

製品コード 9194

研究用

TAKARA

Plant DNA Isolation Reagent

説明書

v201711Da

Plant DNA Isolation Reagent は、塩化ベンジル法をベースにした Ready-to-use な試薬で、植物からゲノム DNA を簡易的に抽出するために使用します。塩化ベンジルはセルロースなどの細胞壁成分の水酸基をベンジル化し、細胞壁を破壊する効果を持つことが知られています。本製品ではこの効果を利用することで、植物サンプルを凍結融解後、ピペットチップの先などで数回チューブ壁に押しつける操作を行うだけで細胞壁の破壊が可能です。従来植物からの核酸抽出時に必要とされてきた液体窒素中での乳鉢を用いた粉碎処理を省略することができるため、乳鉢や乳棒を準備する必要がなく、一度に多数のサンプルを処理する場合にたいへん便利です。さらに、試薬組成の改良により熱処理時間はわずか 15 分間のみとなり、水層回収までの操作は約 30 分間で終了します。得られたゲノム DNA は PCR、制限酵素処理反応に利用できます。

I. 内容 (100 回用)

Extraction Solution 1	40 ml
Extraction Solution 2	8 ml
Extraction Solution 3 (100% Benzyl Chloride)	15 ml

II. 保存

室温

Extraction Solution 2 は低温で保存すると析出する場合があります。析出物が生じた場合は 50℃で溶解後、室温に戻してご使用ください。

※ 適切に保存した場合、未開封であれば 2 年間安定です。開封後はコンタミネーションに注意して、なるべく早めにご使用ください。

III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器

- ・ イソプロパノール
- ・ 70% エタノール
- ・ TE Buffer
- ・ RNase A (必要に応じて使用)
- ・ マイクロピペット
- ・ マイクロピペット用チップ
- ・ 1.5 ml マイクロチューブ
- ・ マイクロ遠心機 (12,000 rpm の遠心が可能なもの)
- ・ ウォーターバス (50℃で使用可能なもの)
- ・ 卓上遠心機
- ・ ボルテックスミキサー

IV. 使用上の注意

Extraction Solution 3 の構成試薬である塩化ベンジルは、消防法危険物 第 4 類引火性液体 第二石油類 危険等級 II に指定されています。添付の製品安全データシート (SDS) をご参照の上、取り扱いには十分ご注意ください。

V. 操作

<操作フロー>

植物組織をはさみ等で 3 mm 角以下にカットし重量を測定した後、 -20°C で凍結する。
(10 ~ 100 mg の植物組織 / 1.5 ml マイクロチューブ)

