

Nucleic Acid Purification Kit

MagExtractorTM

- *Plant Genome* -

取扱説明書

(Code No. : NPK-501)

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

－ 目次 －

[1]	はじめに.....	(1)
[2]	ご使用になる前に.....	(1)
[3]	キットに含まれるもの.....	(2)
[4]	プロトコール.....	(2)
	1. キットの他に必要なもの.....	(2)
	2. 抽出フロー.....	(3)
	3. サンプルの前処理.....	(4)
	4. MFX-2000/2100 を用いた Plant DNA の抽出.....	(4)
	5. マニュアル法による Plant DNA の抽出.....	(9)
[5]	一般的なサンプルの分析.....	(10)
	1. DNA の定量.....	(10)
	2. 電気泳動.....	(10)
	3. PCR.....	(10)
[6]	抽出例.....	(11)
[7]	トラブルシューティング.....	(11)

ご注意)

本キットに含まれる試薬はすべて研究用試薬です。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

FALCON[®]は、BECTON DICKINSON 社の登録商標です。

[1] はじめに

MagExtractor™ -Plant Genome-は、カオトロピック剤の存在下で DNA がシリカに吸着する性質を利用した Plant DNA 抽出キットです。本キットを自動核酸抽出装置 MFX-2000/2100 で使用することにより、葉や培養細胞などの植物試料から高純度な Plant DNA を簡便に抽出できます。また、本キットはマニュアル抽出用キットとしてもお使いいただけます。

特長

- ・ 葉などの植物組織、培養細胞などの植物試料から DNA を抽出するためのキットです。
- ・ エタノール沈殿操作を必要とせず、短時間で抽出が可能です。
- ・ フェノールを使用しません。
- ・ RNase を使用しません。
- ・ 抽出した DNA は、TE バッファー中に回収されますので、直ちに PCR 法などの解析手段に利用できます。

[2] ご使用になる前に

- ・ MagExtractor™ -Plant Genome-は以下の試料に対応します。

対応サンプル	サンプル量	主な用途
葉、培養細胞などの植物試料	0.01~0.1g	PCR

抽出例については11頁、[6]をご参照ください。

- ・ 溶解液の保存について

本キットは低温で保管、輸送を行うため溶解液中の界面活性剤成分が析出しています。以下の手順にしたがって溶解し、室温(20~30℃)にて保存してください。見かけ上析出していないように見えることもありますが透明塊となっている場合もあるため、初めてご使用になる前には必ず以下の操作を行ってください。また、保存中に析出した場合も同様に溶解してください。

他の試薬は4℃保存です。(2頁、[3]キットに含まれるもの参照)

- ①50℃の湯浴中で10分間加温する。
- ②ボトルを穏やかに転倒混和し、析出した塊を溶解する。
(激しく攪拌すると泡立つ。)
- ③50℃の湯浴中で5分間再加温する。
- ④ボトルを穏やかに転倒混和し、完全溶解する。
溶け残りがある場合、さらに5分間程度湯浴で加温後、転倒混和して完全溶解する。
(透明塊となっている場合もあるので注意して完全溶解する。)

- ・ 本キットは、室温(20~30℃)でのご使用をお勧めいたします。低温では溶解液成分が析出し、本キットの性能が発揮されない可能性があります。

[3] キットに含まれるもの

本キットには、100 サンプル分の抽出ができる試薬が含まれています。各試薬は以下の温度で保存してください。

試薬名	容量	保存
溶解液	40ml	溶解後、室温保存(20~30℃)
吸着液	90ml	4℃
洗浄液	200ml	4℃
磁性ビーズ	6ml	4℃

- ・それぞれ指定の温度で保存し、使用前にはあらかじめ室温にもどしておいてください。また、短期間(1ヶ月以内)の場合には、室温(25℃以下)での保存も可能です。
- ・吸着液と洗浄液には、高濃度のタンパク質変性剤(グアニジン塩酸塩)が含まれていますので、取扱いには十分注意し、手袋を着用するなどの予防措置を講じてください。万一、試薬が手などの皮膚に付着した場合には、十分に水洗を行い、また、目に入った場合には、水洗を行った後に医師の手当を受けてください。
また、10%を超える高濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液などの酸化作用のある物質と混合した場合、有毒ガスが発生する可能性がありますので、混合しないでください。
- ・弊社の自動核酸抽出装置 MFX-2000/2100 でご使用になる場合は、指定のチューブに必要量を分注し、決められた場所にセットしてください。
(6 頁、[4]-4-(5)試薬のセット参照)

