



DNA すいすい-L

DS-0006

～DNA 簡易抽出バッファー～

脂質の多い種子向け

取扱説明書

Ver. 1.0

RIZO Inc.

目次

	ページ
本製品の特長	3
内容物	3
保存条件と使用期限	3
使用上の注意	3
その他必要な機器・試薬	4
実験を開始する前の準備	4-5
分析試料からの DNA 抽出プロトコール	6
DNA 抽出プロトコール フローチャート	7
トラブルシューティング	9
実験例	10
お問い合わせ先	裏表紙

本製品の特長

本製品は、落花生種子、アーモンド種子、加工したナッツ類など脂質の多い植物種子*からの DNA 簡易抽出に最適な抽出バッファーです。抽出した DNA はそのまま PCR 反応に使用できます。

*サンプルの状態によっては DNA 自体が分解され、抽出できない場合がございます。

内容物

抽出バッファー 80 mL (約 180 回分)

(注：ご使用前に 10 ml のエタノールを添加して下さい)

添加剤 (粉末) 2 本

添加剤溶解液 10 mL×1 本

DNA 沈殿補助溶液 (注：ご使用前に 60 ml のイソプロパノールを添加して下さい)

保存条件と使用期限

保存条件 冷蔵保存 (4℃) して下さい。

使用期限 添加剤 (添加剤溶解液を混合後) ; 1 カ月*

抽出バッファー ; 開封後 6 カ月

DNA 沈殿補助溶液 ; 調製後 6 カ月

(*溶解後の添加剤は、小分けして冷凍することで長期保存可能です)

使用上の注意

本試薬は研究目的以外にご使用にならないでください。また、分子生物学に関する基本的知識のある方以外は取り扱わないでください

*記載内容や製品仕様、および価格に関しては予告なしに変更する場合がございます。

その他必要な試薬・機器

試薬

イソプロパノール（特級）

99.5% エタノール（特級）

フェノール：クロロホルム（1：1、v/v）*

70% エタノール**

TE（10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0）もしくは
蒸留滅菌水

*結晶フェノールをトリスバッファー（pH 8.0）で飽和させたトリス飽和フェノールに対しクロロホルムを1：1の容積比で混合したものをご利用ください。又は、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール（25:24:1、SIGMA社製 Cat. No. P2069など）でも代用可能です。

**エタノール（分子生物学用）：蒸留滅菌水を7：3の容積比で混合したものをご利用ください。

機器

冷却微量高速遠心機

恒温槽またはインキュベーター（65℃設定が可能な機器）

その他

1.5 ml チューブ

マイクロピペット（1,000 μ l用、200 μ l用）

ピペットチップ

実験を開始する前の準備

①抽出バッファーの準備

抽出バッファー（80 ml）のボトルに10 mlの99.5% エタノール（特級）を加え、ふたを閉めてからよく混合します。調製後は冷蔵（4℃）して下さい。

②添加剤の準備

本製品に添付の添加剤溶解液（青ラベル）5 mlを添加剤（赤ラベル）に入れ、よく混合します*。この調製済み添加剤はDNA抽出の直前に抽出バッファーに添加して使用します。

