

Product Information

GenElute™ PCR Clean-Up Kit

製品番号 NA1020

TECHNICAL BULLETIN(使用説明書)

製品概要

GenElute™ PCR Clean-Up Kit は、一本鎖または二本鎖の PCR[†] 増幅産物 (100 bp~10 kb) を反応系の他の成分 (過剰量のプライマー、ヌクレオチド、DNA ポリメラーゼ、ミネラルオイル、塩類など) から迅速に精製するキットです。本キットはシリカ結合法とマイクロスピン法の長所を組み合わせているため、高価なレジンや有毒な有機溶媒(フェノール、クロロホルムなど)を使用する必要はありません。

DNA 精製は簡単な数ステップで完了します。まず DNA をスピンカラム中のシリカ膜に結合させます。結合した DNA を洗浄してから、夾雑物のない濃縮された DNA を選定したバッファーで溶出させます。各カラムは最大 100 µL(または 10 µg) の PCR 増幅 DNA を精製可能で、100 bp~10 kb の PCR 産物の場合、回収率は最大 95% です。残存プライマーは 99%、プライマーダイマー (<40 bp) はほとんどが除去されます。精製された DNA は酵素反応やシーケンシング(従来法または自動法)、クローニング、マイクロアレイ解析に使用できます。

キット内容/試薬

キットに含まれている試薬 (70 サンプル分)	製品番号	数量
Column Preparation Solution	C2112	60 mL
Binding Solution	B7556	40 mL
Wash Solution Concentrate	W3637	12 mL
Elution Solution	E7777	8 mL
GenElute Miniprep Binding Column	G6415	70 個
Collection Tubes, 2 mL	T7813	2×70 個

キット以外にご用意いただく試薬および器具

- 無水エタノール、製品番号 E7023 または 45,983-6
- マイクロ遠心分離機
- マイクロ遠心チューブ
- 分子生物学グレードの水、製品番号 W4502

注意事項と免責事項

GenElute PCR Clean-Up Kit は試験研究用のみを目的として販売されています。医薬品、家庭用その他試験研究以外の用途には使用できません。危険性や安全な取り扱いに関しては化学物質安全データシート(MSDS)をご覧ください。

調製

- 試薬類をそれぞれよく混合します。沈殿の有無を確認します。試薬に沈殿が生じている場合は、沈殿が溶解するまで 55~65 °C で加温し、室温に戻してから使用します。
- Wash Solution:** キット付属の Wash Solution Concentrate の全量を 48 mL の 100% エタノールで希釈します。希釈後の Wash Solution はエタノールの蒸発を防ぐため、使用後は密栓してください。

保存安定性

室温で保存してください。試薬に沈殿が生じた場合は「調製」の項を参照してください。

手順

遠心分離(スピinn)はすべて 12,000~16,000 × g で実施します(g から rpm への換算は付録 I を参照してください)。

- GenElute Miniprep Binding Column(青い O リングがついているカラム)をキット付属の回収用チューブに差し込みます。各ミニプレップカラムに 0.5 mL の Column Preparation Solution を加え、12,000 × g で 30 秒~1 分間遠心分離します。カラム通過液を捨てます。

注: Column Preparation Solution は膜への DNA 結合量を最大にし、より安定した収量が得られるようにするものです。

- PCR 反応液に対して 5 倍量の Binding Solution を加えて混合します。例えば、100 µL の PCR 反応液には 500 µL の Binding Solution を加えます。混合液をカラムに移します。カラムを最高速度(12,000~16,000×g)で 1 分間遠心分離します。カラム通過液を捨てます(回収用チューブは捨てないでください)。
- 結合カラムを回収用チューブに戻します。希釈済みの Wash Solution 0.5 mL をカラムに加え、最高速度で 1 分間遠心分離します。カラム通過液を捨てます(回収用チューブは捨てないでください)。

注: 初回使用時にはWash Solution Concentrateに必ずエタノールを加えたことを確認してください。「調製」の項を参照してください。

4. カラムを回収用チューブに戻します。Wash Solution を加えずにカラムを最高速度で 2 分間遠心分離して、余分なエタノールを除去します。カラム通過液および回収用チューブを捨てます。
5. カラムを別の 2 mL 回収用チューブに移します。50 µL の Elution Solution または水を各カラムの中央部に加えます。室温で 1 分間静置します。

