

植物の葉からの DNA 抽出キット

ISOSPIN Plant DNA

マニュアル（第 1 版）

Code No. 312-08631

NIPPON GENE CO., LTD.

I 製品説明

ISOSPIN Plant DNA は、スピncラムを用いて植物の葉から DNA を抽出・精製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を応用しており、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。使用するスピnc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。

本キットでは、夾雑物を遠心分離により除去する方法を採用しており、今まで抽出困難であったポリフェノールや粘性物質（多糖類）等を多く含む植物試料からも、約 1 時間で高純度の DNA を容易に得ることができます。

II キット内容

キット内容品	(50 回用)	備考
Prewash Buffer	30 ml × 1 本	
PE1 Buffer	22.5 ml × 1 本	
PE2 Buffer	2.5 ml × 1 本	
PB Buffer	30 ml × 1 本	エタノール含有
PW1 Buffer	40 ml × 1 本	エタノール含有
PW2 Buffer	45 ml × 1 本	エタノール含有
RNase A (100 mg/ml)	250 μl × 1 本	
Elution Buffer	3 ml × 1 本	組成：10mM Tris-HCl(pH9.0), 0.1 mM EDTA(pH8.0)
Spin Column	50 本 × 1 袋	上部パーツ：カラム 下部パーツ：Collection Tube

III 保存

室温保存

- ・ RNase A は室温保存が可能ですが、長期間ご使用にならない場合には、冷蔵保存（2～10℃）もしくは冷凍保存（-20℃）して下さい。
- ・ PB Buffer、PW1 Buffer、PW2 Buffer にはエタノールが含まれています。ご使用後は蒸発を防ぐため速やかに蓋を閉め、保管して下さい。
- ・ PB Buffer および PW1 Buffer はボトルの口まわりに白い結晶が析出する場合があります。DNA 抽出操作には影響ありません。蓋を開ける際に生じる湿度の変化により析出しやすくなるため、蓋を閉めた後、さらにチャック付き袋等に入れて保管することをおすすめします。

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。
- ・ 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。
- ・ 製品安全性データシート（SDS）につきましては、ニッポンジーンホームページ（<http://www.nippongene.com/siyaku/>）にてご覧になれます。

V プロトコール

<キット以外に必要なもの>

- ・マイクロピペット
- ・ピペットチップ
- ・ペッスル (※)
- ・1.5 ml マイクロチューブ (※)
- ・遠心分離機 (4°C)
- ・ヒートブロック (65°C)

※ 効率よく組織を破碎できるようにチューブの形状に応じたペッスルをご使用下さい。

<必要に応じて別途用意するもの>

- ・液体窒素

<使用する試料量の目安>

最初に使用する試料の量が多すぎると夾雑物の除去が不十分となり、DNA の収量と純度が著しく低下する恐れがあります。少量の試料から検討を始め、段階的に試料の量を増やしてお試しく下さい。

粘性物質などの夾雑物が少ない試料は、抽出プロトコール中のオプション Prewash Buffer 処理を省略できます。

オプション Prewash Buffer 処理を省略可能な試料例

試料 (葉)	試料量の目安
ハウレンソウ	50 mg
シロイヌナズナ	20 mg
キャベツ	100 mg
イネ	50 mg
キク	50 mg
マツ	20 mg

オプション Prewash Buffer 処理を推奨する試料例

試料 (葉)	試料量の目安
イチゴ	20 mg
バラ	50 mg
サクラ	50 mg
キウイ	20 mg
スギ	10 mg

<抽出プロトコール>

- ① 細断または粉碎した 10 - 100 mg の新鮮な葉または凍結した葉（試料）を 1.5 ml マイクロチューブに入れる。

注) 試料の量が多すぎると DNA の収量と純度が著しく低下する恐れがあります。少量の試料から検討を始め、段階的に試料の量を増やしてお試しください。(p.4「使用する試料量の目安」参照)



粘性物質などの夾雑物が少ない試料はオプション操作②を省略できます。(p.4「使用する試料量の目安」参照)

- オプション
- ② 600 μ l の Prewash Buffer を加え、20 秒間以上ボルテックスで攪拌する。遠心 (13,000 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ C) して植物試料をペレットにした後で上清をすべて除去する。

注) 硬い葉や粘性物質の除去が困難な試料の場合 (例: スギ)、Prewash Buffer が組織に浸透するようボルテックスの代わりにペッスルで軽くすり潰す。



- ③ 試料に 450 μ l の PE1 Buffer を加え、ペッスルですり潰し、均一な懸濁状態にする。

注) 懸濁液中に試料の塊が残っていると収量は低くなるので、念入りにすり潰す。チューブを光にかざすと懸濁液中の塊が確認しやすい。

- ④ 5 μ l の RNase A を加え、ボルテックスでよく攪拌する。65 $^{\circ}$ C で 10 分間加温する。加温中、3 分おきに 20 秒間以上ボルテックスで攪拌する。

