

# ISOPLANT II

Code No. 310-04151, 316-04153

簡易マニュアル Ver.5-2411

ISOPLANT II（アイソプラント2）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す。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ります。これらの物質は、制限酵素反応やPCRを阻害し、DNAの定量を困難にします。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します。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おり、得られたDNAはPCRや制限酵素反応に使用することができます。

ISOPLANT IIによるDNA抽出プロトコルは、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（WEB版詳細マニュアルをご覧ください）

## 製品内容

保存：冷蔵保存（2～10℃）

キット内容品	容量（100回用）	容量（20回用）	備考
Wash Buffer	100 ml	20 ml	
Solution I	30 ml	6 ml	*1
Solution II	15 ml	3 ml	医薬用外毒物*2
Solution III-A	10 ml	2 ml	*3
Solution III-B	12 ml	2.5 ml	
TE (pH8.0)	10 ml	2 ml	
RNase A (1mg/ml)	100 µl	20 µl	長期：冷凍保存*4

- \*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。
- \*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、取扱いの際にはご注意ください。安全性データシート（SDS）は、ニッポンジーンWEBページよりご覧ください。
- \*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（WEB版の詳細マニュアル p.8 VIトラブルシューティングを参照）。
- \*4 RNase Aを長期間ご使用にならない場合は、冷凍保存（-20℃）して下さい。

## プロトコール

### 1.植物の場合

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)、場合によっては、NaBH<sub>4</sub> (テトラヒドロほう酸ナトリウム) が別途必要です。

#### <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。

#### 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% NaBH<sub>4</sub> NaBH<sub>4</sub> (別途必要) を 1% (w/v)となるように滅菌水で溶解する。

#### <植物からの DNA 抽出プロトコール>

##### マイクロチューブ

- ① ← 0.01~0.1 g の植物組織をマイクロチューブに入れる
  - 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・粉砕して使用する。凍結・粉砕した方が収量は高くなる。特に木本植物の場合には、凍結・粉砕しないと収量がきわめて低くなる場合がある。
- ② ← 1 ml の Wash Buffer + 2-ME (用事調製) を加え、混合する
  - 植物試料は、凍結・粉砕後、直ちに Wash Buffer 中に浸す。空气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。
- ③ ← 遠心 (14,000 × g、10 分間、4°C) し、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。

沈殿

(次のページの④に続く)

(前のページからの続き)

