

植物、酵母、細菌からの DNA 抽出キット

ISOPLANT II

マニュアル

(第 5 版)

Code No. 310-04151 100 回用

Code No. 316-04153 20 回用

NIPPON GENE CO., LTD.

I	製品説明	p.2
II	内容	p.2
III	保存	p.3
IV	使用上の注意	p.3
V	プロトコール	p.4
	1. 植物の場合	p.5
	2. 酵母、細菌の場合	p.7
VI	トラブルシューティング	p.8
VII	データ集	p.9
	1. 植物の葉より抽出された DNA を用いた RAPD 解析	p.9
	2. 植物の葉より抽出された DNA の制限酵素反応	p.9
	3. 細菌、酵母より抽出された DNA の制限酵素反応	p.10
	4. ISOPLANT II と従来品 (ISOPLANT) の純度比較	p.10
VIII	参考文献	p.11

I 製品説明

ISOPLANT II (アイソプラント II) は、植物、酵母、細菌から短時間に DNA を抽出するためのキットである。

植物の組織は動物の組織に比べて、多糖類やポリフェノール類を多く含んでおり、DNA を抽出する際に混入することがある。これらの物質は、制限酵素反応や PCR を阻害し、DNA の定量を困難にする。

ISOPLANT II は、従来品の ISOPLANT と同様に Solution II の主成分である塩化ベンジルによって、細胞壁、細胞膜及び核膜等を破壊し、界面活性剤の存在下で可溶化する。さらに ISOPLANT II では、多糖類やポリフェノール類といった阻害物質を効果的に除去できるよう試薬とプロトコルを改良してある。また、草本植物からの抽出はもちろん、これまで難しかった木本植物からも DNA を抽出することが可能で、得られた DNA は PCR や制限酵素反応に使用することができる。

II 内容

	(100 回用)	(20 回用)
Wash Buffer	100 ml	20 ml
Solution I *1	30 ml	6 ml
Solution II *2	15 ml	3 ml
Solution III-A *3	10 ml	2 ml
Solution III-B	12 ml	2.5 ml
TE (pH8.0)	10 ml	2 ml
RNase A (1mg/ml)	100 μ l	20 μ l

*1 Solution I 中に白い沈殿が現れることがありますが、品質に問題はありません。このような場合には、50℃程度の湯浴にて結晶を完全に溶解させてから使用して下さい。また、Solution I にはタンパク質変性剤等が含まれているので、取り扱いに注意して下さい。目に入ったり、皮膚に付着した場合には、ただちに多量の水で十分に洗い流して下さい。なお、異常が認められた場合には、直ちに医師の診察を受けて下さい。

*2 Solution II の主成分は塩化ベンジルです。塩化ベンジルは医薬用外毒物ですので、取り扱いに注意して下さい。

*3 Solution III-A は、白色の懸濁液です。Solution III-A の溶液が蒸発してしまい白い固相のみが残っている場合、滅菌蒸留水を使って溶解して下さい（詳細は p.8 VIトラブルシューティングを参照）。

注) 植物サンプルから DNA を抽出する際には、2-Mercaptoethanol (2-メルカプトエタノール) 及び場合によっては、NaBH₄ (テトラヒドロほう酸ナトリウム) が別途必要です。

III 保存

冷蔵保存（2～10℃）

Wash Buffer と RNase A 以外は、室温での保存も可能です。

また、長期間ご使用にならない場合は、RNase A を冷凍保存（-20℃）してください。

IV 使用上の注意

- 本品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。また、試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱わないで下さい。
- 本品に含まれる Solution II の主成分は塩化ベンジルです。塩化ベンジルは医薬用外毒物ですので、取扱いの際にはご注意ください。
- ご使用の際には適切な保護具（手袋、眼鏡等）を着用してください。
- 蒸気を吸入しないようにし、換気を十分に行ってください。
- 目に入ったり皮膚に付着したりした場合は、大量の水で少なくとも 15 分間は洗い流し、医師の診察を受けてください。
- 本品の取扱いは、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。
- 安全性データシート（SDS）につきましては、ニッポンジーン WEB ページにてご覧になれます。

