



DNA すいすい -W

DS-0009

～DNA 簡易抽出バッファー～

木材・乾燥した植物組織向け

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
分析試料からの DNA 抽出プロトコール	5
DNA 抽出プロトコール フローチャート	6
トラブルシューティング	8
実験例	9-10

本製品の特長

本製品は、木材など乾燥した植物組織からのDNA簡易抽出に最適な抽出バッファーです。精製カラム等を使用しないので低コストのDNA簡易抽出が可能です。

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・加工度によっては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 (DNA すいすい-W) 85 mL (約 110 回分)

添加剤 (粉末) 2 本

添加剤溶解液 10 mL × 1 本

抽出補助剤 5 mL × 2 本

保存条件と使用期限

保存条件 抽出バッファー、添加剤、添加剤溶解液は冷蔵保存 (4℃) して下さい。

抽出補助剤は室温 (20-25℃) で保存*して下さい。

使用期限 抽出バッファーおよび抽出補助剤；開封後 6 カ月

添加剤；添加剤溶解液を添加剤に混合してから 1 カ月

*冬季に低温 (およそ 15℃以下) になりますと成分が析出する場合がございますが、このような場合は 30-40℃でインキュベーションを行い、析出物が溶解するのを確認してからご使用下さい。析出したことが製品の品質に影響を与えることはございませんので、ご安心ください。

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

ご注意；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）

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

*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

微量高速遠心機

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

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。

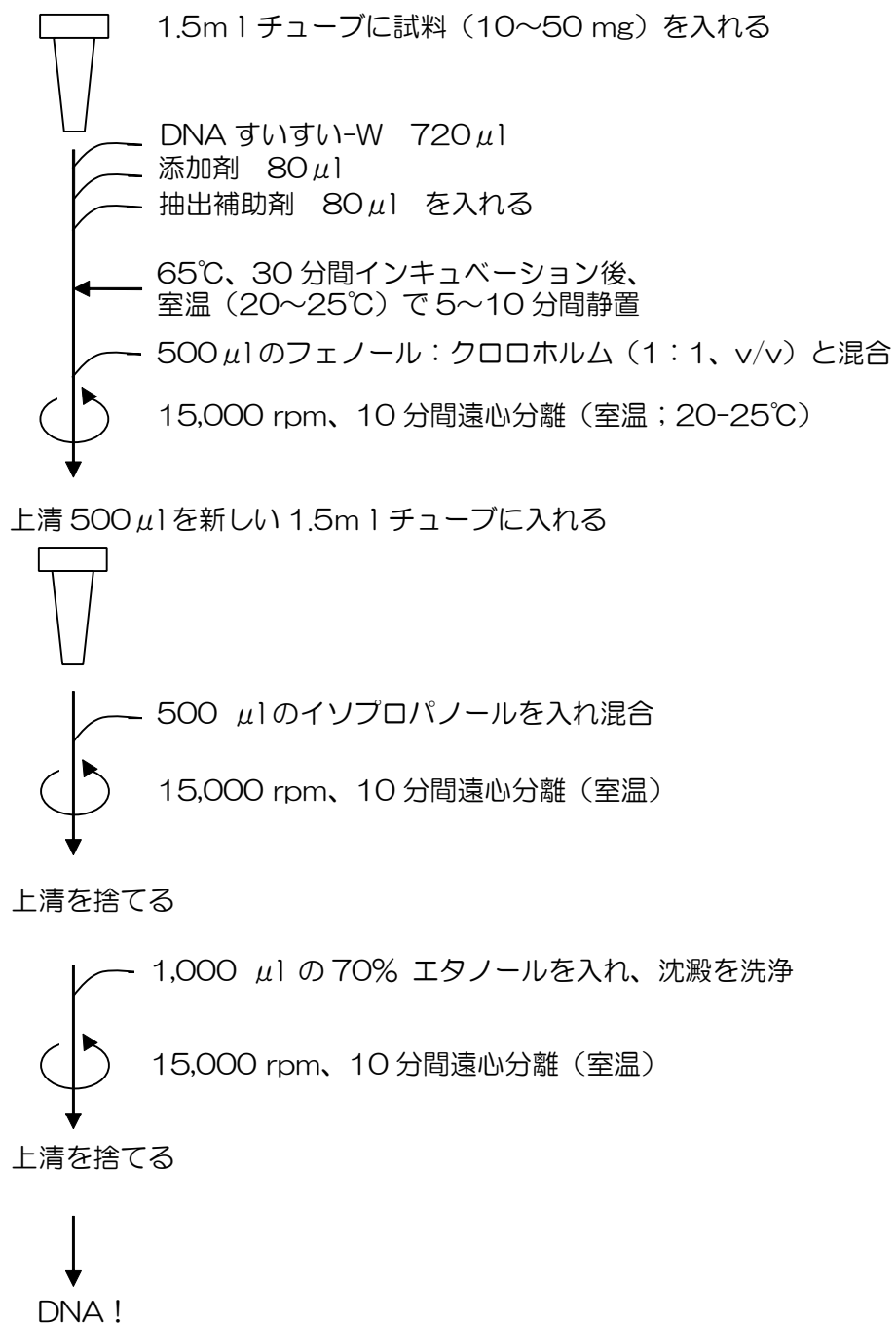
*調製後の添加剤は、使用期限が1カ月ですのでご注意ください。実験に使用するまで暗所で冷蔵保存（4℃）して下さい。

