

GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit

ユーザーガイド

SIGMA-ALDRICH®

製品番号

G2N10, G2N70, G2N350

注文情報

製品番号	製品概要	容量
G2N10	GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit	10回分
G2N70	GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit	70回分
G2N350	GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit	350回分

製品の再注文はお近くの弊社販売代理店にて承
っています。

GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit

目次

製品概要	2
注意事項と免責事項	3
保存方法と安定性	3
使用前の準備	3
手順	3
結果	5
参考文献	5
トラブルシューティングガイド	6
経験者向けプロトコル	9

製品概要

GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kitは、様々な植物からDNAを精製するための簡便なキットです。本キットはシリカによる結合とマイクロスピinn方式を利用しているため、高価なレジンや、フェノールやクロロホルムなどの有害な有機物質、RNaseによる処理の工程を必要としません。

最大で100 mgの新鮮な組織または10 mgの凍結乾燥したサンプルから、1時間以内に数マイクログラムのDNAを得ることができます。20 kb以上のDNAを精製することができ、得られたDNAは制限酵素による切断やPCR†など、高感度な後の分析に使用することができます。

付属する試薬	製品番号	G2N10 10回分	G2N70 70回分	G2N350 350回分
Lysis Solution Part A	L7910	4 mL	30 mL	140 mL
Lysis Solution Part B	L8035	1 mL	4 mL	20 mL
Precipitation Solution	P9727	1.5 mL	11 mL	50 mL
Binding Solution	B2177	8 mL	60 mL	280 mL
Column Preparation Solution	C2112	7 mL	60 mL	225 mL
Wash Solution Concentrate	W3011	4 mL	30 mL	140 mL
Elution Solution (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH approx. 8.0)	T7688	3 mL	20 mL	100 mL
GenElute Filtration Columns in Tubes	C9346	10個	70個	5 x 70個
GenElute Nucleic Acid Binding Columns in Tubes	C9471	10個	70個	5 x 70個
Collection Tubes, 2.0 mL capacity	T7813	3 x 10個	3 x 70個	15 x 70個

キットの他にご用意いただく試薬および機器

- 小型の乳鉢と乳棒
- 液体窒素
- マイクロ遠心チューブ
- マイクロ遠心機*
- RNase A Solution、製品番号R4642
- Ethanol, 95%または100%、製品番号E7023、E7148、または459836
- Molecular Biology Reagent Water、製品番号W4502
- 65°Cのウォーターバス

*注意：全てのチューブを正しくセットできるよう、24本チューブ用ローターをご使用ください。36本チューブ用ローターをご使用の場合は、1箇所ずつ間隔を空けてサンプルを配置してください。

注意事項と免責事項

GenEluteTM Plant Genomic DNA Miniprep Kitは試験研究用製品です。医薬品、家庭での使用など試験研究用以外の用途には使用できません。Lysis Solution[Part A]とBinding Solutionには、有害なチオシアノ酸グアニジンが含まれています。Column Preparation Solutionには刺激性があります。皮膚に触れないようにしてください。本キットに含まれる試薬を取り扱う際には、手袋、安全眼鏡や適切な保護服を着用してください。危険性と安全な取り扱いについては安全性データーシート(MSDS)をご覧ください。

保存方法と安定性

本キットは室温で保存してください。保管中に、キットの試薬に沈殿が生じた場合には、沈殿が溶けるまで55~65°Cで温めてください。

使用前の準備

1. 試薬を十分に混和します。

試薬に沈殿が見られないか確認してください。試薬に沈殿が生じている場合は、55~65°Cで沈殿が溶解するまで加温し、室温まで冷却してからご使用ください。

2. ウォーターバスを65°Cに予め温めてください。

3. Wash Solutionを調製します。

Wash Solution Concentrateを、G2N10(10回分キット)の場合は9.5mL、G2N70(70回分キット)の場合は72mL、G2N350(350回分キット)の場合は330 mLの95~100%エタノールで希釈してください。

