

植物、酵母、細菌からの DNA 抽出キット

ISOPLANT

マニュアル

(第 11 版)

Code No.314-02731 100 回用

NIPPON GENE CO., LTD.

I	製品説明	p.2
II	内容	p.2
III	保存	p.2
IV	使用上の注意	p.3
V	プロトコール	p.4
VI	トラブルシューティング	p.6
VII	Q&A	p.6
VIII	データ集	p.7
	1. 植物からの DNA 抽出	p.7
	2. 細菌からの DNA 抽出	p.8
	3. 酵母からの DNA 抽出	p.9
	4. 放線菌及びカビからの DNA 抽出	p.9
IX	参考文献	p.10

I 製品説明

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

Solution II の主成分である塩化ベンジルによって、細胞壁、細胞膜及び核膜等が破壊され、界面活性剤の存在下で可溶化するため、特に植物の場合、grind することなく DNA を抽出することができる。従って、多数のサンプルを処理する際には大変便利である。双子葉植物はもちろん単子葉植物からも前処理なしで DNA を抽出でき、得られた DNA はそのまま 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)
Solution I	: Extraction Buffer*	30 ml
Solution II	: Lysis Buffer	15 ml
Solution III	: Sodium Acetate (pH5.2)	15 ml
TE(pH8.0)	: 10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA	10 ml
RNase A	: 1 mg/ml	100 μ l

* 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、37°C 程度の湯浴にて結晶を完全に溶解させてから使用してください。

また、Solution I にはタンパク質変性剤等が含まれているので、取扱いに注意してください。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洗い流してください。

III 保存

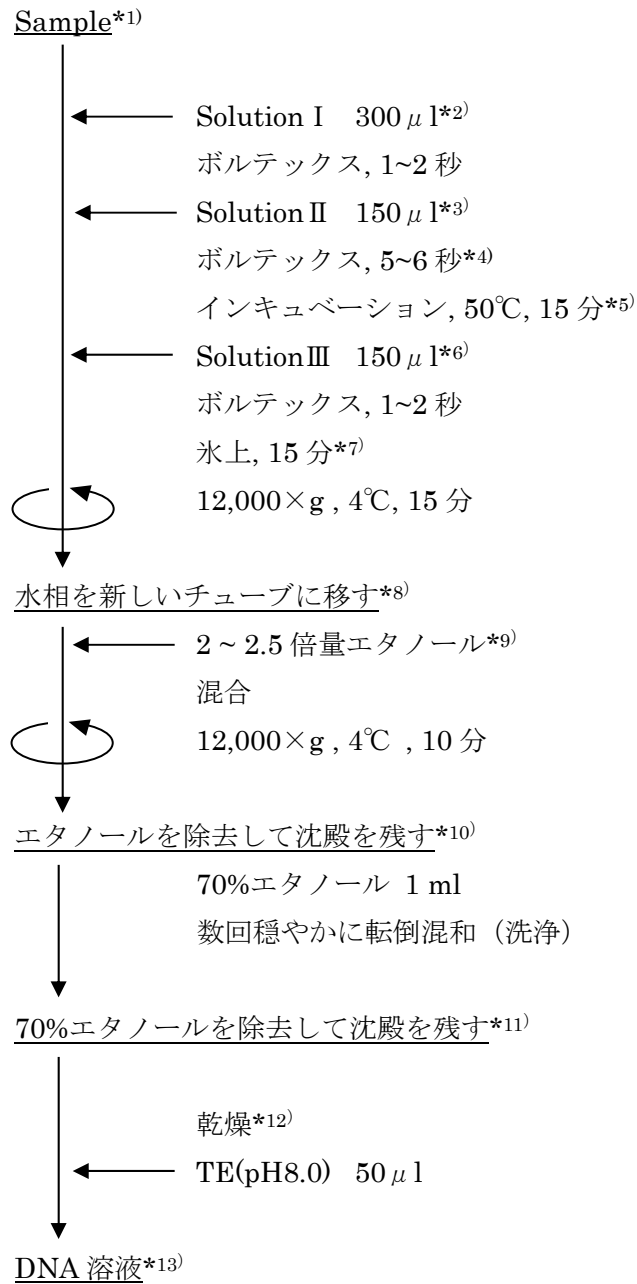
冷蔵保存 (2~10°C)

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°C) 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 (www.nippongene.com)にてご覧になれます。