ISOPLANT II による DNA 抽出プロトコールは、試料によって二通りの方法があります。

1. 植物の場合
2. 酵母、細菌の場合

1. 植物の場合

- ◆試薬の調製：植物サンプルから DNA を抽出する場合には、以下の試薬 (A, B, C) を調製する。
試薬 (A, B, C) は、抽出に必要な量だけを使用直前に調製する。調製した試薬は保存すると収量の低下及び酵素反応阻害物質の混入を招く恐れがあるので、使いきるようにする。

植物の場合

A. Wash Buffer + 2-Mercaptoethanol (2-ME)

添付の Wash Buffer に 2-Mercaptoethanol (別途必要) を終濃度 0.5% になるように加える。

B. Solution I + 2-Mercaptoethanol (2-ME)

添付の Solution I に 2-Mercaptoethanol (別途必要) を終濃度 1% になるように加える。

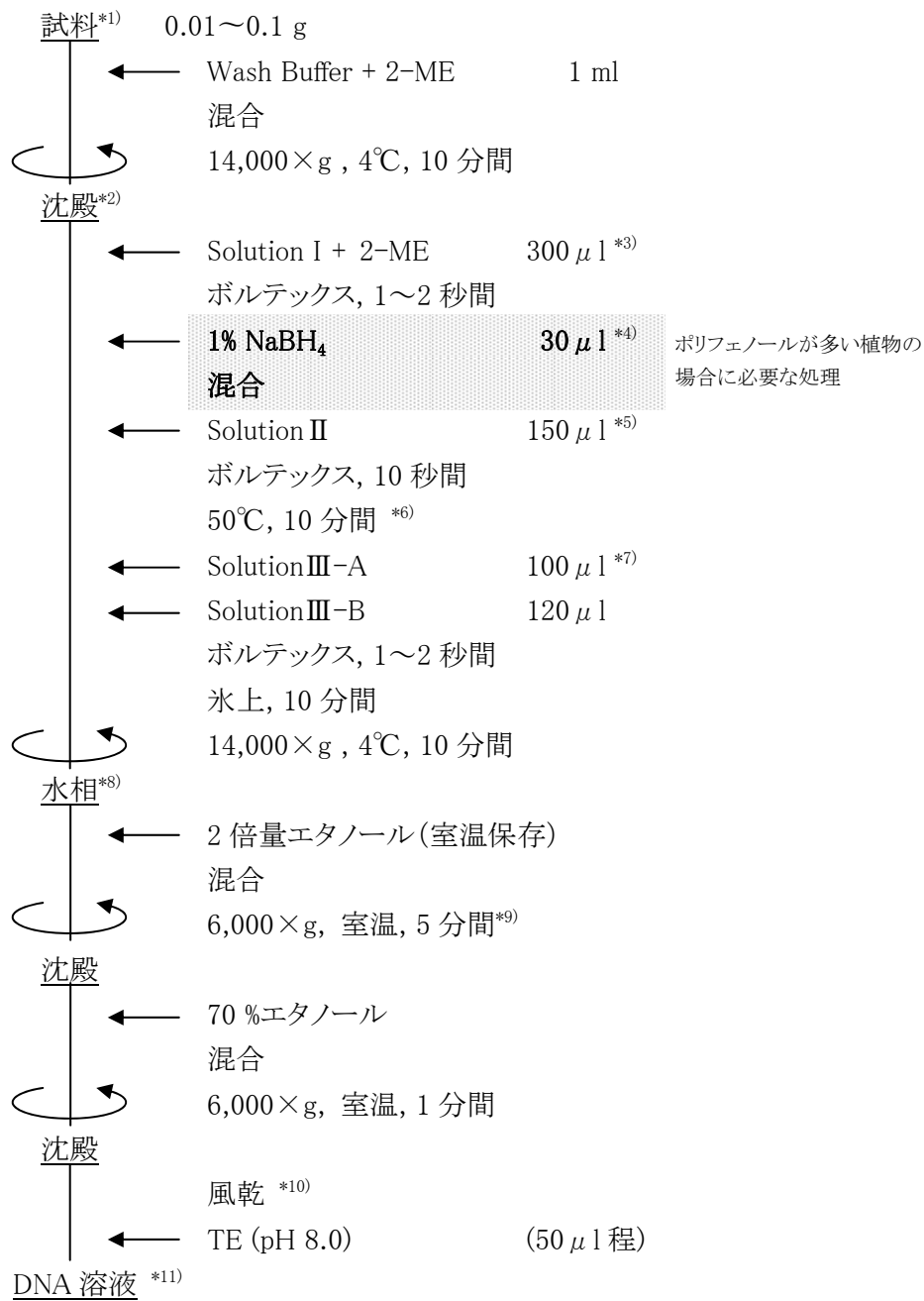
特にポリフェノール等が多い植物の場合

C. 1% NaBH₄

NaBH₄ (別途必要) を 1% (w/v) となるように滅菌水で溶解する。

注) 植物サンプルから DNA を抽出する際には、2-Mercaptoethanol (2-メルカプトエタノール) 及び場合によっては、NaBH₄ (テトラヒドロほう酸ナトリウム) が別途必要です。