トラブルシューティングガイド

問題	原因	対策
DNA の回収量が少ない	Wash Solution が正しく希釈されていない	Wash Solution Concentrate にエタノールを加えてあるかどうかを確認し、また、蒸発を防ぐため使用するごとに容器のフタをきちんと閉めてください(「調製」の項を参照してください)。
	DNA が正しく溶出されていない	DNA は Elution Solution や水のような塩濃度の低い溶液で溶出しなければなりません。 Elution Solution はフィルターの中央部に加えてください。 Elution Solution を加えてから 1 分間静置してください。
精製した DNA を用いた酵素反応がうまくいかない	DNA 溶出液に塩類が混入している	結合ステップや洗浄ステップの後の遠心分離の際、結合カラムの底部がカラム通過液に触れないようにしてください。
	溶出液にエタノールが混入している(溶出前のエタノール除去が不十分であった)	本手順のステップ 4 にあるように、必ずカラムを最高速度で 2 分間遠心分離してください。

関連製品	製品番号	関連製品	製品番号
Extract-N-Amp™ Plant PCR Kits	XNA-P XNA-P2 XNA-R	JumpStart™ REDTaq™ DNA Polymerase	D8187
		JumpStart™ REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix	P0982
Extract-N-Amp™ Blood PCR Kits	XNA-B XNA-B2 XNA-BE XNA-B2E XNA-BR XNA-B2R	JumpStart™ REDAccuTaq™ LA DNA Polymerase Mix	D1313
		REDAccuTaq™ LA DNA Polymerase	D4812
AccuTaq™ LA DNA Polymerase	D8045	Enhanced Avian HS RT-PCR Kit	HSRT-20 HSRT-100
Taq DNA Polymerase	D1806 D4545	Enhanced Avian First Strand Synthesis Kit	STR-1
KlenTaq LA DNA Polymerase Mix	D5062	Enhanced Avian Reverse Transcriptase	A4464
JumpStart™ Taq DNA Polymerase	D9307 D4184		

付録 I

注: 遠心速度はすべて g 単位で記載されています。 g から rpm への換算は表 1 を参照してください。お手元の遠心分離機/ローターで所定の g が得られない場合は、実施可能な最大の g で遠心分離を行い、その g に応じて遠心時間を延長してください。遠心分離はカラムからすべての液体が排出されるまで行います。

表 1. 一般的なローターでの遠心力(単位は g)から rpm への換算表

遠心分離機	ローター	チューブ 本数 (最大)	半径 (cm)	12,000× g / 相当する rpm	16,000× g / 相当する rpm
Eppendorf社の型番					
5410		12	5.8	13,555	15,652
5415C	F45-18-11	18	7.3	12,124	14,000
5415D&R	F45-24-11	24	8.3	11,392	13,155
5417C,D,&R	F45-30-11	30	9.5	10,634	12,279

一般的な遠心分離機およびローターについては、上表に示された rpm 単位の遠心速度を参照してください。この表にないローターについて正確な rpm を計算するには次式を用います。

$$RPM = \sqrt{RCF / 1.118 \times 10^{-5}} r$$

RCF=必要な重力加速度(相対遠心力)(単位は g) ; r =ローターの半径(cm) ;

RPM=必要な g を得るための 1 分間あたりの回転数

[‡]PCR プロセスは Hoffman-LaRoche, Inc. が保有する特許で保護されています。

CP/JWM 8/04

Sigma ブランド製品は Sigma-Aldrich, Inc.を通じて販売されています。

Sigma-Aldrich, Inc. は同社製品がこの文書および他の Sigma-Aldrich 発行文書に含まれる情報に合致していることを保証します。お客様の個別の用途と製品の適合性についてはお客様にてご判断ください。収載の品目、製品情報、価格などは予告なく変更される場合がございます。納品伝票または同梱の内容明細書の裏面をご覧ください。