[4] プロトコール

1. キットの他に必要なもの

(1) 試薬

- ・液体窒素
- ・クロロホルム／イソアミルアルコール
クロロホルム：イソアミルアルコール^{*1} = 24：1 の比(体積比)で混合したもの
- ・滅菌水
市販の純水またはミリQ水をオートクレーブ滅菌したもの
- ・エタノール
99.5%以上の特級品、マニュアル抽出の場合は 70%エタノール
- ・TE バッファー(pH8.0)
10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA (pH8.0)

(2) 器具・機材

- ・マイクロピペット

*1 別名：3-メチル-1-ブタノール

- ・マイクロピペット用チップ
- ・卓上遠心機(3,000~12,000rpm くらいの回転が出来るもの)
- ・ヒートブロック(ウォーターバスでも可、65°C)
- ・1.5ml マイクロチューブ

MFX-2000/2100 をご使用になる場合

- ・抽出専用チューブ(Code No.:MFX-301)・・・サンプル回収用
- ・抽出専用 6 連チューブ(Code No.:MFX-302)・・・抽出用
- ・専用フィルター付きチップ(Code No.:MFX-402A)
- ・試薬セット用チューブ(50ml 用、15ml 用、2ml 用)^{*1}

マニュアル法でご使用になる場合

- ・1.5ml マイクロチューブ用磁気スタンド
(東洋紡製 *Magical Trapper*, Code No.:MGS-101)
- ・チューブミキサー(トミー精工社製 MT-360 など)

2. 抽出フロー

MagExtractor™ -*Plant Genome*-は簡単な前処理の後、MFX-2000/2100 にて自動抽出します。

以下に抽出フローを示します。

液体窒素を用いて凍結粉碎したサンプル	
← 溶解液 [細胞の溶解]
← 65°C 10 分間	
← クロロホルム抽出 [ポリサッカライドの除去]
← 吸着液	<u>前処理 計約 15 分間</u>
MFX-2000/2100 による抽出	
← 磁性ビーズ:約 2 分間 [DNA の吸着]
B/F 分離	
← 洗浄液:約 5 秒間(2 回) [非特異的吸着物の除去]
B/F 分離	
← 70%エタノール:約 5 秒間(2 回) [タンパク質変性剤の除去]
B/F 分離	
← 溶出液(TE):約 2 分間 [DNA の溶出]
B/F 分離	
上清回収(100µl)	<u>自動抽出 計約 10~12 分間</u>

マニュアル法でも前処理後、約 15 分間で DNA の抽出が可能です。

(9 頁、[4]-5 マニュアル法による Plant DNA の抽出参照)

^{*1} 試薬セット用チューブには、以下の製品をおすすめします。50ml チューブ:BLUE MAX 2170、15ml チューブ:BLUE MAX Jr 2196(いずれも BECTON DICKINSON 社製)、2ml マイクロチューブ:2220、2200(イナオプティカ社製)、72.693、72.694(アシスト社製)のいずれか

(2) 加温ブロック、回収ブロックの温度設定

加温ブロック、冷却ブロックを以下のように設定します。

	加温ブロック	冷却ブロック
設定温度	OFF	10℃

- ・加温ブロックは使用しませんので電源を OFF にしてください。
- ・簡易保冷ブロックの場合、ブロックを冷蔵庫もしくは低温室であらかじめ冷やしておきます。簡易保冷ブロックは、回収液の一時的な保冷が可能です。

(3) 専用フィルター付きチップのセット

専用フィルター付きチップをチップラックにセットします。セット本数は下表を参考に行ってください。

- ・チップは専用のフィルター付きチップ (Code No.: MFX-402A) をご使用ください。
- ・チップは、ガンマ線滅菌されております。必要な本数の専用チップをチップラックに手袋を着用してセットします。
- ・下表に記載された本数より多くセットしていただいても問題ありません。
- ・チップのセット位置は MFX-2000/2100 の取り扱い説明書をお読みください。

サンプル数	チップ本数	サンプル数	チップ本数
1	6	13	39
2	8	14	41
3	10	15	43
4	12	16	45
5	17	17	50
6	19	18	52
7	21	19	54
8	23	20	56
9	28	21	61
10	30	22	63
11	32	23	65
12	34	24	67

(4) 専用チューブのセット

専用チューブ (Code No.: MFX-301) もしくは専用 6 連チューブ (Code No.: MFX-302) を抽出ラックの A ~ F と回収ブロックにサンプル数分セットしてください。