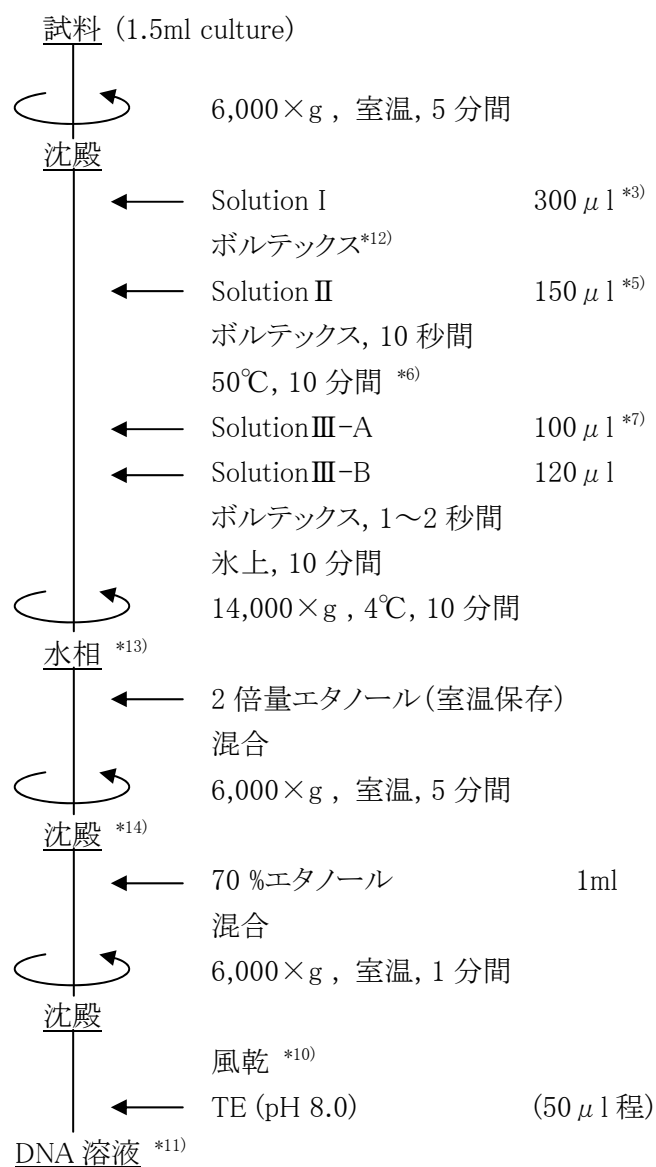
◆植物からの DNA 抽出プロトコール



- *1) 植物の場合 0.01~0.1 g をカッター等で 1 mm 角に切るか、液体窒素で凍結・粉碎して使用する。凍結・粉碎した方が収量は高くなる。特に木本植物の場合には、凍結・粉碎しないと収量がきわめて低くなる場合がある。植物試料は、凍結・粉碎後、直ちに Wash Buffer 中に浸す。空気中に長時間放置すると、ポリフェノール類が酸化し褐変反応が進み、DNA 抽出を行う際に支障をきたすことがある。
- *2) できるだけ上清を除く。切り刻んだ試料を用いた場合には、遠心操作を行っても試料が浮遊し、上清を除くのが困難となるが、チップの先を溶液に入れて吸い出し、なるべく溶液を残さないようにする。
- *3) Solution I 中に白い結晶が現れることがある。このような場合には、50°C 程度の湯浴中で結晶を完全に溶解した後、内容物が均一になるよう攪拌してから使用する。また、Solution I にはタンパク質変性剤等が含まれているので、取り扱いには注意する。目に入ったり、皮膚に付着した場合には直ちに多量の水で十分に洗い流す。
- *4) NaBH₄ (テトラヒドロほう酸ナトリウム) は、強力な還元剤であり、植物組織中に含まれるポリフェノール類の酸化を抑えるために使用する。NaBH₄ を添加すると泡が発生し、チューブから泡が漏れたり、チューブのふたを開ける際に内容物が飛び散る危険性があるので、十分に注意する。NaBH₄ を添加した場合、添加混合した後や 50°C でのインキュベート前後等、軽くスピンドウンして泡を静めることでこのような危険性を回避することが出来る。
- *5) 本品に含まれる Solution II の主成分は塩化ベンジルである。塩化ベンジルは医薬用外毒物であるため、取り扱いの際には注意が必要である。(詳細は p.3 IV 使用上の注意を参照)
