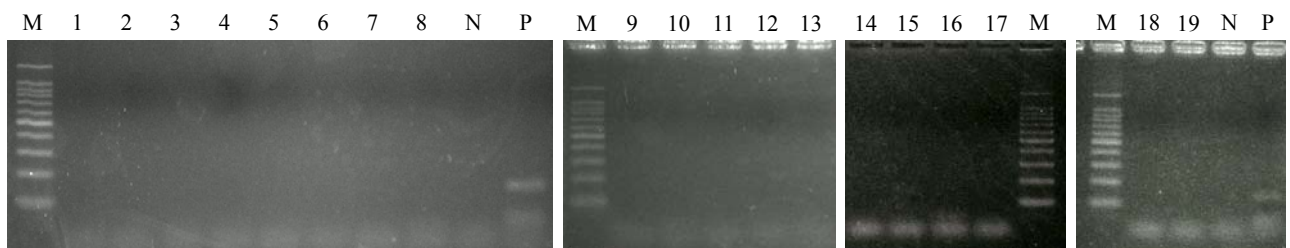


図 3 市販ビール系酒類における *SSI1b* 遺伝子の残存の有無に関する検討

Lane No.1 ~ 19: 市販ビール系酒類, M: 100 bp ladder marker, N: 陰性コントロール, P: 陽性コントロール

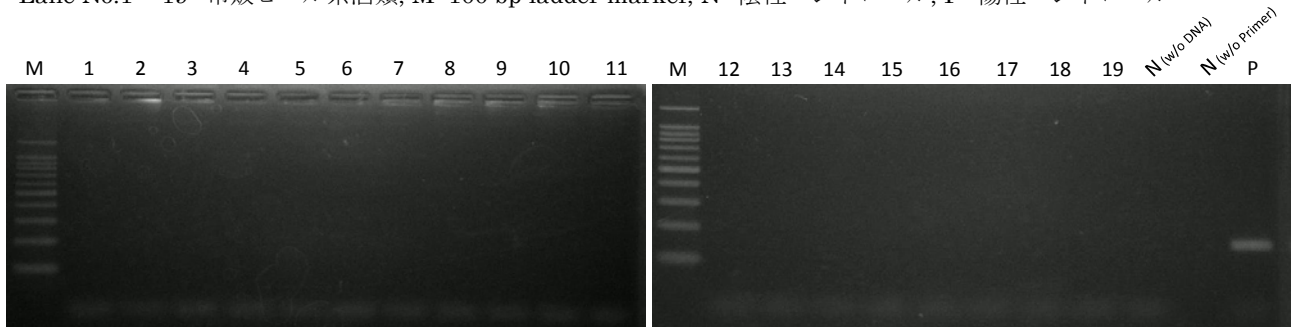


図 4 市販ビール系酒類における *zein* 遺伝子の残存の有無に関する検討

Lane No.1 ~ 19: 市販ビール系酒類, M: 100 bp ladder marker, N (w/o DNA) ※: 鋳型 DNA を含まない PCR の陰性コントロール, N (w/o Primer) ※: プライマーを含まない PCR の陰性コントロール, P: 陽性コントロール

※ 「安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法」で指定。

表 2 市販ビール系酒類分析結果

分析試料	分析点数	<i>SSI1b</i> 検出点数	<i>zein</i> 検出点数
ビール	10	0	0
発泡酒	5	0	0
リキュール その他醸造酒	4	0	0
計	19	0	0

(4) 考察

食品における遺伝子組換え食品検査の公定法及び酵素・70%EtOH法のビール系酒類への適用可否を比較・検討し最も高感度な分析法を推定した上で、市販ビール系飲料における原料とうもろこし由来 DNA の残存の有無を調査した。ビール系酒類中の DNA の抽出・精製に最も効果的だったのは、DNeasy plant maxi kit 法であり、とうもろこし内在性遺伝子 *SSI1b* の検出対象領域 151 bp の DNA 断片が製品ビール 1 mL 当たり 100 コピー以上含まれていれば検出可能であることが明らかとなった。とうもろこし穀粒当たりの胚乳細胞数が通常 10^5 個オーダー以上であることから、DNA が製造工程で分解等をうけない場合、少なくとも最終製品量 1kL 当たり 1,000 粒（平均百粒重 35 g とした場合、350 g）のとうもろこし穀粒を使用していれば検出可能と考えられ、当該手法は十分な感度を有していることが明らかとなった。