凍結した植物組織を室温で 5 分ほど放置し、融解させる。

スピンドウンした後、ピペットチップの先端でチューブの底に植物組織を 10 回程度押しつける。

← Extraction Solution 1 400 μl

ボルテックス (最大回転数) : 5 秒
スピンドウン

← Extraction Solution 2 80 μl

ボルテックス (最大回転数) : 5 秒
スピンドウン

← Extraction Solution 3 150 μl

ボルテックス (最大回転数) : 5 秒
スピンドウン

50 $^{\circ}\text{C}$ インキュベート : 15 分

 12,000 rpm、15 分、4 $^{\circ}\text{C}$

水層 (上層) を新しいチューブに移す。

← 水層と等量のイソプロパノールを添加し、ゆっくりと混和。

 12,000 rpm、10 分、4 $^{\circ}\text{C}$

上清を除去後、1 ml の 70% エタノールで沈殿を洗う。

 12,000 rpm、3 分、4 $^{\circ}\text{C}$

上清を除去後、沈殿を乾燥させ、適当量 (約 20 μl) の TE Buffer で溶解する。

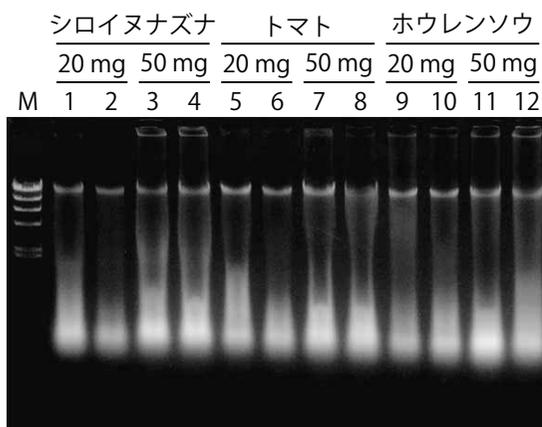
<プロトコール>

1. 植物組織をハサミ等で 3 mm 角以下にカットし、10 ~ 100 mg の範囲で 1.5 ml マイクロチューブに量り取り、- 20℃にて凍結する。
注) 植物組織のカットに使用するハサミやカッターは、刃の部分に 70% エタノールで拭いてからご使用ください。
 2. 凍結した植物組織を室温で 5 分間ほど放置し、融解させる。
 3. スピンドアウンし、植物組織をチューブの底に集める。
 4. ピペットチップの先端で植物組織をチューブの底に 10 回程度押しつけて、物理的に破碎する。
 5. Extraction Solution 1 を 400 μ l 添加し、最大回転数にてボルテックスを 5 秒行う。チューブの底に植物組織が溜まっている場合は指でチューブの底を弾いて溶液中に浮遊させる。
 6. スピンドアウン後、Extraction Solution 2 を 80 μ l 添加し、最大回転数にてボルテックスを 5 秒行う。Extraction Solution 2 の添加によって白色の沈殿が生じ、ボルテックスを行うことで溶液が白濁する。チューブの底に植物組織が溜まっている場合は指でチューブの底を弾いて溶液中に浮遊させる。
 7. スピンドアウン後、Extraction Solution 3 を 150 μ l 添加し、最大回転数にてボルテックスを 5 秒行う。このとき、チューブの底に植物組織が溜まっている場合は指でチューブの底を弾いて溶液中に浮遊させる。
 8. 2 秒以内で軽くスピンドアウンし、50℃で 15 分間インキュベートを行う。
注) 長時間遠心を行うと Extraction Solution 3 が分離しますので、スピンドアウンは卓上遠心機を使用し、2 秒以内で行ってください。
 9. 水層 (上層) と有機層 (下層) を分離するため、12,000 rpm、4℃で 15 分間遠心する。
 10. 有機層 (下層) や植物組織の残渣が出来るだけ混入しないように注意して水層 (上層) を回収し、新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。水層は約 400 μ l 回収できる。
 11. 回収した水層と等量のイソプロパノールを添加し、ゆっくりと混和する。
注) この状態で長時間保存すると、夾雑物が沈殿する原因になりますので、速やかに次のステップに進んでください。
 12. 12,000 rpm、4℃で 10 分間遠心する。
 13. 沈殿を吸わないように注意しながら、上清を除去する。
注) 沈殿が確認されない場合もあります。
 14. 1 ml の 70% エタノールを添加し、沈殿を洗う。
 15. 12,000 rpm、4℃で 3 分間遠心する。
 16. 沈殿を吸わないように注意しながら、上清を除去する。
 17. 沈殿を乾燥させ、適当量 (約 20 μ l) の TE Buffer に溶解する。
注) 沈殿を乾燥しすぎると溶解しにくくなるので、ご注意ください。
- ※ 回収した DNA 溶液は、そのまま PCR のテンプレートや、制限酵素切断に用いることが可能です。
20 μ l の TE Buffer で溶解した場合、PCR 反応液 (25 μ l 反応系) や制限酵素反応液 (20 μ l 反応系) に加える DNA 溶液は、0.5 ~ 2 μ l が目安です。
DNA 溶液をすぐに使用しない場合は、4℃に保存してください。

VI. 実験例

【実験例 1：植物組織からの DNA 抽出】

シロイヌナズナの芽生え、トマトの芽生え、ホウレンソウの成葉をはさみで 3 mm 角以下にカットし、それぞれ 20 mg、50 mg 分をマイクロチューブにとり、 -20°C で凍結した後プロトコールに従ってゲノム DNA を抽出した。得られた沈殿を 20 μl の TE Buffer で溶解後、電気泳動および吸光度の測定を行った。(N = 2)



