



DNA Fragment Purification Kit

MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-

([Code No. NPK-601](#))

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD.
Bioproducts Sales and Marketing Department
OSAKA JAPAN

TOYOBO

A3276K

【目次】

[1]はじめに.....	(1)
[2]精製フロー.....	(2)
[3]キットに含まれるもの.....	(3)
[4]キットの他に必要なもの.....	(3)
[5]DNA溶液からの回収.....	(4)
[6]アガロースゲルからの回収.....	(6)
[7]トラブルシューティング.....	(8)
[8]関連商品.....	(9)

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。診断・臨床用試薬として使用しないでください。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。人体に有害な試薬も含有しておりますので、保護具を着用するなど各試薬に添付されている注意書きを厳守してください。

[1]はじめに

MagExtractor™-PCR & Gel Clean up-は、カオトロピック剤の存在下で核酸がシリカに吸着する性質¹⁾を利用したマニュアル用DNAフラグメント精製キットです。本キットは磁性化したシリカ粒子を採用しており、マグネチックスタンドを使用することで、煩雑な遠心操作を最小限に減らし、迅速なDNA断片の精製が可能です。

1) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(2) 615-619(1979)

特徴

- ・ DNA溶液(約100 μ l)、およびTAE・TBEアガロースゲル(約0.3g)よりDNAフラグメント(約100bp~50kbp)を平均収率60~70%で回収することができます。
- ・ DNA溶液から約5分で、アガロースゲルから15分以内でDNAフラグメントを回収することができます。
- ・ 室温でのアガロースゲル溶解が可能のため、ヒートブロックなどの準備は不要です*。

*回収液に混入するエタノールを完全に除去する場合はヒートブロック(55 $^{\circ}$ C)が必要となります。

キットの用途

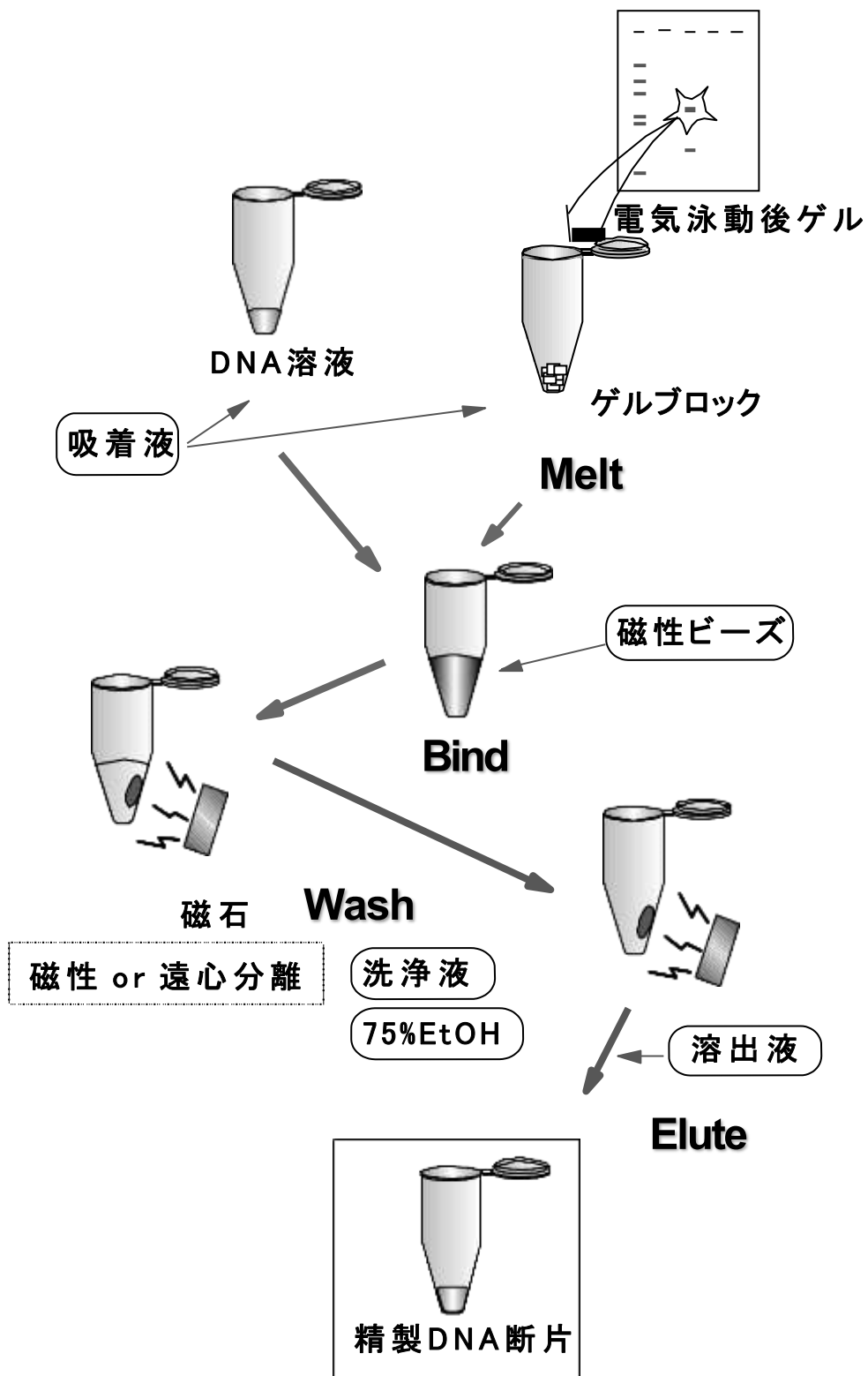
- ・ 脱塩、dNTPsの除去
- ・ プライマー除去
- ・ 酵素(アルカリホスファターゼなど)の除去
- ・ 電気泳動後のアガロースゲルブロックからのDNAの回収