分析試料からの DNA 抽出プロトコール

1. 試料 10-50 mg^{注①}を、新しい 1.5 ml チューブに入れておきます。
2. 上記 1.5 ml チューブに、720 μ l の DNA すいすい-W、80 μ l の添加剤、80 μ l の抽出補助剤を入れ試料とよく混合します^{注②}。
3. 65°C で 30 分間インキュベーション^{注③}を行った後、室温で 5～10 分間静置します^{注④}。
4. 冷蔵（4°C）しておいたフェノール：クロロホルム（1：1、v/v）を 500 μ l 加え、転倒混和します^{注⑤}。
5. 15,000 rpm、室温（20～25°C）で 10 分間遠心分離を行います。
6. 上清 500 μ l を新しい 1.5 ml チューブにとり、イソプロパノールを 500 μ l（上清と同量）添加し、よく混和します。
7. 15,000 rpm、室温で 10 分間遠心分離を行います。
8. 上清を捨て^{注⑥}、70% エタノールを 1,000 μ l 入れ、沈澱の洗浄を行います。
9. 15,000 rpm、室温で 10 分間遠心分離を行います。
10. 上清を捨て、沈澱を乾燥（風乾）^{注⑦}します。
11. ～50 μ l の TE もしくは滅菌水に溶解し^{注⑧}、PCR 反应用試料とします。

***注①～⑧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植物組織をカッターやハサミ等で細かくカットして下さい。試料が細かい方がDNAの抽出効率が上がります（木材の場合；カッターで鉛筆を削り出した時に生じる木くずのような状態、あるいは、のこぎりで木材を切り出す際に生じるおがくずのような状態が理想的です）。

注②添加剤と抽出補助剤は使用直前にDNA すいすい-W に加え、試料数分ごとに準備して下さい。抽出補助剤をDNA すいすい-W に加えますと白色の析出物が生じますが、そのまま操作を行って下さい。

注③インキュベーションの途中（インキュベーションを開始して15分後位が目安）で、チューブを転倒混和しますとより効果的です。

注④放熱を行っています。直ちに4. の操作を行いますとフェノール・クロロホルムがチューブの蓋との隙間から液漏れを起こし、大変危険ですのでご注意ください。

注⑤ゴム手袋など着用して行って下さい。

注⑥沈澱が流出しないようご注意ください。

注⑦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⑧分析試料の品種や状態、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。

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。	木材など硬さのある試料はカッター等を使用し、破片が薄く、細くなるように削り出して下さい。木くずのような状態が理想的です。
		<p>イグサなど比較的柔らかい試料は、ハサミで 2-3 mm に細かくカットして下さい。さらに DNA 収量を上げるには、1,000 μl 用ピペットチップの先*など使用して、400 μl 程度の抽出バッファと共に試料をホモジナイズすると効果的です。最終的にプロトコールに記載のバッファ組成になるよう各試薬を添加し、よく混合後、以降の操作を行って下さい。</p> <p><small>*ピペットチップの先端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を利用すると便利です。</small></p>
イソプロパノール添加後に多量の白色沈澱が生じ、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 抽出プロトコールの「4」および「5」の操作をさらに繰り返し、タンパク質や脂質の除去を行ってください。