市販製品の調査においては、*SSI1b* 遺伝子はいずれの試料からも検出されず、原料とうもろこし由来 DNA は製造工程で分解が進み、検出できない状態となっていると考えられる。また、安全性未審査の遺伝子組換え植物の検査には内在性遺伝子としてとうもろこし貯蔵タンパク質である *zein* 遺伝子が用いられることがあるため、*zein* 遺伝子を対象とした検出も試みたが、いずれの試料からも増幅産物は得られず、*SSI1b* 遺伝子により得られた結論を裏付ける結果となった。

4 総括

本研究で得られた結果から、蒸留酒及び醸造酒共に、原料とうもろこし由来 DNA は製造工程中で分解・除去され、最終製品中では検出不能であると結論付けた。

5 謝辞

本研究は酒類業中央団体連絡協議会からの受託研究として実施されました。

6 問合せ先

独立行政法人酒類総合研究所 業務統括部門

Tel: 082-420-0800 (01#)

CTAB 法

CTAB 抽出液の調製

1.0 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)	10 mL
0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)	4 mL
NaCl	8.18 g
Cetyltrimethylammonium bromide (Sigma Life Science)	2 g
ポリビニルピロリドン K30 (Sigma-Aldrich)	1.0 g
2-メルカプトエタノール (オートクレーブ後、添加)	200 μ L
ミリQ水	100 mL までメスアップ
全量	100 mL

(1) 試料の溶解

凍結乾燥した試料 50 mg を滅菌済みチューブに採取し、CTAB 抽出液 2 mL を加え、1.5 mL チューブへ移す。Qiagen プロテイナーゼ K チューブ当たり 20 μ L を添加する。60 °C、30 分間インキュベートする。

(2) フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (PCI) 除タンパク処理

試料溶液に等量の PCI を加え、2 分間激しく混合し、16,000 g、15 分間、室温で遠心分離する。上層を新しいチューブに採取する。

(3) クロロホルム-イソアミルアルコール (CIA) 処理

試料溶液に等量の CIA を加え、2 分間激しく混合し、16,000 g、3 分間、室温で遠心分離する。上層を新しいチューブに採取する。

(4) アルコール沈殿

試料溶液と等量のイソプロピルアルコールを加え、30 秒間チューブを転倒混和した後、13,000 g、3 分間、4°C で遠心分離する。上清を捨てる。70%エタノール 800 μ L を加え、転倒混和し、3 分間静置した後、13,000 g、3 分間、4°C 遠心分離する。上清を捨て、5 分間減圧乾燥する。

(5) DNA の溶解と RNA の除去

TE 100 μ L、RNase A (10 mg/mL) 2 μ L を加え、DNA を溶解する。室温又は 37°C で 30 分間静置した後、400 μ L の CTAB 抽出液を加える。

(6) 再 CIA 処理

500 μ L の CIA を加えて軽く混和する。13,000 g、15 分間、室温で遠心分離し、上層を新しいチューブに採取する。

(7) アルコール沈殿

試料溶液と等量のイソプロピルアルコールを加え、30 秒間チューブを緩やかに転倒混和した後、13,000 g、3 分間、4°C で遠心分離する。上清を捨て、5 分間減圧乾燥する。