- ・抽出ラックには専用チューブ以外は使用しないでください。トラブルの原因となることがあります。
- ・回収ブロックには専用チューブ (Code No.: MFX-301) またはスクリューキャップ式の 1.5ml チューブ^{*1} をセットすることもできます。
- ・詳しいセット方法は MFX-2000/2100 の取扱説明書をお読みください。

(5) 試薬のセット

試薬はそれぞれ指定のチューブに移し、試薬ラックの所定の位置にセットします。

- ・各試薬が室温に戻っていることを確認してください。
- ・サンプル数に応じて必要な試薬量が異なります。次ページの表に従って試薬をセットしてください。
- ・磁性ビーズは、分注前によく攪拌し、均一に懸濁していることを確認してから 2ml チューブに分注してください。また、磁性ビーズのセット後は、速やかに (10 分以内に) 装置を作動させてください。収量のバラツキや動作上の障害が生じる原因となります。
- ・磁性ビーズの分注は、ピペッターを用いて行ってください。他の試薬については、試薬チューブの目盛りを目安に分注していただいても結構です。
- ・抽出後に残った試薬は、再びお使い頂けますが、長時間放置した場合には、蒸発などにより液組成が変化している可能性があります。ご注意ください。
- ・滅菌水、エタノール (99.5% 以上の特級品)、TE バッファー (pH8.0) は本キットに含まれていませんのでご用意ください。(2 頁、[4]-1-(1) 試薬参照)

セット位置	試薬名	チューブ容量
1	滅菌水	50ml
2	洗浄液	50ml
5	エタノール	50ml
7	磁性ビーズ	2ml
9	TE バッファー (pH8.0)	15ml

*1 アシストチューブ (No.72.692) など

【各試薬の分注量】

試薬名	滅菌水	洗浄液	エタノール	磁性ビーズ	TE	
チューブ容量	50ml	50ml	50ml	2ml	15ml	
セット位置	1	2	5	7	9	
各試薬チューブに分注する試薬量 (ml)						
サンプル数	1	5 (20)	5 (20)	5 (20)	0.5 (1.5)	2 (5)
	2		10 (20)	10 (20)		
	3				15 (20)	
	4					
	5		10 (20)	20 (20)		
	6					
	7	25 (35)		20 (20)		
	8					
	9				1 (1.5)	
	10	30 (35)		25 (35)		
	11					
	12	15 (20)		35 (35)	4 (5)	
	13					
	14			30 (35)		1.3 (1.5)
	15					
	16					
	17		40 (45)	30 (35)		1.3 (1.5)
	18					
	19		45 (45)	35 (45)		1.5 (1.5)
	20					
	21					
	22					
	23	45 (45)	35 (45)	1.5 (1.5)		
	24					

- ・サンプル数に応じた各試薬の分注量の目安を記載しています。余剰分を含んでいますので、この数値に従って試薬を試薬チューブへ分注してください。
- ・カッコ内の数値は、試薬チューブへ分注する際の最大許容量の目安を示しています。この数値を越えた量を分注すると、ノズルの汚染や液ダレ等の問題が生じることがあります。

(6) サンプルのセット

サンプルは、4 頁、[4]-3 サンプルの前処理にしたがって調製し、抽出ラックにセットします。

- ・スクリューキャップ式の 1.5ml サンプルチューブを使用される場合は、キャップを外した状態で、サンプルセット位置にセットします。
- ・通常の 1.5ml チューブが使われる場合は、キャップの部分をはさみ等で切断し、セットしてください。
- ・1～24 までの番号が手前にナンバリングされているホールに、順にセットしてください。

(7) 抽出開始

以下の要領で抽出をスタートさせます。

- ① サンプル、試薬チューブ、専用チューブ（抽出ラックと回収ブロック）、専用チップが説明書通りにセットされていることを確認します。
- ② 各ラックのセット位置と、ステージが完全に奥まで（カチッとひっかかるまで）収納されていることを確認し、前面扉を閉めてください。
（扉が完全に閉まっていないと抽出がスタートしません。）
- ③ MFX-2000/2100 の電源を入れます。
- ④ 液晶画面に“プロトコル”、“サンプルスウ”と表示されます。プロトコルに“13”、およびサンプルスウに抽出するサンプル数を入力します。
- ⑤ “スタートキーヲオシテクダサイ”と画面に表示されていることを確認して“START”キーを押してください。
- ⑥ 抽出操作が始まると液晶画面に“ドウサチュウ”と表示されます。

