

DN-Sure Gel & PCR Purification Kit

Cat No. HS-21-50, HS-50-200

2017年6月1日改訂

【目的・用途】

DN-Sure Gel & PCR Purification Kit は、アガロースゲル・PCR 産物・その他の酵素反応溶液等から DNA フラグメント (50bp~10Kb) を精製できるキットです。適用できるサンプルは 200mg 以下のアガロースゲルや 100 μ L 以下の PCR 反応溶液などです。回収率はアガロースゲルからの場合 70~85%、PCR 産物では 90~95% と高収率です。さらに、操作時間は、アガロースゲルからの抽出では 20 分程度、PCR 産物のクリーンアップだと 10 分程度と非常に迅速に使用できます。

【特徴】

- 1) 300mg 以下のアガロースゲルから 70~85% の回収率
(操作時間約 20 分)
- 2) 100 μ L 以下の PCR 産物から 90~95% の回収率
(操作時間約 10 分)

【キット内容】

DN-Sure Gel & PCR Purification Kit

内容	HS-21-50 (50 回分)	HS-21-200 (200 回分)
Binding Buffer*	40mL	160mL
Wash Buffer (conc.)	8mL	45mL
Elution Buffer	5mL	20mL
Spin Column	50	200
Collection Tube	50	200

* Binding Buffer は pH 指示薬が入っているため黄色の溶液です。
pH7.5

以下で黄色、それより高い pH ではオレンジ色または紫色を呈します。

【使用期限】

室温にて 12 ヶ月 (直射日光や湿気を避ける)

【本品以外に準備が必要な試薬・器具】

- エタノール : 特級試薬をご使用ください
- マイクロピペット、ピペットチップ
- デイスポーザブル手袋
- 遠心機
- ヒートブロックもしくは温水槽 (アガロースゲルからの抽出の場合のみ)
- 1.5mL マイクロチューブ

【試薬の準備】

- ◆ Wash Buffer に下記の通り、エタノールを加え混合します。
<HS-21-50 の場合>
Wash Buffer のボトルに対して エタノール 32mL を添加
- <HS-21-200 の場合>
Wash Buffer のボトルに対して エタノール 180mL を添加
- ◆ アガロースゲルからの核酸抽出に使用する場合、ヒートブロックもしくは温水槽を 55°C に加温しておきます。
- ◆ 特に断りのない限り、Spin Column のフタは閉めて遠心してください。

【使用方法 1】アガロースゲルからの核酸精製

1) アガロースゲルの準備

アガロースゲルの目的の部分の部分を清潔なメス等で切り出し、マイクロチューブに入れます。ゲルの重量は 300mg 以下となるようにしてください。500 μ L (※) の Binding Buffer を加え、ボルテックスで混合します。

※ アガロース濃度が 2% 以上のゲルの場合、Binding Buffer の量を 1000 μ L にしてください。

2) アガロースゲルの溶解

55°C で 10~15 分間インキュベートし、アガロースゲルを完全に溶解します (2~3 分毎にボルテックスで混合してください)。

※ 完全に溶解後、溶液の色が黄色であることを確認します。溶液の色がオレンジ色または紫色の場合は 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.0) を 10 μ L 加え、混和してください。溶液の色が黄色に変わります。

3) カラムへの結合

Spin Column を Collection Tube にセットし、2) のサンプルを室温まで冷却してから、800 μ L を Spin Column に移します (※)。その後、室温にて 10,000 \times g、30 秒間遠心し、通過した溶液を除去します。

※ 一度に Spin Column へアプラインする量は最大 800 μ L です。サンプル量が 800 μ L 以上の場合は、上記操作を 2 回行ってください。

4) カラムの洗浄

750 μ L の Wash Buffer (※) を Spin Column に加え、室温にて 10,000 \times g、30 秒間遠心し、通過した溶液を除去します。