エタノールの蒸発を防ぐため、希釈したWash Solutionのキャップは必ず締めてください。

4. Elution Solutionを65°Cに予め温めてください。

手順

1. 細胞を破壊します。

適当な乳鉢と乳棒を使用して、液体窒素中で植物組織を粉末にしてください。粉末にしたサンプルの最大100 mgをマイクロ遠心チューブに移してください。サンプルは氷上に置いて直ちに使用するか、もしくは-70°Cで保存してください。

2. 細胞を溶解します。

350 μLのLysis Solution[Part A]と50 μLのLysis Solution[Part B]を手順1のチューブに入れ、ボルテックスか転倒を行なって十分に混和してください。Lysis Solution[Part B]を添加すると白色の沈殿物が生じます。65°Cで10分間インキュベートしてください。沈殿を溶かすため、インキュベーション中に時々転倒混和してください。

RNase処理(オプション): 本キットは大型のDNAを選択的に分離できるよう設計されています。精製物にRNAが混入している場合には、RNase A(キットには含まれていません)を用いてRNAを分解することができます。その際には、手順2の65°Cでのインキュベーションの直前に50 unitのRNase Aをサンプルに添加してください。

130 μLのPrecipitation Solutionを手順2の混合液に加え、転倒によって完全に混和させてから、氷上で5分間静置してください。その後、最高速度(12,000~16,000 × g)で5分間遠心し、細胞断片、タンパク質およびポリサッカライドを沈殿させてください。

3. 細胞断片を沈殿させます。

4. 細胞断片を濾過します。

手順3の上清を慎重にピペットで取り出し、GenElute Filtration Column (2 mL Collection Tubeが付いた青いカラム)に入れてください(カラムがCollection Tubeにセットされていない場合は、チューブを付けてください)。最高速度で1分間遠心してください。

この遠心によって、手順3で取り除けなかった細胞断片を除去します。Collection Tubeを残して、Filtration Columnは捨ててください。

700 μ LのBinding Solutionを、手順4でカラムを通過した液体に直接添加してください。十分に転倒混和してください。GenElute Miniprep Binding Column (赤いOリングのカラム)を使用します(カラムがCollection Tubeにセットされていない場合は、チューブを付けてください)。500 μ LのColumn Preparation Solutionを各Miniprep Columnに加え、12,000 $\times g$ で30秒から1分間遠心してください。カラムを通過した液体を捨ててください。

注意:Column Preparation Solutionをご使用になることで、メンブレンへのDNA結合量が最大化し、収量が安定します。手順5で得た溶液の700 μ Lをピペットで取り、手順6で準備したカラムに慎重に入れて、最高速度で1分間遠心してください。カラムとCollection Tubeを残して、カラムを通過した溶液は捨ててください。カラムを同じCollection Tubeにセットしてください。1回目でローディングできなかった残りの溶液をこのカラムにアプライしてください。上記の手順に従って再度遠心した後、カラムを通過した溶液とCollection Tubeを捨ててください。

初めて使用する際には、必ずWash Solution Concentrateをエタノールで希釈してください。手順7で準備したカラムを新しい2 mL Collection Tubeにセットして、500 μ Lの希釈したWash Solutionをカラムに入れてくれださい。最高速度で1分間遠心してください。カラムとCollection Tubeを残して、カラムを通過した溶液は捨ててください。

500 μ Lの希釈したWash Solutionを手順8で準備したカラムに入れ、最高速度で**3分間遠心**してカラムを乾燥させてください。カラムを通過した溶液はカラムに接触させないでください。カラムの外側に付着している溶液は完全に拭き取ってください。

