

ゲノムDNA抽出 クイックガイド

DNA組織キット 植物編

QuickGene DNA tissue kit S (DT-S)



ご使用前には、キットハンドブック・取扱説明書をよく読み、正しくご使用ください。



適切な保護手袋、および保護めがねを着用して作業を行ってください。

step1 準備

目的のゲノムDNA抽出を行うために、下記のものをご準備ください。

1 準備

QuickGene-Mini80

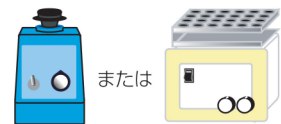
DNA組織キット (DT-S)



マイクロピペット



チューブミキサー



特級エタノール (>99%)

マイクロチューブ



マイクロ遠心機

手袋

ヒートブロック

ホモジナイザー



または



ホモジナイザーには、機種ごとに対応するチューブやビーズをお使いください。

液体窒素

ホモジナイザー専用 2.0mlチューブ

RNase (step1-2参照) ★オプション

2 試薬の準備

◆ 前処理酵素 (EDT)

2~8℃の冷蔵で保存してください。

◆ 組織溶解液 (MDT)

使用前に十分に混和してください。析出物が生じた場合は、55℃で溶解してください。

◆ 溶解液 (LDT)

使用前に十分に混和してください。析出物が生じた場合は、37℃で溶解してください。

◆ 洗浄液 (WDT)

未開封のWDTボトルに特級エタノール (>99%) を160ml添加・混合してください。
エタノール添加後は、フタをきちんと閉めて室温で保存してください。

◆ 回収液 (CDT)

核酸溶出時には、必ずCDTを使用してください。

◆ RNase処理を行う場合の推奨品 ★オプション

・ Ribonuclease A

(Sigma Cat. No.

R5125 *1 *2

R5500 *1 *2

R6513 *1

R4642

・ Ribonuclease A (MP Biomedicals Cat. No. 101076 *1 *2)

・ RNase A (AMRESCO Cat. No. 0675 *1 *2)

・ RNase A (QIAGEN Cat. No. 19101)

・ RNase A (Invitrogen Cat. No. 12091)

*1: 10mM Tris HCl pH7.5、15mM NaClを用いて100mg/ml溶液を調製する。
*2: R5125、R5500、101076、0675は100℃15分処理をしてDNase活性を失活してから使用する。

続いてstep2 プロトコールを行います。

step2 プロトコール

目的の収量を得るため、必ず下記の手順で作業を行ってください。

本キットは1処理あたり植物組織50mgに対応しています。
トマトの葉50mgから、ゲノムDNAが約5 μ g回収されます。
回収液量初期値は、200 μ lです。回収液量は50 μ lまで下げられますが、その場合、溶出効率が低下する可能性があります。

1 ホモジナイズした後、組織溶解を行います。

- 1) ヒートブロックを55 $^{\circ}$ Cに設定します。
- 2) ホモジナイザー専用2.0mlチューブに、植物組織50mgと4.8mm ϕ ステンレスビーズ2個を入れます。
- 3) 以下の方法で凍結を行います。

液体窒素の場合：30秒間
ドライアイスエタノールの場合：10分以上
-80 $^{\circ}$ C冷凍庫の場合：2時間以上
- 4) ビーズミル型ホモジナイザー（トミー精工社製 MS-100）で3,000rpm 30秒ホモジナイズを行います。
- 5) 以下の方法で再凍結を行います。

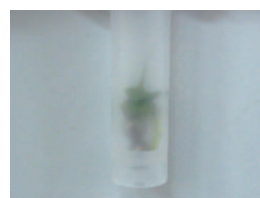
液体窒素の場合：30秒間
ドライアイスエタノールの場合：10分以上
- 6) 直ちに組織溶解液（MDT）270 μ l、前処理酵素（EDT）30 μ lを添加して良く混合します。
- 7) 55 $^{\circ}$ Cで10分から40分程度、時々攪拌しながら植物組織を溶解します。



ホモジナイザー内部



凍結前



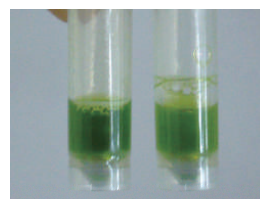
凍結後



チューブをセット



チューブ固定板をスライド後、
パワーノブを締める



酵素反応後

2 組織破片の分離と溶液の分取

- 1) 溶解残渣分を分離除去するために遠心します（15,000rpm、10分、室温）。
- 2) 底に沈んだ組織破片などを吸い込まないように注意して、ホモジネート上清250 μ lを新しい1.5mlチューブに移します。

3 RNase処理 ★オプション

(step1 試薬の準備を参照)

1)濃度100mg/mlのRNaseを20 μ l添加します。(Cat. No. 12091は60 μ l使用します。)

DNaseフリーでないRNaseを使用する場合は、DNase不活化処理をしてください。

2)タッピングまたはピペティング5回を行い、RNaseをサンプル液とよく混ぜます。

3)数秒スピンドウンして、チューブのキャップや壁についた液を収集します。

4)室温で2分間、インキュベーションします。

4 LDTを添加後、ボルテックス：15秒（最大回転数で充分混合）

1) 溶解液（LDT）225 μ lを添加し、サンプル液と混合します。ボルテックスを15秒間最大回転数で行います。

2) 混和が不十分なときは、タッピング、ピペティングあるいは転倒混和などでよく混ぜます。

3) その後、数秒間スピンドウンしてチューブのキャップや壁に付着した溶液を収集します。

LDT液添加時に混合液が白くなることがありますが、70 $^{\circ}$ Cに加温すると溶解します。

4) 70 $^{\circ}$ Cにて10分間インキュベーションします。（オプション）

5) 軽くスピンドウンします。

5 特級エタノール (>99%) を添加後、ボルテックス：15秒（最大回転数で充分混合）

1) 特級エタノール300 μ lを添加し、サンプル液と混合します。ボルテックスを30秒間最大回転数で行います。

2) 混和が不十分なときは、タッピング、ピペティングあるいは転倒混和などでよく混ぜます。

3) その後、数秒間スピンドウンしてチューブのキャップや壁に付着した溶液を収集します。

6 ライセート完成

ライセート完成後、30分以内に抽出を行ってください。

続いてstep3 抽出を行います。

step3 抽出

QuickGene-Mini80を使って、ゲノムDNAを抽出します。

1 QuickGene-Mini80抽出フロー

抽出フロー中の加圧マークは下記操作を意味しています。

- ① チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQuickGene-Mini80にセットする
- ② 加圧スイッチを手前に回して加圧開始
- ③ カートリッジ（CA）内に液が残っていないことを確認してから加圧スイッチを元の位置に戻す
- ④ チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQuickGene-Mini80から取り出す