得られたゲノム DNA 溶液のうち、5 μl をアプライ
M： λ -Hind III digest (150 ng 分をアプライ)

1% Agarose L03「TAKARA」

図 1. 植物組織から抽出したゲノム DNA の電気泳動結果

表 1. 植物組織から抽出したゲノム DNA の純度*

	処理量	サンプル No.	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
シロイヌナズナ 芽生え	20 mg	1	2.2	1.4
	20 mg	2	2.2	1.4
	50 mg	3	2.1	1.7
	50 mg	4	2.1	1.7
トマト 芽生え	20 mg	5	2.0	1.4
	20 mg	6	2.0	1.6
	50 mg	7	1.8	1.4
	50 mg	8	1.7	1.4
ホウレンソウ 成葉	20 mg	9	2.2	1.6
	20 mg	10	2.2	1.8
	50 mg	11	2.1	1.8
	50 mg	12	2.0	1.7

*：本プロトコールで抽出したゲノム DNA は RNA を含むため、正確にゲノム DNA の純度を反映するものではありません。

【実験例 2：タバコ BY-2 培養細胞からの DNA 抽出】

湿重量 50 mg のタバコ BY-2 培養細胞をマイクロチューブにとり、PBS 洗浄後、 -20°C で凍結した。ピペットチップの先端で細胞をチューブの壁に押し付ける操作は省略し、プロトコールに従いゲノム DNA を抽出した。得られた沈殿を $20\ \mu\text{l}$ の TE Buffer で溶解後、電気泳動および吸光度の測定を行った。(N = 2)

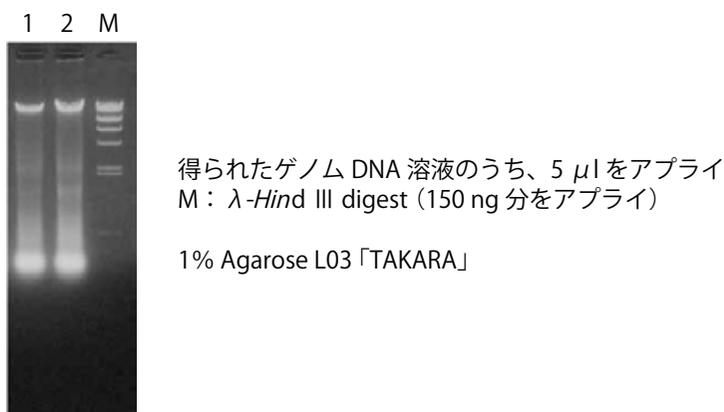


図 2. タバコ BY-2 培養細胞から抽出したゲノム DNA の電気泳動結果

表 2. タバコ BY-2 培養細胞から抽出したゲノム DNA の純度*

	処理量	サンプル No.	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
タバコ BY-2 培養細胞	50 mg	1	2.2	2.1
		2	2.2	2.2

*：本プロトコールで抽出したゲノム DNA は RNA を含むため、正確にゲノム DNA の純度を反映するものではありません。

【実験例 3：抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR】

実験例 1 および実験例 2 で得られたゲノム DNA 溶液を鋳型として、PCR による増幅を行った。

Template : 実験例 1、2 で抽出したゲノム DNA 溶液 各 0.5 μ l
 PCR 酵素 : TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version
 Total volume : 25 μ l

Target 遺伝子と増幅サイズ

シロイヌナズナ MER15B 遺伝子 (約 1.0 kb)
 トマト XET 遺伝子 (約 0.6 kb)
 ホウレンソウ coxI 遺伝子 (約 0.5 kb)
 タバコ EXT 遺伝子 (約 2.2 kb)