手順9で準備したカラムを新しい2 mL Collection Tubeに移し入れてください。予め温めておいた(65°C) 100 μ LのElution Solutionをカラムに入れ、最高速度で1分間遠心してください。溶出をもう一度行なってください。カラムを通過した液体はカラムに接触させないでください。溶出液は、同じCollection Tubeに回収することが可能ですが、また、最初の溶出液を希釈したくない場合は、2回目の溶出には別のCollection Tubeを使用することもできます。

溶出液には精製されたゲノムDNAが含まれています。DNAの短期間の保存には、2~8°Cを推奨しています。長期間の保存には、-20°Cを推奨しています。DNA鎖が破壊される原因となるため、凍結融解は繰り返さないでください。Elution Solutionには、上記の温度条件下でDNAを安定化させる働きがあります。

DNA沈殿法(オプション)

GenElute Blood Genomic DNA Kitでは、DNAの再懸濁に伴う問題を避けるため、DNAが常に溶液中に存在するように設計されています。しかし、濃縮したDNAが必要な場合には、酢酸ナトリウムを用いたエタノール沈殿を行なうとよいでしょう。¹

他の組織粉碎法

多くの植物は纖維質であり、硬い細胞壁を持つため、植物組織からの核酸抽出は困難です。植物サンプルの粉碎にはいくつかの方法があります。最も有効でよく用いられる方法として、液体窒素中で植物を乳鉢と乳棒によって粉碎するという方法があります。GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kitは、この効果的な粉碎方法を用いることを想定して開発されました。しかし、他の粉碎手法で「手順」の手順1を行なうこともできます。

高分子量DNAは、組織を凍結乾燥させることで効率良く回収することができます。乾燥させた組織を、乳鉢と乳棒で細かく粉碎してください。1回のDNA精製につき、最大で20 mgの粉末を使用することができます。この方法では、液体窒素は必要ありません。組織を粉末にした後、手順2に進んでください。

結果

精製した植物のゲノムDNAの濃度と純度は、光学的分析またはアガロースゲル電気泳動によって測定できます。280 nmでの吸光度に対する260 nmでの吸光度の比(A₂₆₀/A₂₈₀)は1.7~1.9となります。DNAのサイズと純度は、アガロースゲル電気泳動またはパリスフィールド電気泳動で測定できます。

様々な植物種組織100 mg当たりの標準的DNA収率

植物	DNA収率	植物	DNA収率
トウモロコシ	7.5 µg	タバコ	5.2 µg
Dianthus組織培養	3.3 µg	トマト	6.2 µg
コショウ	3.1 µg	トマト(凍結乾燥した葉20 mg)	5.7 µg
イネ	5.9 µg		
ダイズ	5.7 µg	コムギ	11.5 µg

参考文献

1. Sambrook, J.; et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Plainview, NY, 1989, E10-E14, pp. 6.2-6.19.
2. Birren, B.; Lai, E. *Pulsed Field Gel Electrophoresis: A Practical Guide*; Academic Press: San Diego, CA, 1993.

トラブルシューティングガイド

カラムが詰まる

原因——サンプルの量が多すぎる。

対策——使用する植物組織の量を少なくしてください。カラムが詰まった場合には、遠心力を高めるか、または遠心時間を延長して、ライセートをカラムから出してください。その際、ゲノムDNAの収率が低下する可能性があります。

原因——組織の粉碎が不十分である。

対策——手順1に従ってサンプルをよく粉碎してください。手順1以外の方法で粉碎を行なう場合は、効率的に組織を粉碎できているかどうかを確認してください。

DNAの収率が低い。

原因——サンプルが古いか、または劣化している。

対策——ゲノムDNAの収率は、植物組織や植物種の種類によって異なります。可能な限り、若い葉や組織を使用してください。すぐにDNA精製を行なわない場合は、細胞や組織を液体窒素中で瞬間凍結して-70°Cで保存してください。

原因——組織の粉碎が不十分である。

対策——ゲノムDNAの収率は、植物組織や植物種の種類によって異なります。可能な限り、若い葉や組織を使用してください。すぐにDNA精製を行なわない場合は、細胞や組織を液体窒素中で瞬間凍結して-70°Cで保存してください。

