

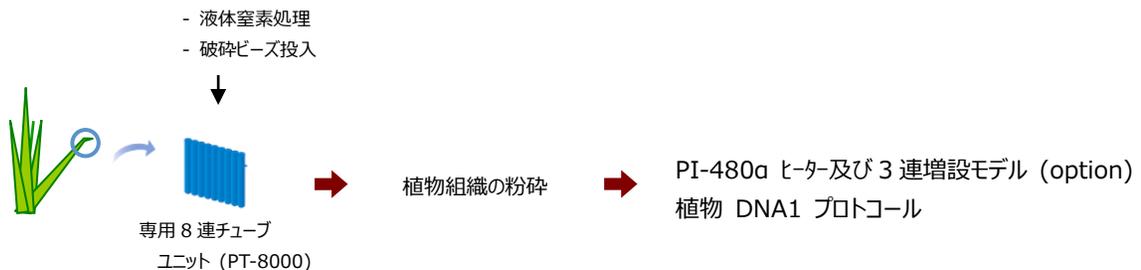
PI-480a 植物 DNA 1 プロトコール

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-480aでは一度 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 (*Oryza sativa*)

サンプル量 100 mg

分離装置 PI-480a 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 NR-501

と消耗品 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), に粉碎用ビーズとサンプルを入れ、液体窒素による凍結後、ビーズ粉碎装置にて粉碎。

PI-480a (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

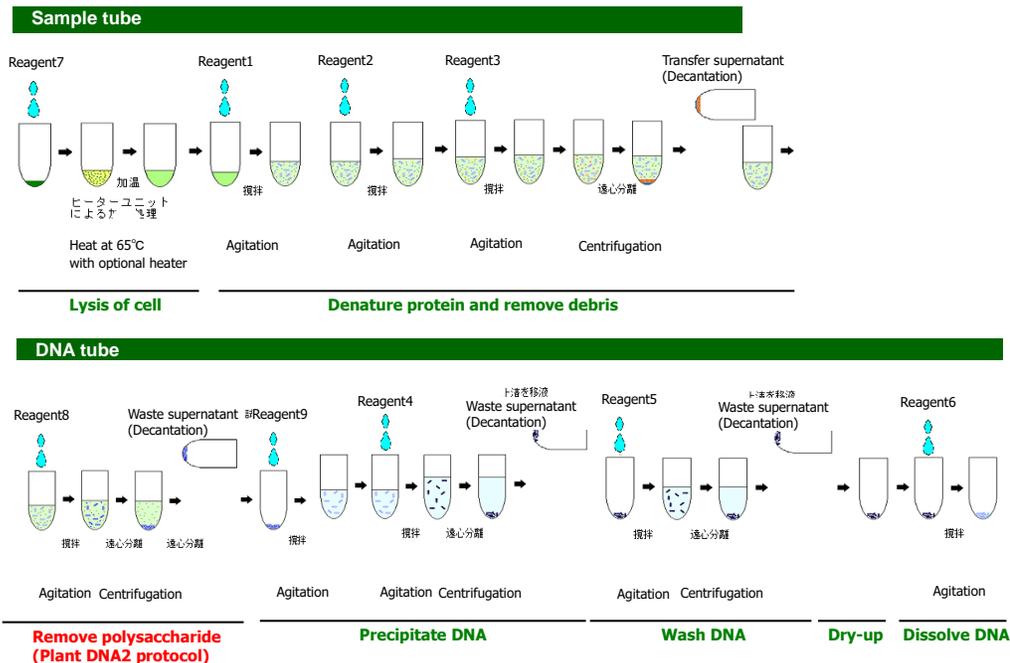
Step2. 蛋白変性と不純物の除去

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 (溶解液量 100 μl)

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)は含まれていません。

分離時間 48 サンプル: 2.8 hr

48 サンプル: 2.1 hr (オプションヒーター搭載時)

分析方法

収量と純度 分光光度計により各々の DNA 溶液の 260 nm の吸光度を測定。

計算 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 イネの葉より分離精製した DNA 1 μ g を 20 units の制限酵素で、最適温度で 15 hour 反応を行った。

切断 制限酵素: *EcoRI* and *BamHI*

PCR 増幅 鋳型: イネ・葉から分離精製した DNA 100 ng

ターゲット遺伝子: Ribrose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase large subunit gene,
amplicon size 670 bp

DNA Polymerase: AmpliTaq® DNA Polymerase (0.6 U)

PCR 増幅: 94°C, 5min x 1 cycle

94°C, 20 sec / 60°C, 40 sec / 72°C 1.5 min x 35 cycles

72°C, 7 min x 1 cycle

反応液量: 25 μ l

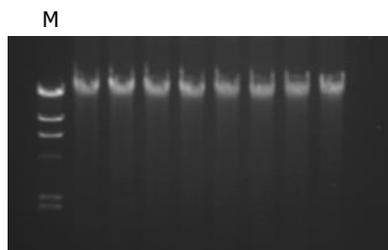
電気泳動: 1.8% agarose gel にて 25 μ l の反応液より 10 μ l を泳動

結果

収量と純度

収量 (μ g)	純度 (A_{260}/A_{280})	純度 (A_{230}/A_{260})
21/100 mg (核酸量として)	1.79	0.46

電気泳動

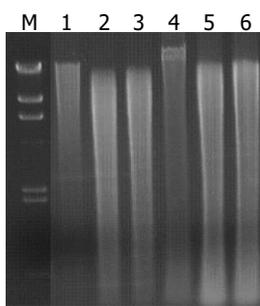


イネ・葉から分離精製された DNA 5 μ l of 100 μ l

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 DNA 1 μg 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

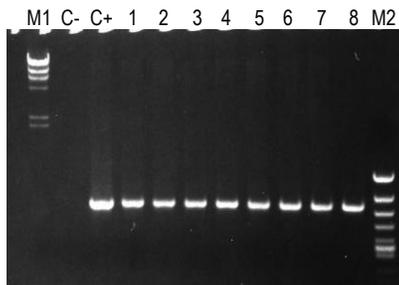
3:市販手作業キット, *Bam*HI

4: PI-480α分離精製 DNA (未切断)

5: PI-480α分離精製 DNA, *Eco*RI

6: PI-480α分離精製 DNA, *Bam*HI

PCR 増幅



M1: ϕ X174 HinII size marker

C-: Negative contol

C+: Positive contol

1-8:分離精製 DNA からの増幅産物

M2: ϕ X174 HinII size marker

製品情報

分離装置 PI-480a
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

〒572-0823

大阪府寝屋川市下木田町 14-30

クラブウ先進技術センター

電話: 072-820-3079

Fax: 072-820-3095