- *6) Solution II の主成分である塩化ベンジルによって、細胞壁、細胞膜、核膜等が破壊され、DNA が水相に溶け出す。植物試料の場合には、通常、形態の変化は目で確認できない。
- *7) Solution III-A は、使用前によく振り均一にした後、先を切ったチップで吸う。
- *8) 有機相の塩化ベンジルや遠心後に認められる白い固形物や浮遊している植物片等、水相以外の物質ができるだけ混入しないようにする。水相以外の物質が混入してしまった場合には、再度遠心操作を行い、水相のみを採取する。水相が白く濁っている場合には、水相に Solution III-A, B を再度加え、混合した後遠心操作 (14,000×g, 4°C, 10 分間) を行い、水相を使用する。(p.8 VI トラブルシューティング参照)
- *9) 遠心操作は、室温で保存してあるエタノールを添加後直ちに行う。−20°C 等の低温で静置すると夾雑物が混入してくる場合がある。
- *10) 沈殿を完全に乾燥すると非常に溶解しにくくなるので、乾燥し過ぎないように注意する。
- *11) DNA 溶液に溶解しない物質がある場合には、氷上にてしばらく静置して DNA を溶解させた後、軽く遠心して上清を使用する。DNA 溶液中の RNA を除く場合には、添付の RNase A を終濃度 10~20 μg/ml になるように加えて、37°C にて 30 分間反応させる。必要があれば反応終了後、フェノール/クロロホルム処理を行う。(p.8 VI トラブルシューティング参照)

2. 酵母、細菌の場合

◆酵母、細菌からの DNA 抽出プロトコール



* 12) 菌体を十分に懸濁する。

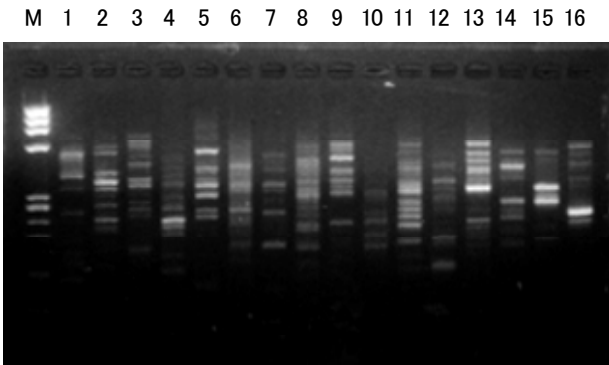
* 13) 有機相の塩化ベンジルや遠心後に認められる白い固形物等、水相以外の物質ができるだけ混入しないようにする。水相以外の物質が混入してしまった場合には、再度遠心操作を行い、水相のみを採取する。