原因——洗浄に使用したエタノールが溶出液に残っている。

対策——最後の洗浄時に使用したエタノールが残っていないことを確かめてから溶出を行なってください。手順9で推奨しているように、遠心時間を延長するか、または遠心回数を増やしてメンブレンを乾燥させる必要があります。カラムを通過した溶液(エタノール含有)がカラムに触れてしまった場合には、DNAを溶出する前に再度遠心してください。

原因——Wash Solution Concentrateが希釈されていない。

対策——Wash Solution Concentrateをエタノールで適切に希釈したかを使用前に確認してください。

原因——DNAの溶出が不完全である。

対策——DNAが100 μLのElution Solution中に溶出していることを確認してください。

必要に応じて、100 μLのElution Solutionを用いて2回目、3回目の溶出を行なってもよいでしょう。

原因——Elution Solutionではなく水でDNAを溶出した。

対策——精製DNAを効率的に回収、保存するため、Elution Solutionをご使用ください。DNAの溶出を水で行なう場合には、酸性状態で長期保存した際に起こるDNAの酸加水分解を避けるため、pHを7.0以上にしてください。

精製したDNAの純度が低い (A_{260}/A_{280} 比が低すぎる)

原因——精製が不完全である。

対策——少ないサンプル量から精製を始めてください。

原因——シリカの微粉末の混入により、バックグラウンドが高くなっている。

対策——DNAサンプルを最高速度で1分間遠心し、その上清を用いて吸光度を再測定してください。

精製したDNAの純度が低い (A ₂₆₀ /A ₂₈₀ 比が高すぎる)	原因——ゲノムDNAにRNAが混入している。 対策——RNase Aで処理するか、最終産物をRNase A Solutionで処理してから再精製してください。
DNAが損傷している。	原因——DNAサンプルの取り扱いが適切ではなかった。 対策——全てのピペットイングができる限り穩やかに行なってください。DNAの損傷を抑えるために、先端の広いピペットチップをご使用ください。ボルテックスは行なわないでください。
精製したDNAを使用した反応 が上手くいかない。	原因——サンプルが古いか、凍結融解の繰り返しによって劣化している。 対策——古いサンプルから精製を開始した場合、分解したDNAが溶出液に混入することがあります。調製したサンプルは新鮮な状態で速やかに使用してください。すぐに使用しない場合は、液体窒素で凍結させ、-70°Cで保存してください。
	原因——精製したゲノムDNAにエタノールが含まれている。 対策——カラムの最終洗浄(手順9)後は、カラムを通過した液体とカラムとを接触させないでください。必要に応じて、空のCollection Tubeをカラムに付けて、最高速度(12,000~16,000 x g)で1分間再遠心してください。
	原因——精製したゲノムDNAに塩が含まれている。 対策——手順8でWash Solutionを添加する前に、カラムを新しいCollection Tubeに移し替えたかを確認してください。500 μLのWash Solutionで2回洗浄してください。

関連製品	製品番号	関連製品	製品番号
Agarose	A9539	Pipette tips, 200 mL, wide orifice	P1678
Ethidium bromide, 10 mg/mL	E1510	RNase A Solution	R4642
Lambda DNA EcoR I Hind III marker	D9281	Sodium acetate, 3 M	S7899
Microcentrifuge tubes, 1.5 mL	T9661	Taq DNA polymerase	D1806, D4545
PCR Core Kit with Taq polymerase	CORET	TBE buffer, 53 concentrate	T6400