(8) サンプルの回収

抽出操作が終了したら、前面の扉を開けてサンプルを取り出します。

- ・抽出が完了すると、抽出された DNA は回収ブロック上のチューブに回収されます。また、液晶画面には、再び“スタートキーヲオシテクダサイ”と表示されます。
- ・装置が完全に停止していることを確認した後、回収ブロックよりチューブを取り出し、使用するまで氷上または低温（4～10℃）にて保存ください。
- ・磁性ビーズからの DNA の溶出は、100µl の溶出液（TE バッファー）を使用して行いますので、回収液量はおよそ 100µl となります。

5. マニュアル法による Plant DNA の抽出

本キットはマニュアル法での DNA 抽出にもご利用いただけます。以下の手順に従って抽出を行ってください。

- ・磁性ビーズの分離には、市販の 1.5ml マイクロチューブ用磁気スタンドを使用されることをおすすめしますが、卓上遠心機で 3,000rpm、15 秒間程度の遠心分離によって分離することも可能です。
- ・本キットのほかに必要なもの
2 頁、[4]-1-(1)試薬をご参照ください。
70%エタノールについては特級グレードのエタノールと滅菌水を 7:3 の割合で混合することによって、あらかじめ調製してください。
(1 サンプルあたり約 2ml 必要です。)

- ①4 頁、[4]-3 サンプルの前処理にしたがって調製したサンプルを用意する。
- ②磁性ビーズ 40 μ l を加える。
(磁性ビーズは、あらかじめよく混合してから使用する。)
- ③チューブミキサーを使用して、1 分間、激しく混合する。 ……[DNA の吸着]
- ④チューブを磁気スタンドにセットして、30 秒間程度、放置することによって磁性ビーズを集める。
(このとき数回転倒混和し、蓋についたビーズもできるだけ回収する。)
- ⑤上清を除去する。
- ⑥洗浄液 900 μ l を加える。
- ⑦ボルテックスミキサーを使用して、5 秒間程度、激しく混合する。
(このとき、ビーズが分散・懸濁されていることを確認する。)
- ⑧チューブを磁気スタンドにセットして、30 秒間程度、放置することによって磁性ビーズを集める。
(このとき数回転倒混和し、蓋についたビーズもできるだけ回収する。)
- ⑨上清を除去する。
- ⑩⑥～⑨のステップをもう一度行う。
- ⑪70%エタノール 900 μ l を加える。
- ⑫ボルテックスミキサーを使用して、5 秒間程度、激しく混合する。
(このとき、ビーズが分散・懸濁されていることを確認する。)
- ⑬チューブを磁気スタンドにセットして、30 秒間程度、放置することによって磁性ビーズを集める。
(このとき数回転倒混和し、蓋についたビーズもできるだけ回収する。)
- ⑭上清を除去する。
- ⑮⑪～⑭のステップをもう一度行う。
(エタノールは蓋に付着しているものも含めてできるだけ除去する。)
- ⑯TE バッファー100 μ l を加える。
- ⑰チューブミキサーを使用して、1 分間、激しく混合する。 ……[DNA の溶出]
- ⑱チューブを磁気スタンドにセットして、30 秒間程度、放置することによって磁性ビーズを集める。
- ⑲DNA が含まれる上清を新しい 1.5ml マイクロチューブに回収する。

[5]一般的なサンプルの分析

それぞれ以下の点にご注意ください。

1. DNA の定量

- ・DNA の定量のために吸光度を測定する場合には、必ず、回収液を遠心分離(12,000rpm、1 分間)し、その上清を使用してください。
- ・A260nm/A280nm 比や DNA 濃度の算出には、必ず A320nm 値で補正してください。

DNA 濃度	$(A260-A320) \times 50 \mu\text{g/ml}$
A260nm/A280nm	$(A260-A320) / (A280-A320)$

2. 電気泳動

- ・回収液の一部をそのまま電気泳動に使用される場合には、アプライ時に混合する Loading Dye の量を通常使用される量の 1.5~2 倍程度としてください。泳動用サンプルがウェル内に沈降せず、正常にアプライできないことがあります。

3. PCR

- ・回収液には 10%程度のエタノールが混入します。PCR に使用される場合には、反応を阻害することがありますので、反応液の 1/5 量(反応液量が 50 μ l の場合には 10 μ l)を越えない範囲でご使用ください
- ・回収液中に微量の磁性ビーズが混入することがありますが、PCR にはそのまま使用していただいても差し支えありません。

[6]抽出例

以下にサンプル 0.1g からの MFX-2000/2100 による抽出例を示します。

サンプル	収量
タバコ(葉)	3~5 μ g
タバコ(培養細胞)	2~3 μ g
イネ(葉)	3~5 μ g
シロイヌナズナ(葉)	1 μ g
トマト(葉)	3 μ g
カボチャ(葉)	3 μ g
トウモロコシ(葉)	3~4 μ g