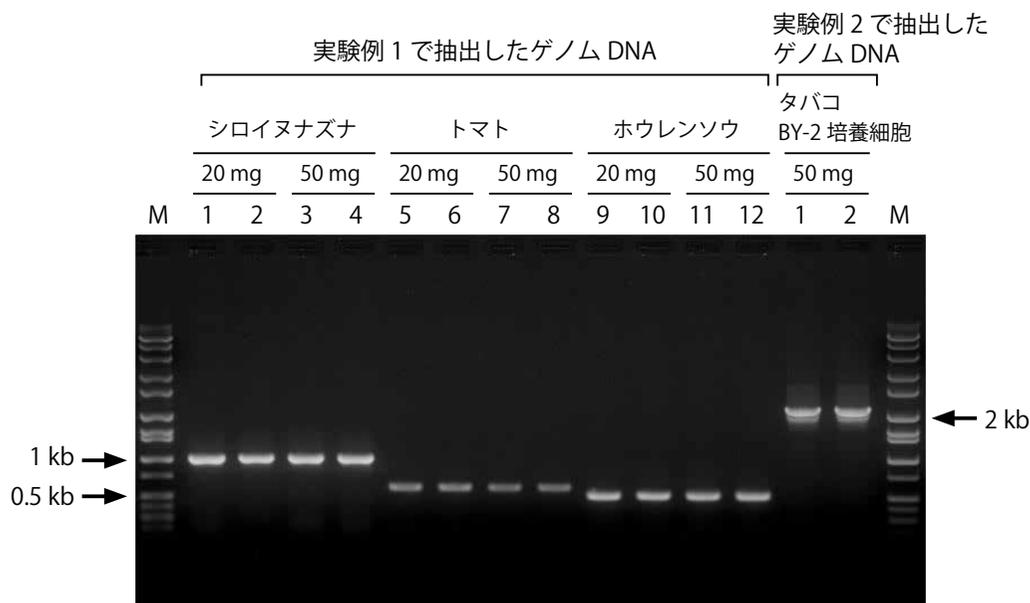
PCR 条件

シロイヌナズナ、ホウレンソウ

98 $^{\circ}$ C 10 sec.
 60 $^{\circ}$ C 30 sec. } 30 cycles
 72 $^{\circ}$ C 1 min./kb

トマト、タバコ

98 $^{\circ}$ C 10 sec.
 55 $^{\circ}$ C 30 sec. } 35 cycles
 72 $^{\circ}$ C 1 min./kb



PCR 反応液 4 μ l をアプライ

M : Wide-Range DNA Ladder (50 ~ 10,000 bp)

1% Agarose L03 「TAKARA」

図 3. 抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR 増幅

【実験例 4：ホウレンソウ（10 mg, 100 mg）からの DNA 抽出】

ホウレンソウの成葉をはさみで 3 mm 角以下にカットし、10 mg、100 mg 分をそれぞれマイクロチューブにとり、 -20°C で凍結した後プロトコールに従ってゲノム DNA を抽出した。得られた沈殿を $20\ \mu\text{l}$ の TE Buffer で溶解後、電気泳動および吸光度の測定を行った。(N = 1)