メモ

経験者向けプロトコル

1 植物組織の調製を行ないます。

- 液体窒素中で粉碎してください。

2 DNAを分離します。

- 細胞溶解、沈殿、遠心してください。

3 ライセートを濾過します。

- 1分間遠心してください。

4 カラムを準備します。

- 溶液を添加し、遠心してください。

5 DNAを結合させます。

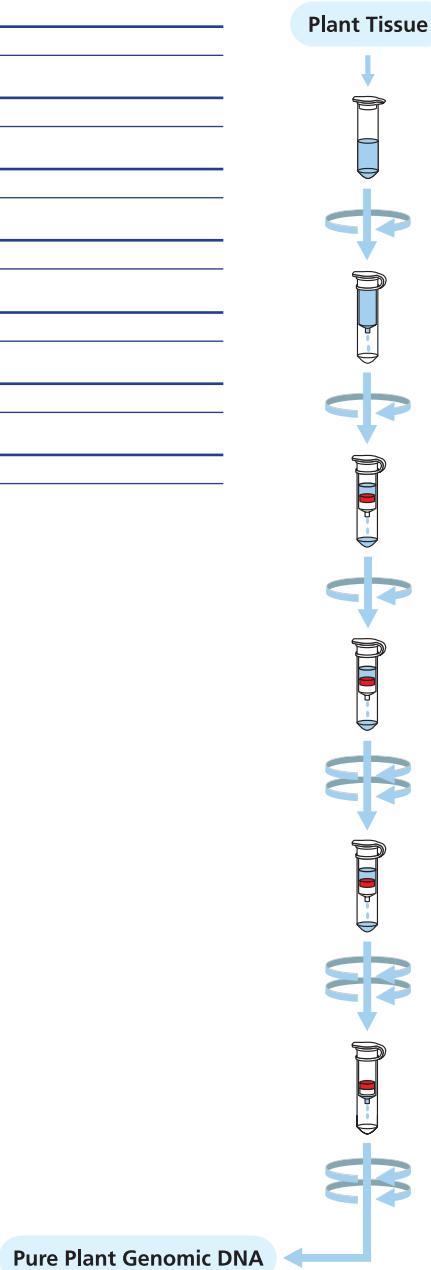
- 結合と遠心を2回行ってください。

6 カラムを洗浄します。

- 洗浄と遠心を2回行ってください。

7 DNAを溶出させます。

- 溶出と遠心を2回行ってください。



国際本部

3050 Spruce St., St. Louis, MO 63103
(314) 771-5765
sigma-aldrich.com

ご注文／お近くの代理店にお問い合わせください。弊社カスタマーサービス03-5796-7320、FAX 03-5796-7325
テクニカルサポート 03-5796-7330 sialjpts@sial.com
開発／大量製造に関するお問い合わせ **SAFC** (800) 244-1173

シグマ アルドリッヂグレーブ

©2007 Sigma-Aldrich Co. All rights reserved.

SIGMA、、SAFC、、SIGMA-ALDRICH、、ISOTEC、ALDRICH、、FLUKA、、SUPELCOは、Sigma-Aldrich Co.とその関連会社であるSigma-Aldrich Biotechnology LPの商標です。

Riedel-de Haén[®]は、Riedel-de Haén GmbHからのライセンスに基づく商標です。SIGMA製品の販売は、Sigma-Aldrich Co.を通じて行なわれます。Sigma-Aldrich Co.は、同社製品が本ガイドや他のSigma-Aldrich Co.発行物に記載されている情報に適合することを保証します。購入者は自身の責任において、目的とする用途に同社製品が適しているかを判断してください。場合により、他の条項も適用されます。納品書または内容明細票の裏面をご覧ください。GenElute[®]、DirectLoad[®]、SAFC[®]、Sigma Advanced Technology[™]はSigma-Aldrich Co.とその関連会社であるSigma-Aldrich Biotechnology LPの商標です。

特許出願中。

† PCR法は、Hoffman-LaRoche社が所有する特許によって保護されています。

SIGMA-ALDRICH[®]

ライフサイエンス、先端技術、サービスを主導し、皆様の研究を成功に導くお手伝いをしています。

SAW, MAM
00822-502620
0057-1