・収量はサンプルの種類や状態により変動します。記載されている数値は目安としてお考えください。

[7]トラブルシューティング

トラブルが生じた場合には、以下の対策をご参照ください。

1.収量が低い、DNA が得られない

原因	対策
サンプル過剰	規定量以上のサンプルを使用されても、収量は上がりず、むしろ収率は低下します。サンプル量を減らしてみてください。また、サンプルによっては重量あたりの体積が大きいものもあります。溶解液に浸らない場合もサンプル量を減らしてください。
破碎が不十分	液体窒素による凍結破碎が不十分なことが考えられます。パウダー状になるまでしっかり破碎してください。またサンプルを解凍させないようにご注意ください。
溶解が不十分 ①クロロホルム抽出液量が 250 μ l 前後ある場合	溶解液とサンプルとの混合が不十分、また、サンプル自体が溶解しにくいサンプルである可能性があります。サンプルと溶解液を十分混合してからボルテックスミキサーで 1 分間程度 攪拌してから抽出を続けてください。(通常 10 秒間)
②クロロホルム抽出液量が 150 μ l 以下と非常に少ない場合	サンプルの水分含量が少なく、サンプルが溶解液を吸収してしまっている可能性があります。溶解液の添加量を 350~400 μ l 程度に増量して抽出を行ってください。上記①の対策を併せて行うとより効果的です。

試薬量の不足 (MFX 抽出)	試薬が不足していなかったか、全ての試薬の残量を確認してください。ほとんど残っていない(200μl 以下)場合には、不足していたことが考えられます。
吸着、溶出が不十分 (マニュアル抽出)	マニュアル法では DNA のビーズへの吸着およびビーズからの溶出操作をチューブミキサーで 1 分間攪拌することによって行っています。(9 頁、[5]-5 マニュアル法による抽出③、⑰参照)それぞれの攪拌時間を 10 分間程度 行ってください。DNA の回収効率が向上します。

・なお、サンプルの種類や保存状態により、収量(収率)は大きく異なります。

2.クロロホルム抽出時、うまく相分離しない

原因	対策
クロロホルム/イソアミルアルコール添加後の混合が不十分	ボルテックスを使用すると完全に混合しないことがあるのでチューブを上下に激しく振ってサンプルを混合した後、遠心分離します。

3.PCR がうまくいかない

原因	対策
回収液中に混在するエタノールによる阻害	反応液の 1/5 を越える量を使用すると反応が阻害されることがありますので、その場合には使用する液量を減らしてください。また、回収液を 75℃で 5 分間程度、加温することにより改善されることがあります。

・その他の PCR に関するトラブルシューティングは、弊社各種 PCR 用酵素の実施例集や PCR に関する解説書等を参考にしてください。

4.洗浄時にビーズが完全に分散しない(チップにビーズがつまる)

原因	対策
サンプル過剰	サンプル量が過剰な場合には、ビーズが凝集しやすい傾向があります。また、規定量以上のサンプルを使用されても、収量は上がりず、むしろ収率は低下します。サンプル量を減らしてみてください。
試薬量の不足	試薬が不足していなかったか、全ての試薬の残量を確認して下さい。ほとんど残っていない(200μl 以下)場合には、不足していたことが考えられます。洗浄液が不足していると攪拌が不十分となり、ビーズが分散しないことがあります。

5.ビーズがうまく分注されない

原因	対策
磁性ビーズの沈降による固化	ボルテックスを行って均一になるまで懸濁させた後は、再び抽出に使用できます。なお、抽出をスタートさせる前には、ボルテックスを行って均一になるまで懸濁させるか、スタート直前(10分以内)に磁性ビーズを2mlチューブへ移すようにしてください。
蒸発による磁性ビーズ懸濁液成分の濃縮、結晶化	今後のトラブルを防ぐために、2mlチューブに残ったビーズは廃棄してください。また、保存の際や短時間でも放置される場合には、ボトルやチューブのフタを強く締めるようにしてください。

- ・その他の機器動作に関するトラブルシューティングは、MFX-2000/2100の取扱い説明書にも記載していますので、そちらの方もあわせてご覧ください。



【製造・販売元】

—納期・注文に関するお問い合わせ—

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部（大阪）
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部（東京）
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目 17 番 10 号 住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

—製品の内容・技術に関するお問い合わせ—

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00（土、日、祝を除く）
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>