* 14) DNA の沈殿は目に見えないことがある。

トラブル	対策
● Solution I に白い結晶が現れる。	<ul style="list-style-type: none"> 50°C程度の湯浴中で、結晶を完全に溶解した後、内容物が均一になるよう攪拌してから使用する。
● Solution III-A の溶液が蒸発してしまい白い固相のみが残ってしまう。	<ul style="list-style-type: none"> 滅菌蒸留水を用いて溶解させる。 <ol style="list-style-type: none"> 固相全体が浸る程度まで H₂O を加える。 固相には吸水性があるのでしばらく待つ。 表面が乾いてきたら再度 H₂O を加える。 H₂O の添加と吸水を繰り返し、最終的には固相の表面全体を H₂O がカバーする程度まで加えて下さい。
● Wash Buffer+2-ME 添加後の遠心で、植物試料が浮遊していて上清が取りにくい。	<ul style="list-style-type: none"> 植物種によって遠心しても試料が沈殿しない場合があるが、チップの先を溶液に入れ、吸い出す。この際、植物片が溶液と共に吸い出されることがあるが、多少はやむを得ない。
● Solution III-A, B を加えた後の遠心後の上清が濁っている、または着色している。	<ul style="list-style-type: none"> 上清を別のチューブへ移した後、再度 Solution III-A 100 μl, Solution III-B 120 μl を加えて混合し、遠心 (14,000×g, 4°C, 10 分間) を行い、上清を使用する。(★)
● エタノール沈殿後の遠心で、DNA が茶色く着色している。	<ul style="list-style-type: none"> 沈殿物に茶色い着色が認められる場合には、再度抽出を行う。その際、抽出操作において以下のことを試してみる。 <ol style="list-style-type: none"> NaBH₄ 処理を行う。(p.4~5 参照) Wash Buffer, Solution I に 2-Mercaptoethanol (p.4~5 参照) を加えていない場合は加える。 Wash Buffer+2-ME を植物試料に加えた後、50°C で 10 分間インキュベートする。 上記 (★) を行う。
● DNA と異なる白い沈殿が生じた。	<ul style="list-style-type: none"> TE に溶解しない物質である場合は、遠心して上清を使用する。(☆) 抽出操作において上記 (★) を試してみる。
● DNA 沈殿が溶解しない。	<ul style="list-style-type: none"> 4°C にて一晩または、50°C にて 1 時間放置する。ピペッティングしても良いが、得られた DNA が切断されることがある。
● 収量が少ない。	<ul style="list-style-type: none"> できるだけ新鮮な試料を使用する。 凍結粉碎した試料を使用する。凍結粉碎できない場合には、できるだけ試料を細かく刻む。 スケールアップする。 Solution II 処理時間を長くする。この場合、夾雑物の混入も多くなる可能性が高くなることに注意する。
● 得られた DNA 溶液に多量の RNA が混入している。	<ul style="list-style-type: none"> 得られた DNA 溶液に添付の RNase A を終濃度 10~20 μg/ml になるように加えて、37°C にて 30 分間反応させる。必要があれば反応終了後フェノール/クロロホルム処理を行う。
● 得られた DNA を鋳型として PCR を行ったが、増幅が見られない。	<ul style="list-style-type: none"> DNA 溶液が着色している場合には上記 (★) を、DNA と異なる白い沈殿が得られた場合は、上記 (☆) を試してみる。 PCR に用いる鋳型の量を減らすことで (1/10 希釈等) PCR の阻害を減らすことができる。
● 得られた DNA が切断されている。	<ul style="list-style-type: none"> 抽出操作中、DNA の物理的切断を防ぐため、ピペットチップの先端をカットして使用する。

【植物の葉より抽出された DNA を用いた RAPD 解析】

それぞれ凍結粉碎した葉 0.1g を用いて抽出した DNA の 1/100 量を使用して、RAPD 解析を行った。



- | | |
|----------------|----------------|
| lane 1. スイカ | lane 9. ホウレンソウ |
| lane 2. キュウリ | lane 10. イチョウ |
| lane 3. カボチャ | lane 11. リンゴ |
| lane 4. トウモロコシ | lane 12. カキ |
| lane 5. イネ | lane 13. モモ |
| lane 6. ネギ | lane 14. ユズ |
| lane 7. マメ | lane 15. プルーン |
| lane 8. タバコ | lane 16. ナシ |

M : Marker 4 (ϕ X174/HaeIII)
 Primer: TGGATTGGTC
Taq DNA polymerase: Gene *Taq*
 3% Agarose 21