※ 最初に使用する前にエタノールを必ず添加してください

5) カラムの乾燥

室温にて 10,000 \times g、3 分間遠心します。

Wash Buffer に含まれる成分が後の酵素反応等を阻害する場合がありますため、この操作により残存している Wash Buffer を完全に除去します。

6) 精製 DNA の溶出

Spin Column を新しい 1.5mL マイクロチューブに移し、40 μ L の Elution Buffer が超純水を Spin Column の膜の中央に加え、室温で 2 分間静置します。室温にて 10,000 \times g、2 分間遠心します。得られた核酸溶液は 4°C か -20°C で保存してください。

【使用方法 2】PCR 産物の精製

1) PCR 溶液の

100 μ L 以下の PCR 産物 (オイルを含んでいても良い) をマイクロチューブに入れ、5 倍量の Binding Buffer を加えてボルテックスで混合します。

※ 溶液の色が黄色であることを確認します。溶液の色がオレンジ色または紫色の場合は 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.0) を 10 μ L 加え、混和してください。溶液の色が黄色に変わります。

2) カラムへの結合

Spin Column を Collection Tube にセットし、1) のサンプルを Spin Column に移します。その後、室温にて 10,000 \times g、30 秒間遠心し、通過した溶液を除去します。

3) カラムの洗浄

750 μ L の Wash Buffer (※) を Spin Column に加え、室温にて 10,000 \times g、30 秒間遠心し、通過した溶液を除去します。

※ 最初に使用する前にエタノールを必ず添加してください

4) カラムの乾燥

Spin Column のフタを開け、室温にて 10,000 \times g、3 分間遠心します。

Wash Buffer に含まれる成分が後の酵素反応等を阻害する場合がありますため、この操作により残存している Wash Buffer を完全に除去します。

5) 精製 DNA の溶出

Spin Column を新しい1.5mL マイクロチューブに移し、40 μ L の **Elution Buffer** か超純水を Spin Column の膜の中央に加え、室温で2分間静置します。室温にて10,000 \times g、2分間遠心します。得られた核酸溶液は4 $^{\circ}$ C から-20 $^{\circ}$ Cで保存してください。

【Q&A】

Q1	<p>ゲルがなかなか溶けない</p> <p>2%以上のアガロースゲルを使用している</p> <ul style="list-style-type: none">・ 工程1) でゲルの6倍量の Binding Buffer を加える。 <p>切り出したゲルのサイズが大きすぎる</p> <ul style="list-style-type: none">・ ゲルが300mg 以上の場合、2本のチューブに分けて作業する。
Q2	<p>DNA の収率が低い</p> <p>ゲル量/PCR 産物の量が多すぎる</p> <ul style="list-style-type: none">・ ゲルが300mg 以上の場合、2本のチューブに分けて作業する。・ PCR 産物は100μL 以下にする。 <p>溶出が不適切</p> <ul style="list-style-type: none">・ 溶出に超純水を使用する場合、pH7.0~8.5であることを確認する。・ 溶出に使用する溶液をカラムメンブレンの真ん中にアプライし、確実に浸透したことを確認する。 <p>DNA フラグメントのサイズが5kbp 以上</p> <ul style="list-style-type: none">・ 溶出溶液を60$^{\circ}$Cにあらかじめ加温し使用する。
Q3	<p>目的フラグメント以外のコンタミネーション</p> <p>器具のコンタミネーション</p> <ul style="list-style-type: none">・ ゲルを切り出すメスは新しいものを使用する。 <p>DNA フラグメントの変性</p> <ul style="list-style-type: none">・ 得られたフラグメント溶液を2分間、95$^{\circ}$Cに加温し、ゆっくりと冷ます。
Q4	<p>得られたフラグメントが上手く作用しない</p> <p>エタノールのキャリーオーバー</p> <ul style="list-style-type: none">・ Wash Buffer での洗浄を2回に増やす。 <p>エタノールのキャリーオーバー</p> <ul style="list-style-type: none">・ 乾燥工程を確実に実施する。・ 乾燥工程の時間を5分に延長する。



株式会社アンテグラル

〒771-0360
徳島県鳴門市瀬戸町明神
字板屋島 124-4

<https://bio.integrale.co.jp/>

■ Mail: bio@integrale.co.jp
■ Tel: 088-683-7211
■ Fax: 088-683-7212