回収したDNAの用途

- ・ RI・Non-RIシーケンシング
- ・ 制限酵素反応
- ・ ラベリング
- ・ ハイブリダイゼーション
- ・ ライゲーション
- ・ 形質転換
- ・ 増幅反応

[2]精製フロー

MagExtractor™-PCR & Gel Clean up-を使った精製フローを以下に示します。



[3]キットに含まれるもの

本キットには以下の試薬が含まれています。(200回用)

	試薬量	保存条件
吸着液*	88mL	遮光して室温保存
洗浄液*	132mL	室温保存
磁性ビーズ	8.5mL	室温保存

*吸着液、洗浄液は低温で結晶が析出することがあります。手で暖めながら転倒混和により結晶を溶解させた後、ご使用ください。また、吸着液、洗浄液はタンパク質変性剤を含有しています。取扱いには十分に注意し、体に付着した場合は速やかに流水にて洗浄してください。

[4]キットの他に必要なもの

1. 試薬

- ・ 滅菌蒸留水 <溶出液>
- ・ 75%エタノール <洗浄用>

2. 器具、機材

- ・ 1.5mLマイクロチューブ用マグネチックスタンド*
- ・ 簡易卓上遠心機
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ ヒートブロック55°C(回収液に混入するエタノールを完全に除去する場合)

*弊社マグネチックスタンドMagical Trapper[®](Code No.:MGS-101)などがご使用になれます。

[5]DNA溶液からの回収

1. はじめに

- ・ 本プロトコールは、DNA溶液（約100 μ L）からDNAフラグメントを回収する場合に使用します。
- ・ 回収可能なDNAのサイズは約100bp～50kbです。また、40bp以下の核酸はほぼカットされます。
- ・ 磁性ビーズの最大吸着量はビーズ30 μ Lあたり約5 μ gです。使用の際は2.5 μ g程度を目安として使用してください。
- ・ PCR反応液、制限酵素反応溶液、アルカリホスファターゼ反応液など種々の反応液からDNAの回収が可能です。
- ・ 回収したDNAは、制限酵素処理、シーケンシング、ライゲーション、ラベリング、ハイブリダイゼーションなど多くの反応に使用可能です。