- ⑤ 50 μ l の PE2 Buffer を加え、20 秒間以上ボルテックスで攪拌する。遠心 (13,000 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ C) し、上清を新しいマイクロチューブに回収する。

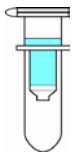
注) 沈殿物や液表面の膜上の析出物をなるべく取らないように上清を回収する。

注) 回収した上清に析出物が多く含まれる場合、再度遠心 (13,000 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ C) し、析出物をペレットにしてから上清を回収する。

- ⑥ 上清に対して等量の PB Buffer を加え、均質になるまで転倒混和する。遠心 (13,000 \times g、30 秒間、4 $^{\circ}$ C) し、沈殿物がある場合はできるだけ取らないように上清 (混合液) を新しいマイクロチューブに回収する。

例) 上清 450 μ l の場合は、PB Buffer 450 μ l を添加するため、混合液は 900 μ l になる。

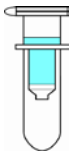




- ⑦ メンブレンに DNA を吸着させるため、900 μ l の混合液を Spin Column に添加する。

注) 混合液量が 900 μ l より多い場合はステップ⑦~⑧を繰り返して、1 本の Spin Column に全量を添加して下さい。

- ⑧ 遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C) し、Spin Column のカラムを外して Collection Tube にたまつたろ液を捨てる。カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。

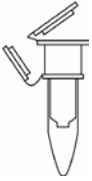


- ⑨ 700 μ l の PW1 Buffer を Spin Column に添加し、遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C) する。ろ液を捨てて、カラムを Collection Tube に再度戻す。

- ⑩ 500 μ l の PW2 Buffer を Spin Column に添加し、遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C) する。

- ⑪ 300 μ l の PW2 Buffer を Spin Column に添加し、遠心 (13,000 \times g、2 分間、4 $^{\circ}$ C) する。ろ液と Collection Tube を捨てる。

注) PW2 Buffer による 2 回目の洗浄では、添加量と遠心時間が異なる。



- ⑫ Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に重ねる。

- ⑬ DNA を溶出させるため、50 μ l の Elution Buffer をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置する。

注) Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA) の代わりに Nuclease フリー水も溶出液として使用できる。

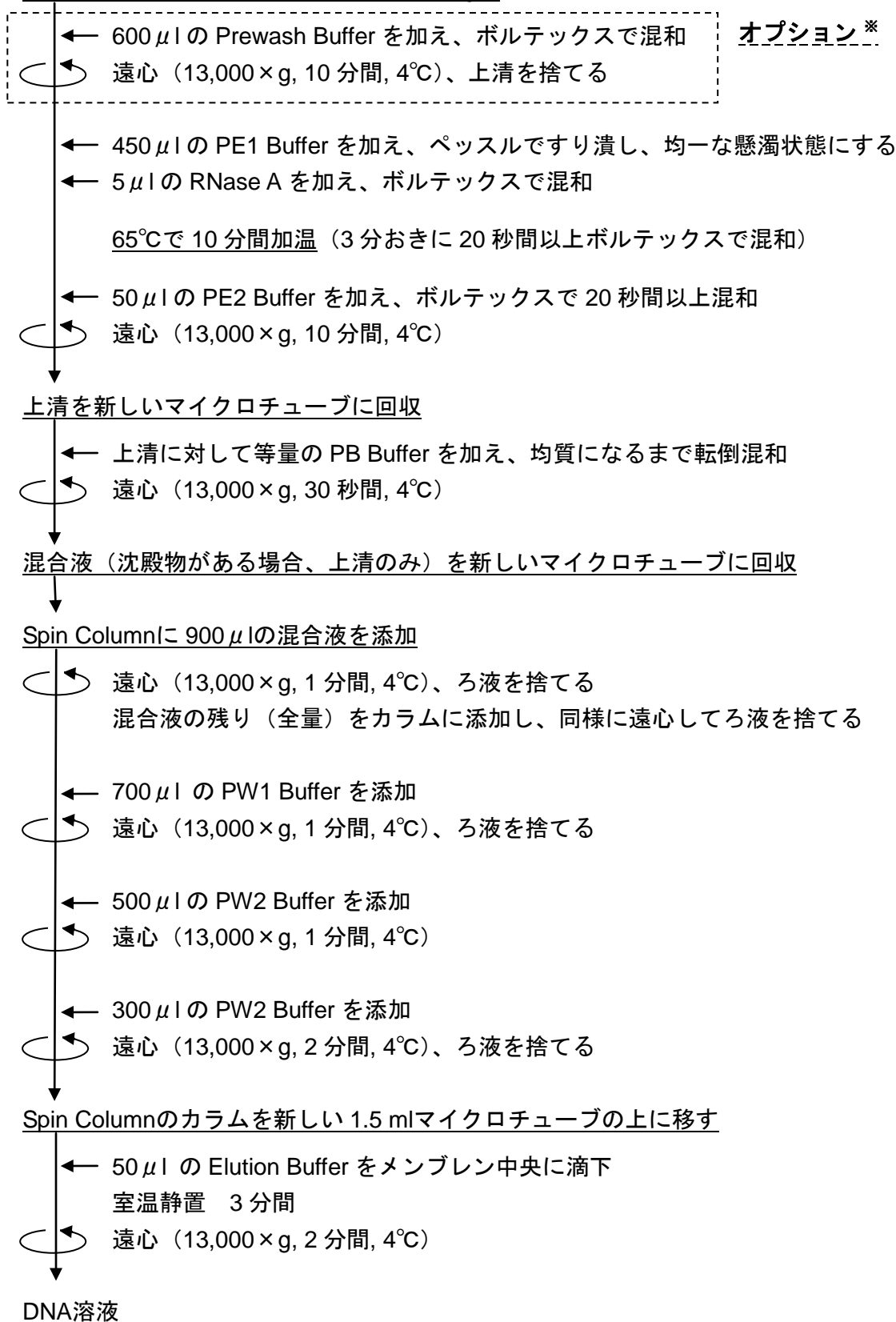
- ⑭ 遠心 (13,000 \times g、2 分間、4 $^{\circ}$ C) する。