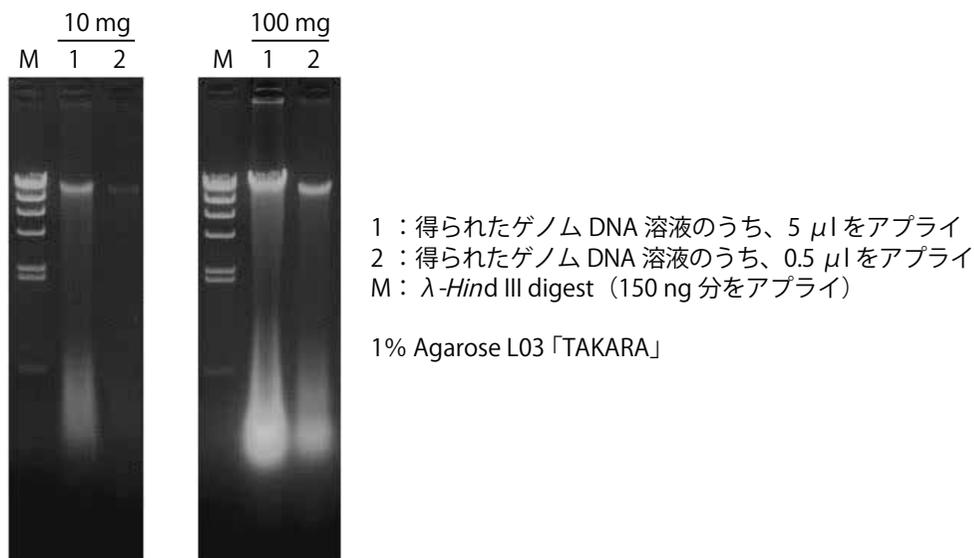


図 4. ホウレンソウから抽出したゲノム DNA の電気泳動結果

表 3. ホウレンソウから抽出したゲノム DNA の純度*

	使用量	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
ホウレンソウ 成葉	10 mg	2.2	1.9
	100 mg	2.1	2.1

* : 本プロトコールで抽出したゲノム DNA は RNA を含むため、正確にゲノム DNA の純度を反映するものではありません。

【実験例 5：抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR 増幅】

シロイヌナズナの幼葉、トマトの幼葉、あるいはホウレンソウの成葉からプロトコールに従って抽出したゲノム DNA 溶液を鋳型として、各酵素の推奨条件で PCR を実施し、電気泳動により増幅バンドを確認した。

ターゲット遺伝子と増幅サイズ：

シロイヌナズナ MER15B 遺伝子（約 1.0 kb）、トマト XET 遺伝子（約 0.6 kb）、ホウレンソウ *cox1* 遺伝子（約 0.5 kb）

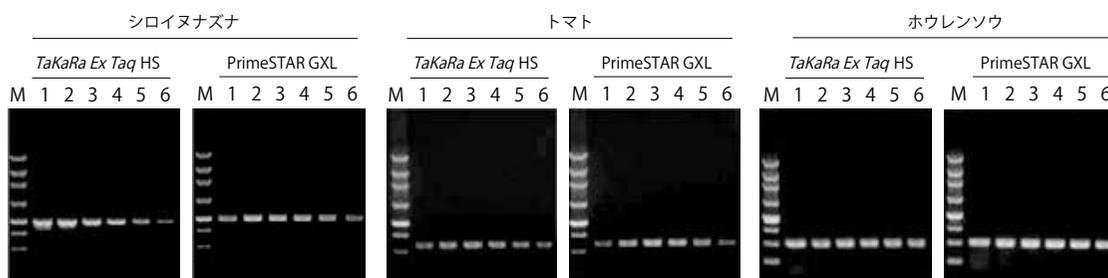
使用量：

ゲノム DNA 抽出液原液または希釈液をそれぞれ 2 μ l/25 μ l 反応系で使用
レーン 1：原液 2：2 倍希釈液 3：5 倍希釈液 4：10 倍希釈液 5：20 倍希釈液
6：40 倍希釈液 M：250 bp DNA Ladder

PCR 酵素：

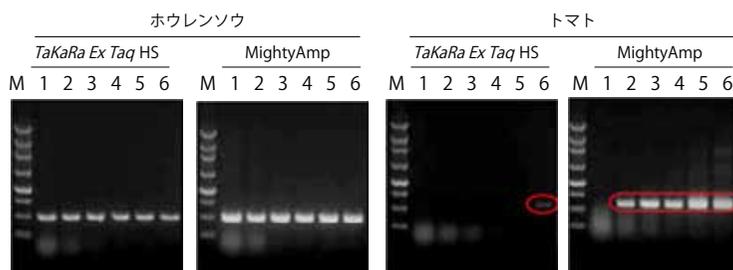
TaKaRa Ex Taq Hot Start Version、PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase、MightyAmp™ DNA Polymerase Ver. 2

(1) 10 ~ 20 mg のサンプルから簡易調製した場合

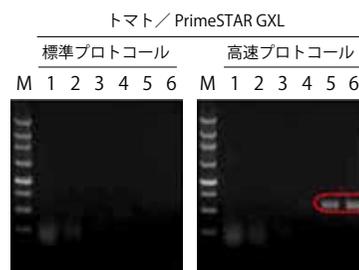


(2) 100 mg のサンプルから簡易調製した阻害物質を多く含む場合

2-1. Mighty Amp による反応性の向上



2-2. 高速プロトコール（GXL）による改善



植物由来の簡易調製ゲノム DNA を鋳型とする場合

- ◆ 反応性を重視する増幅には *TaKaRa Ex Taq* Hot Start Version、MightyAmp DNA Polymerase Ver. 2 を推奨します。