【RAPD-PCR】

・ PCR Mixture

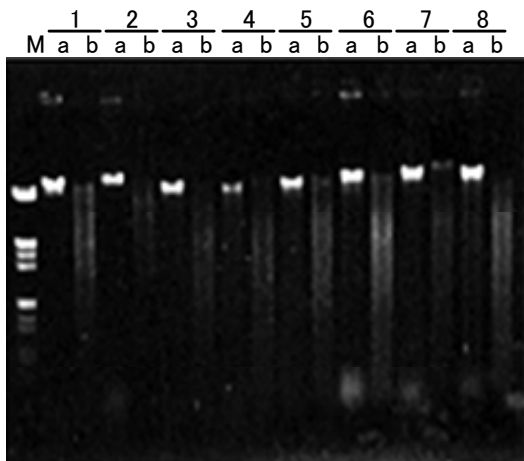
Template DNA	1 μ l
10× Gene <i>Taq</i> Universal Buffer	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
Primer (10 μ M)	1 μ l
Gene <i>Taq</i> (5 units/ μ l)	0.25 μ l
H ₂ O	39 μ l
	50 μ l

・ PCR 条件

95°C	3min.) 1 cycle
40°C	5min.	
72°C	1min.	
	↓	
95°C	15sec.) 25 cycles
40°C	2min.	
72°C	1min.	
	↓	
72°C	5min.	

【植物の葉より抽出された DNA の制限酵素反応】

それぞれ凍結粉碎した葉 0.1g を用いて抽出した DNA の 1/20 量を使用して、制限酵素反応 (5~20 units) を行った。



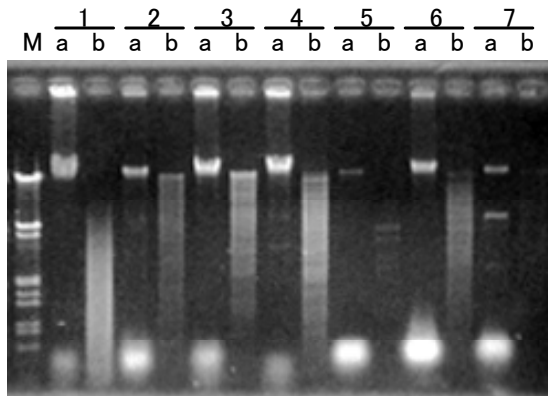
- | | |
|----------------|-------------|
| lane 1. タバコ | lane 5. イネ |
| lane 2. ホウレンソウ | lane 6. 茶 |
| lane 3. ニンジン | lane 7. ユズ |
| lane 4. ナス | lane 8. リンゴ |

M: Marker 2 (λ /HindIII・EcoRI)
 a : intact DNA
 b : HindIII digest + RNase A
 0.8% Agarose S