- *1) 植物の場合 0.01~0.1 g をはさみで 3~5 mm 角に切って使用する。植物の種類によって体積が異なるが、Solution II を入れた際、下層(Solution II)に試料が完全に浸るようにした方が良い。また、できるだけ新鮮な試料を用いるようにする。凍結保存でも長時間にわたる場合には、DNA の回収率が低下することがある。酵母、細菌等の場合には、1.5 ml culture を遠心して得られた沈殿(~0.03 g)を用いる。
- *2) Solution I には SDS が含まれているので、低温で保存すると白い結晶が現れることがある。このような場合には 37°C 程度の湯浴にて完全に溶解させてから使用する。
- *3) 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)
- *4) ボルテックスすることにより、白濁が起こる。
- *5) 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(界面活性剤を含んでいる Solution I) 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。
- *6) Solution III を入れることにより、白濁が起こる。
- *7) 氷冷することにより白濁がすすむ。
- *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、再度遠心を行い、水相のみを採取する。DNA の物理的切断を防ぐため、ピペットチップの先端はカットして使用する。
- *9) PCR や制限酵素反応がうまくいかない場合には、エタノール沈殿を 2 回行うと改善されることがある。エタノール沈殿を行う際には、-20°C に冷却したエタノールを使用し、添加後ただちに遠心する。-20°C での静置を長時間行った場合、夾雑物が沈殿する原因となる。
- *10) DNA の沈殿は目に見えないことがある。試料の種類により、DNA 以外の沈殿が生じることがある。例えば、イネの場合には茶色の沈殿、ホウレンソウの場合には DNA と異なる白い結晶状の沈殿が生じることがある。
- *11) DNA 沈殿が浮き上がった場合は、簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集めて、ゆっくりと 70%エタノールを除去して沈殿を残す。
- *12) 沈殿を完全に乾燥すると非常に溶解しにくくなるので、乾燥しすぎないように注意する。
- *13) DNA 以外の沈殿があった場合(*10参照)、DNA とともに TE に溶解させて使用する。溶解しない場合には、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。なお、沈殿に茶色い着色が認められる場合には、p.6 VI トラブルシューティングを参照する。DNA 溶液中の RNA を除く場合は、添付の RNase A を 1 μ l (終濃度 10~20 μ g/ml になるように) 加えて、37°C にて 30 分反応させる。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。

VI トラブルシューティング

ト ラ ブ ル	対 策
○ Solution I に白い結晶が現れる。	● 37°C程度の湯浴にて、完全に溶解してから使用する。
○ エタノール沈殿後の遠心で、DNA が茶色く着色している。PCR に対する影響はあるか。	● 沈殿物に茶色い着色が認められる場合には、植物に多く含まれるポリフェノールが混入していることが考えられる。この物質は PCR を阻害するが、予め Solution I に 2-Mercaptoethanol を終濃度 2%になるよう加えることで緩和されることがある。
○ マメ科に植物のような糖を多く含む試料を用いた場合、ゼラチン状(透明)の DNA 沈殿が得られた。	● ゼラチン状の DNA を TE または H ₂ O にて溶解する。この溶解液の 1/2 容量の high-salt precipitation solution* を添加してよく攪拌した後、high-salt precipitation solution と同量のイソプロパノールを添加後、攪拌してイソプロパノール沈殿を行う。添加するイソプロパノールは、冷却の必要はない。添加後、直ちに 10k×g, 15 分遠心して DNA 沈殿を得る。 *high-salt precipitation solution 組成：1.2M NaCl , 0.8M Sodium citrate
○ 収量が少ない。	● できるだけ新鮮な試料を使用する。 ● 試料を細かく刻む。(3 mm 角よりも小さくする) ● スケールアップする。 ● 50°Cのインキュベーション中に数回転倒混和する。
○ 得られた DNA 溶液に多量の RNA が混入している。	● 得られた DNA 溶液に、添付の RNase A を 1 μl(終濃度 10~20 μg/ml になるように)加え、37°Cにて 30 分反応させる。
○ 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。	● エタノール沈殿を 2 回行うと改善されることがある。この際には、-20°Cにて冷却したエタノールを使用し、直ちに遠心する。

VII Q&A

- Q1. 植物試料の場合、Solution II を加えても試料の形態が変化しないのですが。
- A1. 通常のプロトコール通りに処理を行った場合、変化は目で確認できないが、Solution II に浸して長時間放置しておく、と、形態が変化してくる。しかし、この状態まで処理を行った場合、最終的に得られる DNA 溶液中に夾雑物が多くなる可能性がある。
- Q2. 果樹などの固い葉の場合、通常のプロトコールでは DNA の収量が少ないのですが。
- A2. 試料を予め液体窒素で凍結、粉碎しておく、と抽出できる場合がある。
- Q3. 動物の組織・細胞からも DNA 単離はできますか。
- A3. 適していないが、エビからは抽出できることが確認されている。現在本キットを用いて DNA を抽出することが確認されているのは、植物、酵母、細菌、カビ等である。(p.7 VIIIデータ集を参照)