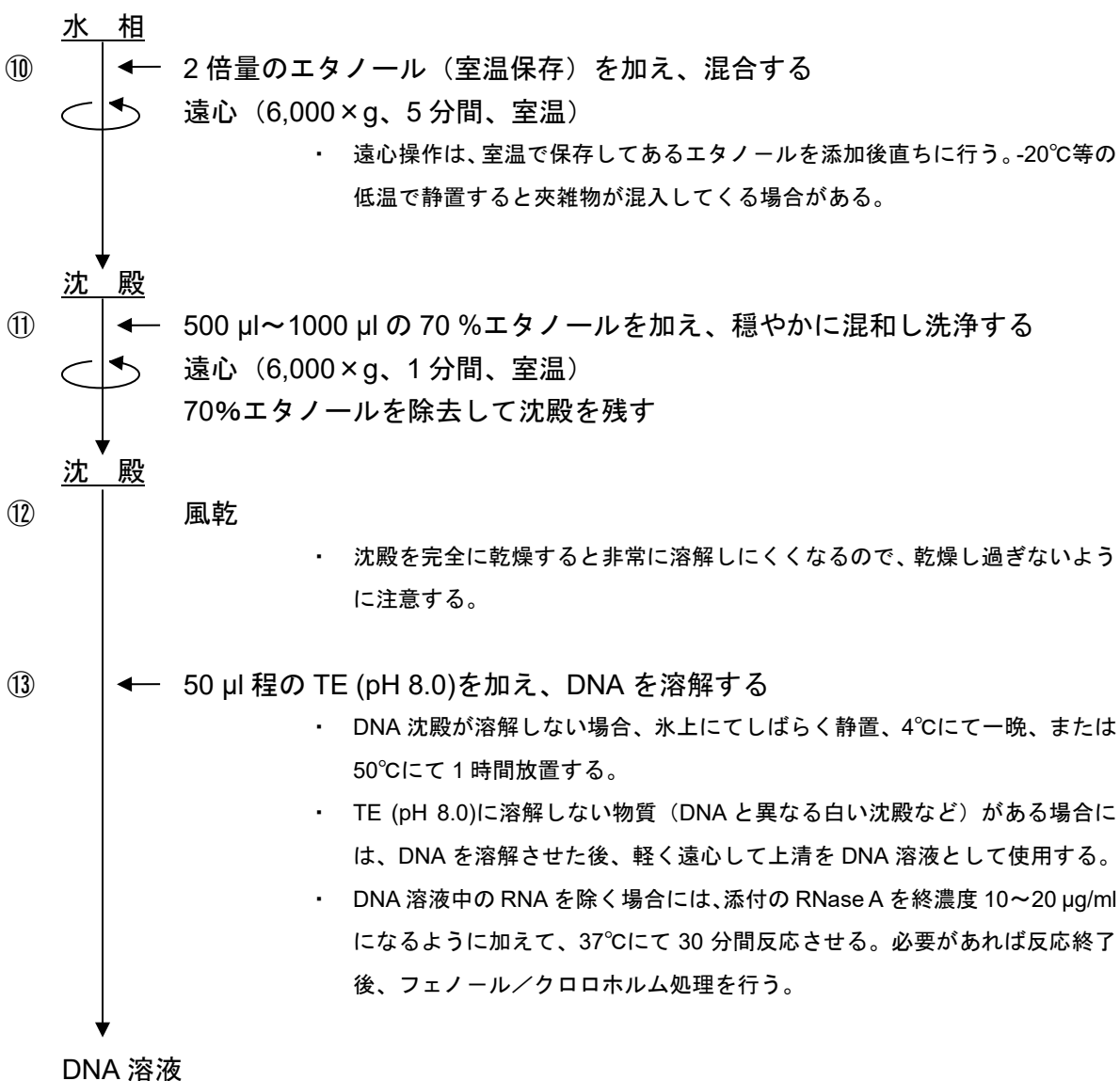
沈殿

- ④ ← 300  $\mu$ l の Solution I + 2-ME (用事調製) を加え、1~2 秒間ボルテックス
- ・ 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。
- ⑤ ← ポリフェノールが多い植物の場合、30  $\mu$ l の 1% NaBH<sub>4</sub> (用事調製) を加え、混合する
- ・ NaBH<sub>4</sub> (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。NaBH<sub>4</sub> 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。NaBH<sub>4</sub> 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できる。
- ⑥ ← 150  $\mu$ l の Solution II を加え、10 秒間ボルテックス  
50°C、10 分間インキュベート
- ・ Solution II の主成分である塩化ベンジル (医薬用外毒物) 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 ← 100  $\mu$ l の Solution III-A を加え、混合する
- ・ 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 ← 120  $\mu$ l の Solution III-B を加え、1~2 秒間ボルテックス  
氷上、10 分間静置
- ⑨ ← 遠心 (14,000  $\times$  g、10 分間、4°C)  
水相と有機相に分かれるので、水相を新しいチューブに移す
- ・ 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、別のチューブに移した後の水相に、再度 Solution III-A を 100  $\mu$ l、Solution III-B を 120  $\mu$ l 加えて混合し、遠心操作 (14,000  $\times$  g、10 分間、4°C) を行い、水相を使用する。

水相

(次のページの⑩に続く)

(前のページからの続き)



※本品について詳しくは、ニッポンジーンホームページや詳細マニュアル[WEB版]をご参照下さい。

- ・ 酵母・細菌からのDNA抽出プロトコール
- ・ トラブルシューティング・データ集

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。  
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 学術営業課

TEL 076-451-6548 (受付: 平日 9時-12時、13時-17時)

ホームページ URL <https://www.nippongene.com/siyaku/>