2. プロトコール

DNA溶液（100 μ L）¹⁾

↓← 400 μ L 吸着液

↓← 30 μ L 磁性ビーズ²⁾

↓時々ボルテックスにて攪拌しながら、約1～2min.放置（室温）

B/F（固/液）分離³⁾

↓←（600 μ l 洗浄液）⁴⁾

↓ボルテックスミキサーにて10sec.攪拌

B/F分離³⁾

↓← 1mL 75%エタノール⁴⁾

↓ボルテックスミキサーにて10sec.攪拌

B/F分離³⁾

スピンドウン、完全に上清を除去

（マイクロチューブの蓋をあげ、55 $^{\circ}$ C、5min.放置：乾燥）⁴⁾

↓← 25～100 μ l 蒸留水

↓ボルテックスミキサーにて10sec.攪拌

（粒子が十分にほぐれない場合は、ピペッティングにて粒子をほぐしてください）

↓ 2min.放置

B/F分離、上清回収⁵⁾

- 1) ミネラルオイルをなるべく持ち込まないようにしてください。
- 2) 磁性ビーズは使用前に良く懸濁してからご使用ください。
- 3) チューブをマグネチックスタンドにセットすることにより磁性ビーズを磁石に寄せ、続いてピペットにて上清を取り除きます。エタノール洗浄の場合は上清の除去はデカンテーションでも構いません。
B/F分離には1.5mLマイクロチューブ用マグネチックスタンドのご使用をおすすめしますが、簡易卓上遠心機にて6,000r.p.m.程度、5sec.の遠心により分離を行うことも可能です。gは遠心機のローターの径により変化しますので、効率よく粒子が集まり、かつ凝集しすぎない程度に回転数を調整してください。
- 4) 3.の表を参照してください。
- 5) 回収液への磁性ビーズの多少の混入は次反応を阻害することはありませんが、吸光測定の場合などはスピンドウンにより除去してください。

3. 工程の省略、精製スケールについて

・洗浄工程、加熱工程は省略可能です(下表を参考にしてください)。

用途	洗浄		乾燥	備考
	洗浄液	75%エタノール		
シーケンシング、制限酵素反応、ライゲーションなどの前処理	—	1回	—	標準プロトコールです。回収した核酸は、Low buffer系の制限酵素での切断にもご使用になれます。
塩の持ち込みが影響する場合	—	2回	—	吸着液、洗浄液は、高濃度の塩を含有しています。
エタノールの持ち込みが影響する場合	—	1回(2回)	55°C、5min.	エタノールの影響を受けやすい反応の前処理時に使用します。
酵素を念入りに除去したい場合	1回	1回(2回)	—	アルカリホスファターゼの除去などに使用します。
核酸の濃度を吸光度にて正確に定量したい場合	1回	2回	—	吸着液は、紫外部に吸収を有する物質を含有しています。

・DNA溶液の液量に応じて、キット添付の吸着液、洗浄液、磁性ビーズの量を比例的に減らして使用することが可能です。その際、75%エタノール量は、特に減らす必要はありません。

[6]アガロースゲルからの回収

1. はじめに

- ・ 本プロトコールは、TAEもしくはTBEアガロースゲル(約0.3g)からDNA断片を回収する場合に使用します。本プロトコールはアガロース濃度が2%以下のゲルを対象としています。2%以上のゲルを用いる場合は、ゲル量を0.3g以下にして使用することをお勧めします。また、特に低融点アガロースを使用する必要はありません。
- ・ 回収可能なDNAのサイズは約100bp~50kbです。
- ・ 回収したDNAは、主に、ライゲーション、ラベリング、シーケンシングなどの反応に使用可能です。

2. プロトコール

アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色。

↓

UV照射下(Long wave)で目的のバンドをなるべく小さくなるようにカッターナイフ、メスなどを用いて切り出す。

↓

切り出したアガロースを細かくスライスし、1.5mLマイクロチューブに移す。(この時秤量し、0.3g以上の場合は分割する)¹⁾

↓ ← 400 μ l 吸着液

ゲルが完全に溶解するまで時々攪拌しながら室温に放置。²⁾

↓ ← 30 μ l 磁性ビーズ³⁾

↓ 時々ボルテックスにて攪拌しながら、2min.放置(室温)

