

PI-480 植物 DNA 1 プロトコール イネの葉からのゲノム DNA 分離精製 - automation from plant cell lysis to DNA dissolution -



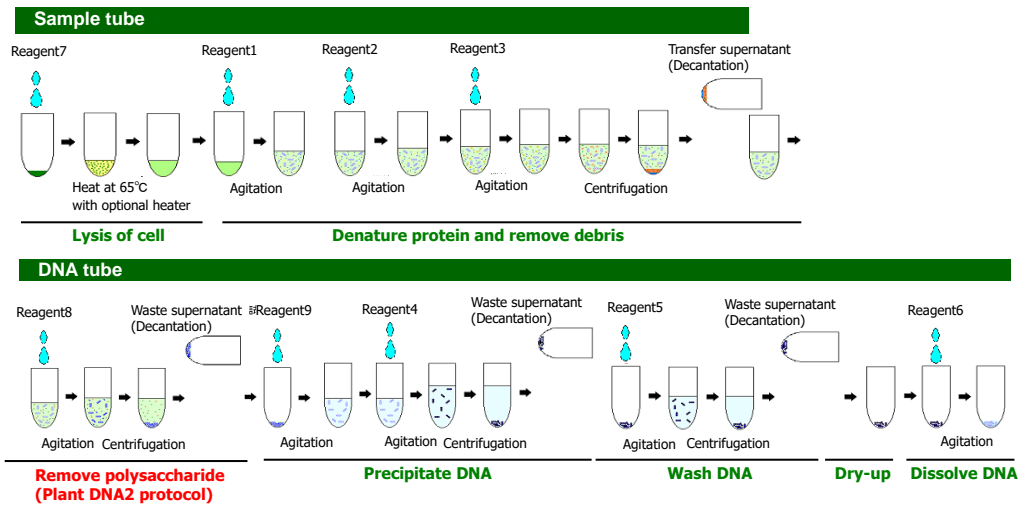
クラボウ PI-480 では、一度に 48 サンプルの DNA の自動分離精製が可能です。本データでは、植物 DNA1 プロトコールを用いて、イネの葉からの DNA 分離精製例を示します。ヒーターユニット及び追加の送液ラインを増設することで、細胞の加温操作から DNA 溶解工程まで自動で実施することが可能です。



実 験

サンプル	イネ 葉 (<i>Oryza sativa</i>)
サンプル量	100mg
分離システム	PI-480 ヒーター及び 3 連シリンジ増設モデル(オプション) 植物 DNA1 プロトコール
試薬キット と消耗品	NR-501 Sample tube, PT-8000; DNA tube, NT-8000
精製原理	植物細胞の溶解: CTAB 及び界面活性剤 精製: クロロホルム及び塩 DNA 回収: アルコールによる沈澱
精製工程	前処理: クラボウ製 8 連チューブユニット (KURABO, PT-8000), に粉砕用ビーズとサンプルを入れ、液体窒素による冷却後、クラボウ製粉砕装置(KURABO, SH-48)にて粉砕。
	PI-480 (オプション;ヒーター付き,3 連増設モデル)による分離精製: Step1. 65°C, 40 分の溶解加温 Step2. 蛋白変性と不純物の除去 Step3. DNA 沈澱 Step4. DNA 洗浄 Step5. 乾燥 Step6. DNA 溶解試薬(クラボウ, PR-6025)による DNA の溶解 溶解溶液量 100µl

植物 DNA プロトコールのワークフロー



植物 DNA1 プロトコールでは、多糖除去工程(赤字部分)が省かれます。

分離時間 48 サンプル: 2.8hr
(PI-480) 48 サンプル: 2.1hr (オプションヒーター搭載時)

分析方法

収量と純度計算 分光光度計により各々の DNA 溶液の 260nm の吸光度を測定。
DNA 収量は下記の方法にて算出した:
 $A_{260} \times 50 \times \text{希釈率} \times \text{最終溶解量}$.
DNA 純度は A_{260}/A_{280} の値より確認.