(注意) 上記のデータは、DNA を抽出する際に NaBH₄ 処理を行っています。

【細菌、酵母より抽出された DNA の制限酵素反応】

それぞれ 1.5ml 液体培養したものから抽出した DNA の 1/20 量を使用して、制限酵素反応 (5~20units) を行った。



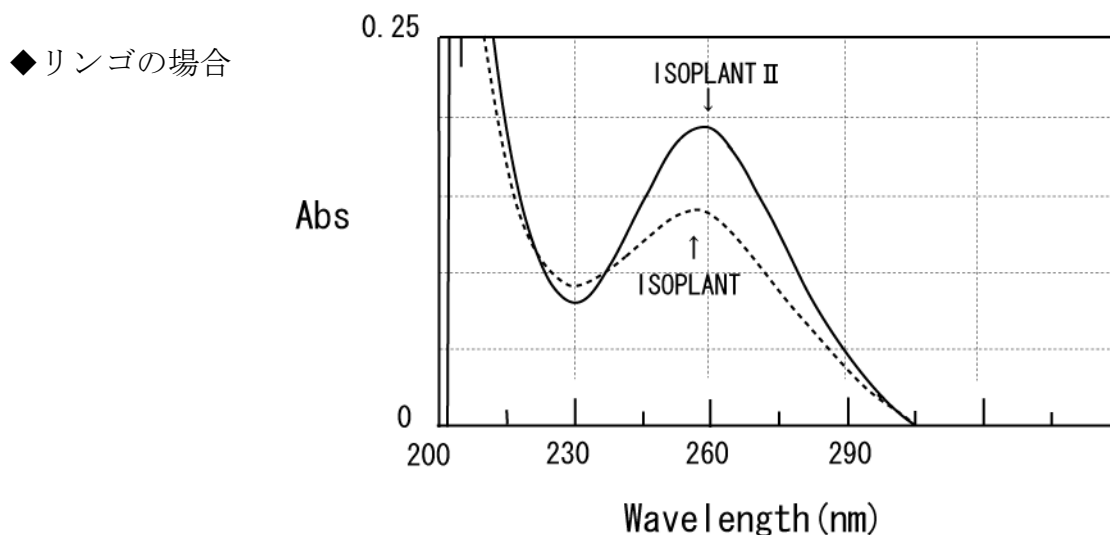
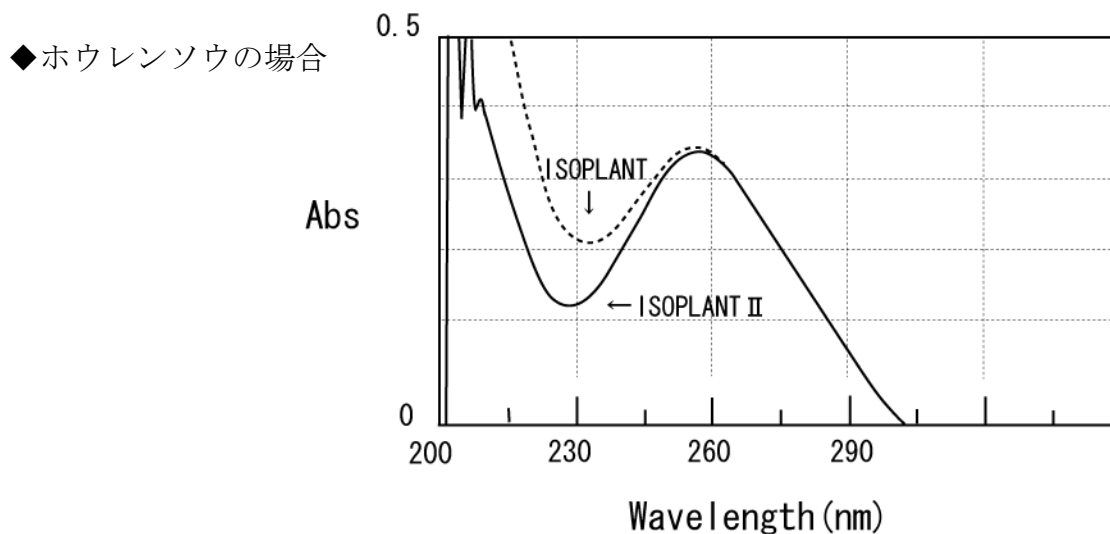
lane 1. *Serratia marcescens*
 lane 2. *Moraxella bovis*
 lane 3. *Haemophilus influenzae c*
 lane 4. *Proteus vulgaris*
 lane 5. *Shizosaccharomyces pombe*
 lane 6. *Pichia pastoris*
 lane 7. *Saccharomyces cerevisiae*

M : Marker 2 (λ /HindIII · EcoRI)
 a : intact DNA
 b : HindIII digest + RNase A
 0.8% Agarose S

【ISOPLANT II と従来品 (ISOPLANT) の純度比較】

ホウレンソウ及びリンゴの葉より ISOPLANT II と従来品 (ISOPLANT) で同量の試料から DNA を抽出し、吸光度 (200~300 nm) を測定した。

ISOPLANT II で抽出された DNA は、260 nm にピークを持つきれいな山形を示し、多糖類、ポリフェノール類等の夾雑物が除かれた純度の高い DNA であることが示された。



VIII 参考文献

1. Xing S. and Aharon G.: *Analytical Biochemistry*, 174, 650-657 (1988)
2. C. S. Kim, C. H. Lee, J. S. Shin, Y. S. Chung and N. I. Hyung: *Nucleic Acids Res.*, 25 (5) 1085-1086 (1997)

・マニュアル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。

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

TEL 076 - 451 - 6548
www.nippongene.com

お問い合わせは、お電話もしくはWEBフォームより承っております。