【 植物からの DNA 抽出 】

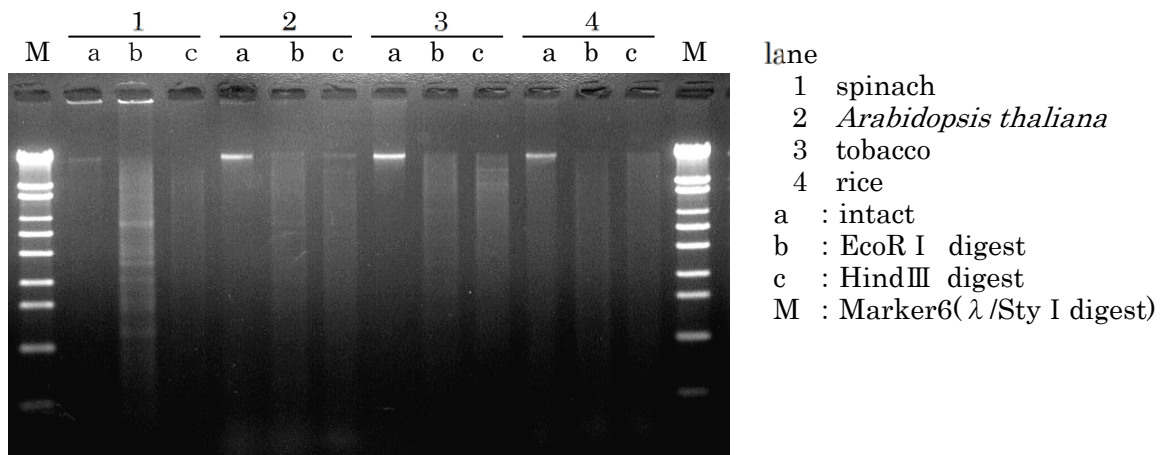
《抽出 DNA の収量と純度》

	ISOPLANT		CTAB*法	
	yield (μ g/g)	A _{260/280}	yield (μ g/g)	A _{260/280}
<i>Arabidopsis thaliana</i>	100-120	1.8	15-30	1.8
spinach	80-120	1.8	30-50	1.8
tobacco	4-20	1.8	60-80	1.7
tulip	10-20	1.8	10-20	1.8
rice	10-20	1.8	10-20	1.7

* CTAB 法 : cetyltrimethylammonium bromide

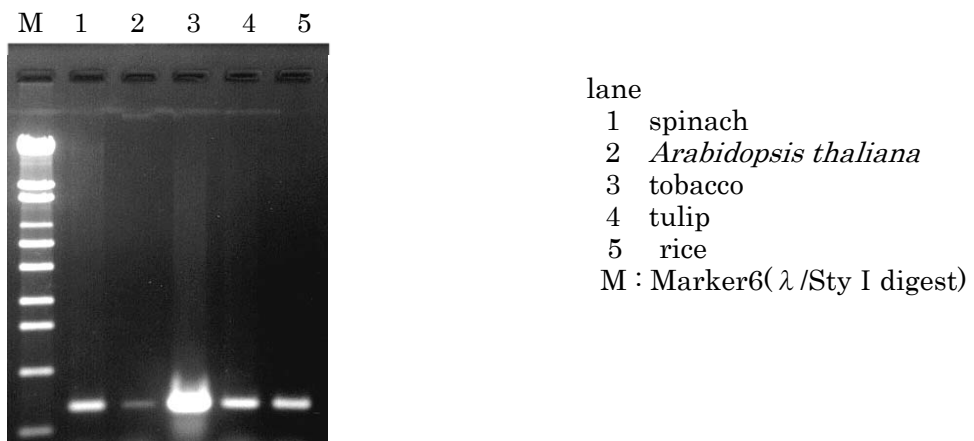
《抽出 DNA の制限酵素反応》

抽出 DNA は、制限酵素 (EcoR I 及び HindIII) で切断できることを確認した。



《抽出 DNA の PCR》

抽出 DNA を鋳型として、tobacco ribulose-1,5-diphosphate carboxylase large subunit gene を増幅するプライマーを用いた PCR にて、特異的なバンドを増幅できることを確認した。