電気泳動 それぞれ DNA 溶液 5 μ l を 0.7% agarose gel にて電気泳動を行った.

制限酵素による切断 イネの葉より分離精製した DNA 1 μ g を 20units の制限酵素で、最適温度で 15hour 反応を行った.
制限酵素: *EcoRI* and *BamHI*

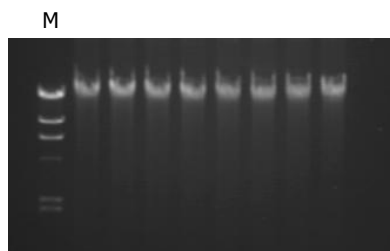
PCR 増幅 鋳型: イネ・葉から分離精製した DNA 100ng
ターゲット遺伝子: Ribrose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase large subunit gene, amplicon size 670bp
DNA Polymerase: AmpliTaq® DNA Polymerase (0.6U)
PCR 増幅: 94°C, 5min x 1 cycle
94°C, 20sec/60°C, 40sec/72°C 1.5min x 35 cycles
72°C, 7min x 1 cycle
反応液量: 25 μ l
電気泳動: 1.8% agarose gel にて 25 μ l の反応液より 10 μ l を泳動.

結果

収量と純度

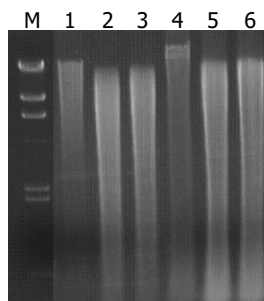
収量 (μg)	純度(A260/A280)	純度(A230/A260)
21/100mg (核酸量として)	1.79	0.46

電気泳動



イネ・葉から分離精製された
DNA 5μl of 100μl
M: λ*Hind*III size maker

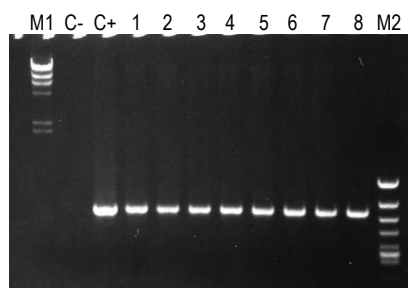
制限酵素による切断



イネ・葉から分離精製した DNA1μg の制限酵素切断結果.

M: λ*Hind*III size maker
 1:市販手作業キットにて抽出した DNA (未切断)
 2:市販手作業キット, *Eco*RI digested
 3:市販手作業キット, *Bam*HI
 4: PI-480 分離精製 DNA (未切断)
 5: PI-480 分離精製 DNA, *Eco*RI
 6: PI-480 分離精製 DNA, *Bam*HI

PCR 増幅



M1: φX174 *Hin*II size marker
 C-: Negative control
 C+: Positive control
 1-8:分離精製 DNA からの増幅産物
 M2: φX174 *Hin*II size marker

製品情報**DNA 分離システム PI-480**

オプション: ヒーター及び3連送液ライン増設
植物 DNA1 プロトコール

試薬キット 植物 DNA 試薬キット ver.1 NR-501 (approx. for 700 preps)

試薬名称	試薬番号. (Code)	内容量
植物用蛋白変性試薬 A	1 (SR-1050)	1
植物用蛋白変性試薬 B	2 (SR-2050)	1
植物用除蛋白試薬	3 (SR-3025)	1
沈澱試薬	4 (PR-4050)	1
洗浄試薬	5 (PR-5050)	4
溶解試薬	6 (PR-6025)	1
植物用細胞溶解試薬	7 (SR-7050)	1

専用チューブユニット サンプルチューブユニット: PT-8000 (8-hole, blue, 64 個)

DNA チューブユニット tube: NT-8000 (8-hole, white, 64 個)

本資料に記載されている商品名は、各社の商標または登録商標です。

倉敷紡績株式会社

バイオメディカル部

〒572-0823

大阪府寝屋川市下木田町 14-5

電話: 072-820-3079

Fax: 072-820-3095

bio@ad.kurabo.co.jp