*調製後の添加剤は、使用期限が1カ月ですのでご注意ください。実験に使用するまで暗所で冷蔵保存（4℃）、もしくは小分けして冷凍保存して下さい。

③DNA 沈殿補助溶液の準備

DNA 沈殿補助溶液のボトルに 60 ml のイソプロパノールを添加し、ふたを閉めてからよく混合します。調製後は冷蔵（4℃）して下さい。

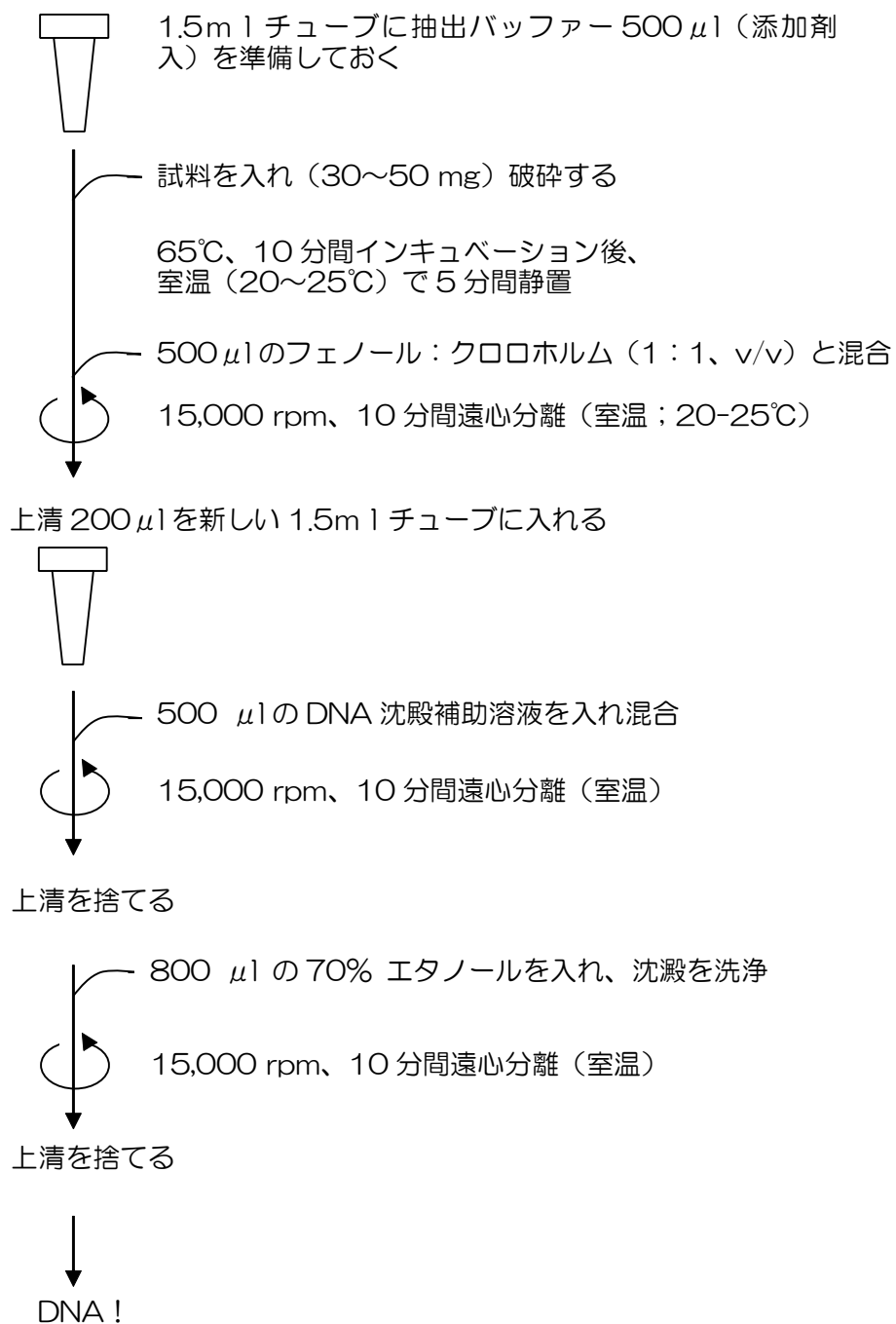
分析試料からの DNA 抽出プロトコール

分析試料 1 検体あたり、450 μ l の抽出バッファート
50 μ l の調製済添加剤を混合し^{注①}、これを分析試料数分ご用意下さい。

1. 新しい 1.5 ml チューブに、500 μ l の添加剤入り抽出バッファールを入れた後^{注②}、30-50 mg の分析試料を加えます^{注③}。
2. マイクロチューブ用ペッスルなど^{注④}で分析試料をホモジナイズします。
3. 65°C で 10 分間静置します。
4. 室温 (20~25°C) で 5 分間静置します。
5. フェノール：クロロホルム (1 : 1、v/v) を 500 μ l 加え、転倒混和します。
6. 15,000 rpm、室温 (20~25°C) で 10 分間遠心分離を行います。
7. 上清 200 μ l を新しい 1.5 ml チューブにとり、DNA 沈殿補助溶液を 500 μ l 添加し、よく混和します。
8. 15,000 rpm、室温で 10 分間遠心分離を行います。
9. 上清を捨て^{注⑤}、70% エタノールを 1,000 μ l 入れ、よく転倒混和し、沈殿の洗浄を行います。
10. 15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離を行います。
11. 上清を捨て、沈殿を乾燥 (風乾) ^{注⑥} します。
12. 50~100 μ l の TE もしくは滅菌水に溶解し^{注⑦}、PCR 反应用試料とします。