TaKaRa Ex Taq HS は核酸量が多いサンプルでも良好に働きます。

植物由来の PCR 阻害物質を多く含むサンプルの場合、MightyAmp を用いることで反応性がさらに向上します。

- ◆ 正確性を求める増幅には PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を推奨します。

High Fidelity PCR 酵素の多くは核酸量が多いサンプルからの増幅が不得意ですが、PrimeSTAR GXL は核酸量の多いサンプルにも幅広く対応でき、また PCR 阻害物質にも比較的強い特性を有しています。

VII. トラブルシューティング

1. DNA の収量が少ない、DNA が得られない。
 - 植物組織の種類、大きさによって DNA 回収量は変わりますので、初発の組織量を増やしてください。
 - マツ、ツバキ等の固い葉では液体窒素を用いて粉碎することで DNA を抽出できる場合があります。
 - ピペットチップの代わりにエッペンペッスル（チューブ用乳棒）を使用すると収量が上がります。
 - イソプロパノール添加後、または 70% エタノール添加後の遠心時間を延長する（イソプロパノール添加後の遠心 10 分→30 分、70% エタノール添加後 3 分→30 分など）と収量が上がることがあります。
 - 植物組織の保存期間、保存条件で DNA 収量は変わります。出来るだけ新鮮なサンプルを使用してください。

2. PCR で増幅できない。
 - 調製した DNA 溶液は植物由来の PCR 阻害物質を含む場合がありますので、DNA 溶液をさらに希釈し、Template としてご利用ください。
 - 初発の組織量が多すぎる場合が考えられますので、組織量を減らしてください。
 - DNA 溶液が茶褐色に着色したり、ゼラチン状の物質が混入している場合は High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (製品コード 9193) で処理すると PCR 阻害が緩和される場合があります。High-Salt Solution for Precipitation (Plant) は、RNA サンプル調製の試薬ですが、RNA 溶液のかわりに抽出した DNA 溶液を用いてプロトコール通り調製してください。ただし、PCR 阻害がないサンプルに対してこの処理を行うと逆に反応が阻害される場合がありますので、ご注意ください。
 - PCR に使用する酵素は反応性を重視した PCR 反応を行う場合、MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 (製品コード R071A) または *TaKaRa Ex Taq* Hot Start Version (製品コード RR006A) をお勧めいたします。また、正確性を重視した PCR 反応を行う場合は PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (製品コード R050A) をお勧めいたします。

3. 得られた DNA 溶液に RNA が多く混入している。
 - サンプルの種類や状態によっては RNA が十分に除去できない場合があります。その場合は市販されている RNase A を利用して RNase 処理を行ってください。
[RNase 処理プロトコール]
 1. 得られた DNA 溶液に RNase A* を 10 ~ 20 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加する。
 2. 37°C にて 30 分反応させる。
 3. 必要に応じてフェノール/クロロフォルム処理を行う。
 - * : RNase A が粉末の場合は 10 mM Tris-HCl pH7.5、15 mM NaCl を用いて 1 mg/ml 溶液を調製してください。DNase Free のものでない場合、100°C、15 分処理をして、DNase 活性を失活してから使用してください。（溶液になっているもの、DNase free のものも市販されています。）

VIII. 参考文献

Zhu H, Qu F, Zhu LH. : Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Research*. (1993) **21** (22): 5279-5280.

IX. 関連製品

MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.2 (製品コード R071A/B)
TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (製品コード RR006A/B)
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (製品コード R050A/B)
High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (製品コード 9193)
Agarose L03「TAKARA」(製品コード 5003/B)
 λ -*Hind* III digest (製品コード 3403)
Wide-Range DNA Ladder (50-10,000 bp) (製品コード 3415A)

X. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・*TaKaRa Ex Taq*、PrimeSTAR はタカラバイオ株式会社の登録商標です。MightyAmp はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社