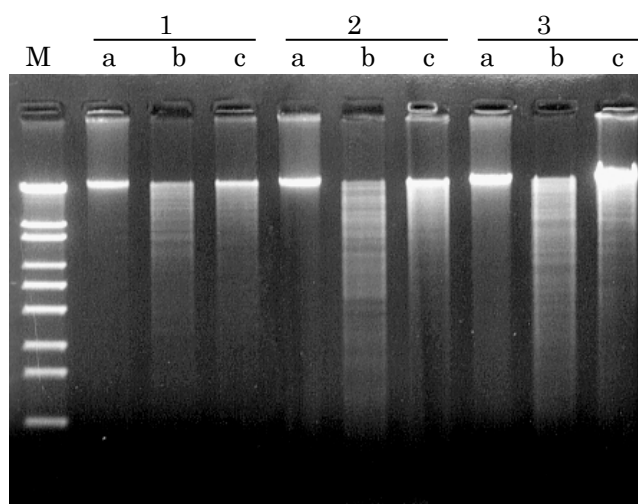
【 細菌からの DNA 抽出 】

《抽出 DNA の収量と純度》

	ISOPLANT		phenol/chloroform 法	
	yield (μ g/g)	A _{260/280}	yield (μ g/g)	A _{260/280}
<i>Anabaena variabilis</i>	125 – 500	1.8	60 – 500	1.7
<i>Bacillus amyloiquefaciens</i>	250 – 500	1.8	1000	1.8
<i>Bacillus subtilis</i>	100	1.8	—	—
<i>Escherichia coli</i>	125 – 500	1.8	250	1.8
<i>Haemophilus influenzae</i>	250 – 1000	1.8	250	1.7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80 – 125	1.8	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	1.9	125	1.7
<i>Thermus aquaticus</i>	500	1.8	500	1.7
<i>Xanthomonas holcicola</i>	100	1.8	500	1.7

《抽出 DNA の制限酵素反応》

抽出 DNA は、制限酵素 (EcoR I 及び HindIII) で切断できることを確認した。



lane

- 1 *Escherichia coli* JM109
- 2 *Staphylococcus aureus* 3A
- 3 *Pseudomonas aeruginosa*

a : intact

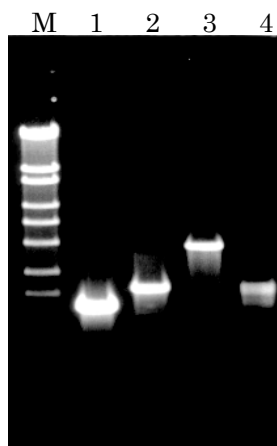
b : EcoR I digest

c : HindIII digest

M : Marker6 (λ /Sty I digest)

《抽出 DNA の PCR》

抽出 DNA を鋳型とした PCR にて、特異的なバンドを増幅できることを確認した。



lane

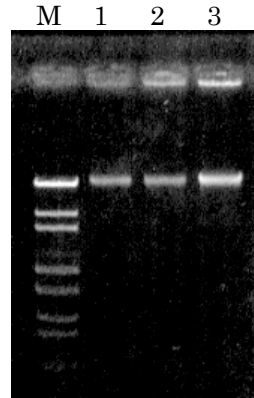
- 1 *Escherichia coli* JM109
- 2 *Bacillus amyloiquefaciens*
- 3 *Bacillus subtilis*
- 4 *Staphylococcus aureus* 3A

M : Marker6 (λ /Sty I digest)

【酵母からの DNA 抽出】

《抽出 DNA の収量と純度》

	yield(μ g/mg)	A _{260/280}
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.504	1.83
<i>Shizosaccharomyces pombe</i>	0.348	1.79
<i>Phichia pastoris</i>	2.523	1.87



lane

- 1 *Saccharomyces cerevisiae*
- 2 *Shizosaccharomyces pombe*
- 3 *Phichia pastoris*

M : Marker6 (λ /Sty I digest)

【放線菌及びカビからの DNA 抽出】

《抽出 DNA の収量と純度》

	yield (μ g/g)	A _{260/280}
<i>Mycobacterium phlei</i>	10.8	1.79
<i>Nocardia asteroides</i>	21.2	1.92
<i>Streptomyces albus</i>	3.3	2.22
<i>Streptomyces</i> sp.2-1	0.8	2.00
<i>Streptomyces</i> sp.MY-31	8.0	2.09
<i>Neurospora sitophila</i>	34.8	1.73
<i>Rhizopus nigricans</i>	23.0	2.04
<i>Penicillius chrysogenum</i> Q176	32.8	1.80
<i>Aspergillus awamori</i>	36.1	1.62
<i>Aspergillus japonicus</i>	20.5	1.90
<i>Aspergillus niger</i>	36.0	1.73
<i>Aspergillus oryzae</i>	6.8	2.04

IX 参考文献

- 1) Anil K. Jhingan, *Methods in Molecular and Cellular Biology*, **3**, 15 (1992)
- 2) Heng Zho, *Nucleic Acids Research*, **21**(22), 5279 (1993)

・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。