***注①~⑦については 6 ページの「注解」をご参照ください。**

DNA 抽出プロトコール フローチャート



注解

注①調製した添加剤は使用直前に抽出バッファーに加え、試料数分ご準備下さい。抽出バッファーに添加剤を加えた後、1日以上経過したものはご使用にならないで下さい。

注②冷凍保存した組織の場合は、解凍しないうちに抽出バッファーへ浸漬して下さい。

注③分析試料を多く入れ過ぎますとDNAの収量の低下や多量の夾雑物持ち込みの原因となり、PCR反応に影響を及ぼす可能性が考えられますので、ご注意ください。

注④1,000 μ l用ピペットチップの先を、アルコールランプやライター等で炙り、先端の穴が閉じたものなどを使用しても十分なホモジナイズが可能です。

注⑤沈澱が流出しないようご注意ください。

注⑥乾燥させすぎるとTEもしくは滅菌水への溶解が困難になります。

注⑦分析試料の生物種や状態、PCR反応系の違いにより最適量が異なりますので、それぞれの分析試料に合わせて適宜、調製して下さい。

本プロトコールは、微量サンプルからのDNA簡易抽出用に考案されています。

トラブルシューティング

問題	考えられる原因	対策
DNA の収量が低い。	試料のホモジナイズが不十分である可能性が考えられます。	試料をできるだけ丁寧にホモジナイズして下さい。
	試料から本製品（抽出バッファ）への DNA 抽出が不十分である可能性が考えられます。	本製品と共に試料をホモジナイズした後、よく転倒混和を行ってから次の操作に移ってください。
DNA 沈殿補助溶液添加後に多量の白色沈殿が生じ、70%エタノールによる洗浄後も残存している。	分析試料に多量のタンパク質や脂質が含まれている可能性が考えられます。	DNA 抽出プロトコルの「6」の後に上清と等量のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール（SIGMA 社製 Cat. No. P2069 など）を再度加え、ボルテックス等で攪拌後、15,000 rpm、室温（20～25℃）で 10 分間遠心分離を行ってください。上清を回収し、プロトコル「7」以降の操作を引き続き行ってください。

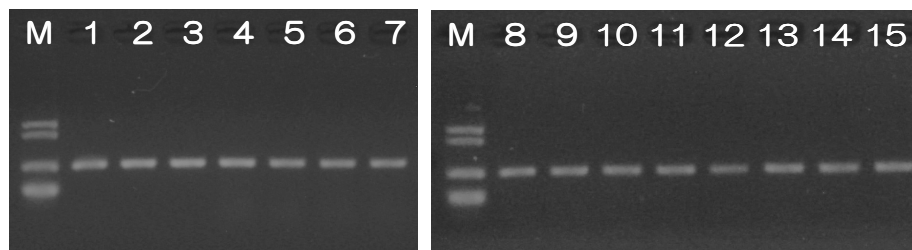
実験例

脂質の多い植物種子を用いた実験

本製品を使用して DNA 簡易抽出を行い、18S rRNA 遺伝子検出用プ

ライマー対* (200 bp が増幅) を使用して PCR を行いました。

*植物全般のゲノム DNA を増幅するプライマーです。配列についてはお問い合わせください。



3.0% Agarose

M: Marker(上から ; 500 bp、400 bp、200 bp、100 bp)

- | | |
|-----------------|----------------------|
| 1 落花生 (種子) | 10 ピスタチオ (焙煎、塩味) |
| 2 大豆 (種子) | 11 マカダミアナッツ (焙煎、塩味) |
| 3 レンズ豆 (種子) | 12 クルミ (焙煎、塩味) |
| 4 アボカド (種子) | 13 カシューナッツ (焙煎、塩味) |
| 5 ヒマワリ (種子) | 14 ピーナッツバター |
| 6 菜の花 (種子) | 15 ジャイアントコーン (揚げ、塩味) |
| 7 ゴマ | |
| 8 アーモンド (焙煎、塩味) | |
| 9 ピーナッツ (焙煎、塩味) | |

(約 50 mg の組織から DNA 抽出を行いました。)

(PCR 反応系)

Buffer	1 ×
dNTPs	0.2 mM
MgCl ₂	2 mM
Primer	0.5 μM
DNA*	20 ng
Taq ポリメラーゼ	0.6U
Total	15 μl

(PCR 条件)

95°C 2 min.	} 35 cycles
94°C 30 sec.	
54°C 30 sec.	
72°C 60 sec.	
72°C 7 min.	

*DNA 抽出液を 20 ng/μl に調製したものを使用。

DNAすいすいーL

お問い合わせ先

株式会社リーゾ

研究部

茨城県つくば市天久保 2-9-2-B201

電話 ; 029-852-9351 FAX ; 020-4623-5611

E-mail ; info@rizo.co.jp

ホームページ ; <http://www.rizo.co.jp/>

担当 ; 宮川

Copyright ©2010-2011 RIZO Inc. All Right Reserved.