(8) DNA の溶解

滅菌水 100 μ L を加え、DNA を溶解する (DNA 溶液)。溶液は小分けして -30°C で凍結保存する。

DNeasy plant maxi kit を利用した方法

- (1) 凍結乾燥した試料 1.0 g を 50 mL 容チューブに計量し、0.5-10 μ L 容のマイクロピペットを用いて 10 μ L の RNase、及び 1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて 5 mL の Buffer AP1 (65°C) を直接添加し、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで転倒混和した後、試験管ミキサーを用いて攪拌する。
- (2) 65°C の恒温水槽中で 1 時間保温する (15 分ごとに 3 回、激しく転倒混和し、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌する。)
- (3) チューブに、1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、1.8 mL の Buffer P3 を添加後、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌後、氷水中に 15 分間静置する。
- (4) スイング式遠心分離器を使用し、3,000 g で室温で 15 分間遠心分離する。
- (5) 1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を 4.2 mL 採取し、QIA shredder spin column に負荷する。
- (6) スイング式遠心分離器を使用し、3,000 g で室温で 5 分間遠心分離する。
- (7) 底に溜まった沈殿物を吸わないように注意して、1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて上清を 4 mL 採取し、上清を新しい 50 mL チューブに移す。
- (8) 試験管ミキサーを用いて最高速で 10 秒間攪拌した後、1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて 3.4 mL を採取し、新しい 50 mL チューブに移す。
- (9) 1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて 5.1 mL の Buffer AW1 を添加し、試験管ミキサーを用いて最高速で 10 秒間攪拌する。デカンテーションにより溶液全量を DNeasy spin column に負荷する。
- (10) スイング式遠心分離器を使用し、3,000 g で室温で 5 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。
- (11) 1,000-5,000 μ L 容のマイクロピペットを用いてカラムに 12 mL の Buffer AW2 を加え、スイング式遠心分離器を使用し、3,000 g で室温で 15 分間遠心分離する。
- (12) カラムを新しい 50 mL チューブに移し、100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて、カラムに 65°C に温めておいた 1 mL 滅菌水を加える。
- (13) 5 分間室温で静置後、スイング式遠心分離器を使用し、3,000 g で室温で 10 分間遠心分離する。
- (14) 100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて溶出液の液量を測り、2 mL のサンプルチューブに移す。100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて溶出液と等量のイソプロパノールを添加する。
- (15) 上下にゆっくり 10 回転倒混和後、5 分間室温で静置する。
- (16) 遠心分離器を使用し、12,000 g で 4°C、15 分間遠心分離後、100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて上清を廃棄する。
- (17) 100-1,000 μ L 容のマイクロピペットを用いて 500 μ L の 70%エタノールを添加し、沈殿物がチューブの底からはがれるまでチューブの底を指先ではじく。
- (18) 遠心分離器を使用し、12,000 g で 4°C、3 分間遠心分離後、100-1,000 μ L 容のマイクロピペット又は 10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。
- (19) 10-100 μ L 容のマイクロピペットを用いて 100 μ L の TE (pH 8.0) 緩衝液を加え、沈殿物

を溶解させる。

- (20) 指先でチューブをはじき、遠心分離して器壁から液滴を回収するという操作を繰り返し、最後の一晩（12-24 時間）冷蔵庫に静置する。
- (21) 静置後、不溶物は、12,000 *g* で 4°C、3 分間遠心分離して得られた上清を新しいチューブに移し、これを DNA 抽出溶液とし、-30°C で保存する。

Qiagen genomic-tip20/G を利用した方法

- (1) 凍結乾燥した試料 2.0 g を 50 mL 容チューブに計量し、1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて、7.5 mL の G2 緩衝液を加え、試験管ミキサーで激しく混合する。
- (2) さらにチューブに、1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて 7.5 mL の G2 緩衝液、100-1,000 μL 容のマイクロピペットを用いて 200 μL の QIAGEN Proteinase K、及び 10-100 μL 容のマイクロピペットを用いて 20 μL の QIAGEN RNase A を加え、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで転倒混和した後、試験管ミキサーを用いて攪拌する。
- (3) 50°C の恒温水槽中で 1 時間保温する (15 分ごとに 3 回、激しく転倒混和し、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌する。)
- (4) スイング式遠心分離器を使用し、3,000 g で 4°C で 15 分間遠心分離する。
- (5) 50 mL 容チューブに、1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて、沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を全量採取後、チューブをフラッシュ遠心する。
- (6) QIAGEN Genomic-tip 20/G に、1 mL の QBT 緩衝液を負荷し平衡化する。
- (7) 100-1,000 μL 容のマイクロピペットを用いて、沈殿物を取らないようにして上清を 2 mL ずつ QIAGEN Genomic-tip20/G に負荷し、全量を自然流下する。
- (8) tip に、100-1,000 μL 容のマイクロピペット又は 1,000-5,000 μL 容のマイクロピペットを用いて 2 mL の QC 緩衝液を負荷し、自然流下を行うことによりカラムを洗浄する。この操作は計 3 回実施する。
- (9) tip を 1.5 mL 容チューブに移し、100-1,000 μL 容のマイクロピペットを用いて 750 μL の QF 緩衝液 (50°C) を加え、DNA を溶出する (溶出 1)。
- (10) tip を新しい 1.5 mL 容チューブに移し、100-1,000 μL 容のマイクロピペットを用いて 750 μL の QF 緩衝液 (50°C) を加え、DNA を溶出する (溶出 2)。
- (11) 溶出 1 及び溶出 2 の液量を量り、それぞれに 100-1,000 μL 容のマイクロピペットを用いて等量のイソプロパノールをそれぞれ添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和後、5 分間室温で静置する。
- (12) 遠心分離器 (アングルロータ) を使用し、12,000 g で 4°C、15 分間遠心分離後、100-1,000 μL 容のマイクロピペットを用いて上清を廃棄する。
- (13) 100-1,000 μL 容のマイクロピペットを用いて 1,000 μL の 70% エタノールを添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和する。
- (14) 遠心分離器 (アングルロータ) を使用し、12,000 g で 4°C、3 分間遠心分離し、100-1,000 μL 容のマイクロピペット又は 10-100 μL 容のマイクロピペットを用いて、上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。
- (15) 10-100 μL 容のマイクロピペットを用いて溶出 2 のチューブに 50 μL の TE (pH 8.0) を加え、沈殿物を 65°C で 15 分間振とう溶解させる。
- (16) 10-100 μL 容のマイクロピペットを用いて溶出 2 のチューブの液を全量、溶出 1 のチューブに入れ、DNA を 65°C で 15 分間振とう溶解する。
- (17) 指先でチューブをはじき、(12-24 時間) 冷蔵庫に静置する。
- (18) 静置後、不溶物は、12,000 g で 4°C、3 分間遠心分離して得られた上清を新しいチューブに移し、これを DNA 抽出溶液とし、-30°C で保存する。