- ⑮ DNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される。

<簡易プロトコール>

※ 試料のスタート量およびオプション処理を推奨する試料の例は p.4 「使用する試料量の目安」 参照

細断または粉碎した植物の葉 (10 - 100 mg) ※



VI トラブルシューティング

トラブル	予想される原因	対 策
低収量	DNA が分解している。	<ul style="list-style-type: none"> 新鮮な試料を用いる。 試料採取後、すぐに DNA 抽出プロトコルを行うか、速やかに凍結させる。
	オプション洗浄中に試料を過度に破砕すると、Prewash Buffer 中に DNA が溶出する。	<ul style="list-style-type: none"> Prewash Buffer 中のボルテックスは長時間行わない。 ペッスルですり潰す場合は、葉の組織（繊維）が残る程度にする。
	PE1 Buffer 中の試料のホモジナイズが不十分。	<ul style="list-style-type: none"> PE1 Buffer 中でペッスルを用いて試料をよくすり潰す。試料の塊がなくなり、均一な懸濁状態になるまですり潰す。 チューブ形状に適したペッスルを用いる。丸底チューブには丸底チューブ用のペッスルを使用。空のチューブにペッスルをはめて、隙間がないか確認する。
低純度	粘性物質を含む多糖類などの夾雑物が多い試料である。	<ul style="list-style-type: none"> Prewash Buffer 中に植物試料中の夾雑物を溶出させるオプション洗浄（ステップ②）を行う。
	Prewash Buffer による洗浄が不十分。	<ul style="list-style-type: none"> 硬い葉などの場合は、ボルテックスではなく、ペッスルを用いて植物組織に Prewash Buffer が浸透するように軽くすり潰す。 植物試料量を半分以上減らす。
	PB Buffer 添加後の遠心で生じた沈殿（夾雑物）が持ち込まれた。	<ul style="list-style-type: none"> 試料によって目視で分かりづらいゲル状の沈殿物を形成することがあるので、上の方から慎重に上清を 800 μl 取って新しいチューブに移し、残りの上清を先の細いチップで回収する。沈殿があると吸引しにくくなるので、上清と沈殿の判別ができる。
スピncラムの目詰まり	夾雑物を取り除かれていない。	<ul style="list-style-type: none"> 上記「低純度」の対策を行う。 そのまま操作を続けたい場合は、カラムから溶液がぬけるまで遠心時間を 2 倍程度に延長する。ただし、得られた DNA 溶液の純度は低くなることが多い。

VII データ

<製品性能>

DNA 吸着容量	20 μ g
カラム容量	900 μ l

<DNA 収量の目安>

試料 (葉)	DNA 収量の目安
ホウレンソウ	40 ng DNA/mg tissue
シロイヌナズナ	80 ng DNA/mg tissue
キャベツ	50 ng DNA/mg tissue
イネ	90 ng DNA/mg tissue
キク	100 ng DNA/mg tissue
マツ	150 ng DNA/mg tissue
イチゴ	30 ng DNA/mg tissue
バラ	30 ng DNA/mg tissue
サクラ	30 ng DNA/mg tissue
キウイ	40 ng DNA/mg tissue
スギ	30 ng DNA/mg tissue

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

URL <http://www.nippongene.com/siyaku/>

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。