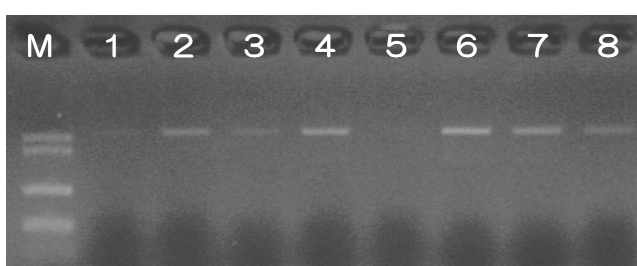
実験例

木材や乾燥した植物組織を用いた実験

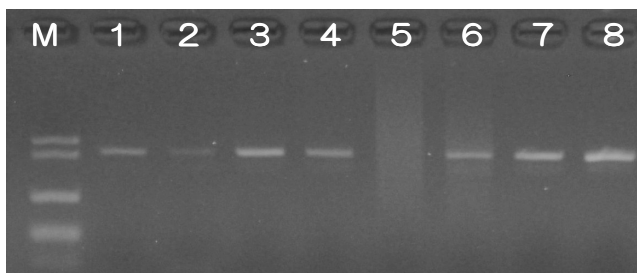
本製品を使用して木材、その他乾燥した植物組織からDNA簡易抽出を行い、増幅産物の長さが異なる3種類の18S rRNA遺伝子検出用プライマー対（500 bp、400 bp、214 bpが増幅）を使用しPCRを行いました。

(PCR反応結果)

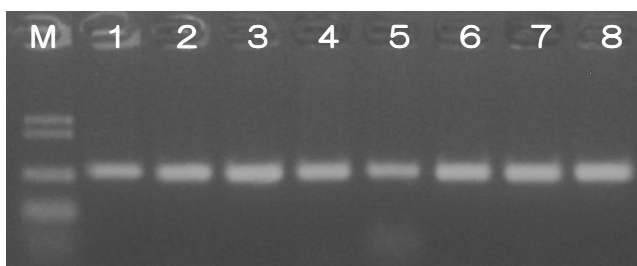
<18S rRNA 遺伝子 500 bp>



<18S rRNA 遺伝子 400 bp>



<18S rRNA 遺伝子 214 bp>



3.0% Agarose
M: Marker (上から 500 bp、400 bp、200 bp、100 bp)

- | | |
|-----------------|----------|
| 1. レッドメランチ (木材) | 5. つまようじ |
| 2. わりばし | 6. 籾殻 |
| 3. 竹わりばし | 7. イグサ |
| 4. 鉛筆 | 8. 緑茶葉 |

*1.~7.は約 30 mg の試料から、8.は約 10 mg の試料から DNA 簡易抽出を行いました。8.以外の試料はカッター等を使用して削るなどし、破片が細くなるように調製しました。

増幅産物の長さが異なる3種類の18S rRNA 遺伝子検出用プライマー対（500 bp、400 bp、214 bp が増幅）を使用して PCR 反応を行った結果、増幅産物が最長の 500 bp プライマーセットでは試料によって増幅が認められない場合がありますが、214 bp プライマーセットではいずれの試料においても増幅が確認できました*。

* 試料の加工度や状態によって試料に含まれるゲノム DNA の分解度が異なり、このことが各プライマーセットにおける増幅に影響を及ぼしたものと思われます。上記検討実験では増幅産物が短いプライマーセットの方が良好な増幅効率を示しました。

(PCR 反応系)

Template DNA	20 ng
1×Buffer	
dNTPs	0.2 mM
primer	0.5 μM
Taq polymerase*	0.6U
Total	15 μl

*Stratagene Paq5000 を使用

(PCR 条件)

95°C 2 min.
94°C 30 sec. } 35 cycles
55°C 30 sec. }
72°C 60 sec. }
72°C 7 min.

DNAすいすいーW

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 ©2011 RIZO Inc. All Right Reserved.