NIPPON gene GM quicker を利用した方法

- (1) 凍結乾燥した試料 1 g を 50 mL 容ポリプロピレン製遠沈管に量り採り、GE1 緩衝液 6 mL と RNase A 20 μ L を加え、ボルテックスミキサーで 60 秒間混合した後、室温で 10 分間静置する。
- (2) GE2 緩衝液 750 μ L を加え、10~12 回転倒混和し、氷上に 10 分間静置する。5,000 g、4°C で 10 分間遠心する。
- (3) 遠心上清の一部 400 μ L を 1.5 mL チューブに移し、GB3 緩衝液 50 μ L 及びエタノール (100%) 200 μ L を添加した後、10~12 回転倒混和する。混合液全量を spin column に負荷した後、13,000 g、4°C で 30 秒間遠心し、溶出液を捨てる。
- (4) GW 緩衝液 600 μ L を負荷し、13,000 g、4°C で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。Spin column を乾燥させるため、13,000 g、4°C で 3 分間遠心する。
- (5) spin column を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、水 50 μ L を加え 3 分間室温で静置した後、13,000 g で 1 分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

酵素・70%EtOH 法

- (1) 凍結乾燥したビール粉末 0.2 g に、0.1M トリス塩酸緩衝液 (0.1M NaCl 含有 pH 8.0) を 300 μ L、*Bacillus licheniformis* 由来の耐熱性 α -アミラーゼ (シグマ製、790 U/mg 固体、1 mg/ml) を 100 μ L 加え、80°C で 1 時間反応させ、澱粉を分解する。
- (2) 次いで、プロテアーゼ K (*Tritirachium album* 由来、ワーシントン・バイオケミカル社製 20 mg/mL) 100 μ L、10% SDS 30 μ L を加え、55°C で 1 時間反応させ、タンパク質を分解する。
- (3) これを 8,000 g、15 分間遠心分離した上清に 2 倍量の冷エタノールを加え、氷上で 15 分間沈殿を形成させた。8,000 g、15 分間遠心分離し得られた沈殿に冷 70%エタノールを 300 μ L を加え、氷上で 15 分間 DNA を溶出させる。
- (4) 着色した沈殿を吸わないように注意しながら、溶液を新しいチューブに移し、3M 酢酸ナトリウム 10 μ L、エタチンメイト 3 μ L、冷エタノール 700 μ L を加え、これを 8,000 g、15 分間、4°C で遠心分離した沈殿を 300 μ L の TE 溶液に溶解し、10 mg/mL の RNase を 1 μ L を加え、55°C で 30 分間 RNA の分解を行う。
- (5) 反応終了後、等量の中性フェノールで 3 回、タンパク質の分離除去を繰り返した後、クロホルム/イソアミルアルコールで精製し、得られた上清に対し、0.2M となるように NaCl を加え、2 倍量の冷 100%エタノールを加える。生じた沈殿を 90%エタノール 30 μ L で洗浄後、TE 30 μ L に溶解し、鋳型用精製 DNA とする。