B/F分離⁴⁾

↓ ← 600 μ l 洗浄液

↓ ボルテックスミキサーにて10sec.攪拌

B/F分離⁴⁾

↓ ← 1mL 75%エタノール⁵⁾

↓ ボルテックスミキサーにて10sec.攪拌

B/F分離⁴⁾

スピンドウン、完全に上清を除去

(マイクロチューブの蓋をあげ、55°C、5min.放置:乾燥)⁵⁾

- ↓←25~100μL 蒸留水
 ↓ボルテックスミキサーにて10sec.攪拌
 (粒子が十分にほぐれない場合は、ピペッティングにて粒子をほぐしてください)
 ↓ 2min.放置
 B/F分離、上清回収⁶⁾

- 1)アガロースゲルは細かくスライスした方が溶解が容易です。
 - 2)アガロースゲルが溶解しにくい場合や早く溶解させたい場合は、55°Cにて5min.程度加温してください。
 - 3)磁性ビーズは使用前に良く懸濁してからご使用ください。
 - 4)チューブをマグネチックスタンドにセットすることにより磁性ビーズを磁石に寄せ、続いてピペットにて上清を取り除きます。エタノール洗浄の場合は上清の除去はデカンテーションでも構いません。
- B/F分離には1.5mLマイクロチューブ用マグネチックスタンドの使用をおすすめしますが、簡易卓上遠心機にて6,000r.p.m.程度、5sec.の遠心により分離を行うことも可能です。gは遠心機のローターの径により変化しますので、効率よく粒子が集まり、かつ凝集しすぎない程度に回転数を調整してください。
- 5)3.の表を参照してください。
 - 6)回収液への磁性ビーズの多少の混入は次反応を阻害することはありませんが、吸光度測定の場合などはスピンドウンにより除去してください。

3. 工程の省略、精製スケールについて

・洗浄工程、加熱工程は省略可能です(下表を参考にしてください)。

用途	洗浄		乾燥	備考
	洗浄液*	75%エタノール		
ライゲーション、シーケンシングなど	1回	1回	—	標準プロトコールです。
塩の持ち込みが影響する場合	1回	2回	—	吸着液、洗浄液は、高濃度の塩を含有しています。
エタノールの持ち込みが影響する場合	1回	1回(2回)	55°C、5min.	エタノールの影響を受けやすい反応の前処理時に使用します。
核酸の濃度を吸光度にて正確に定量したい場合	1回	2回	—	吸着液は、紫外部に吸収を有する物質を含有しています。

*アガロースゲルから核酸を回収する場合は、洗浄液での洗浄が必要です。

- ・ アガロースゲル量に応じて、キット添付の吸着液、洗浄液、磁性ビーズの量を比例的に減らして使用することが可能です。その際、75%エタノール量は特に減らす必要はありません。

[7]トラブルシューティング

1. 収量が低い

原因	対策
エタノールの除去が不完全	スピンドウン後、75%エタノールを注意深く除去してください。
溶出が不十分	10mM Tris-HCl(pH8.0) または、TE bufferにて溶出した方が溶出効率が上昇することがあります。また、55°Cにて2min.ほど加温することによりさらに溶出効率を上昇させることができます。
吸着時間が不適切	吸着を過剰に行うと収量が低下することがあります。至適吸着時間は、DNA溶液からの場合は1～2min.、ゲルからの場合は約2min.です。
溶出時の攪拌が不十分	溶出時に磁性ビーズの懸濁が不十分な場合、収量が低下することがあります。スピンドウンした後などは、ビーズが底に固まってしまうことがありますので良くほぐすようにしてください。特に、アガロースゲルからの精製ではビーズが分散しにくくなる傾向にあります。
アガロースゲルの量が0.3gを越えている	アガロースゲルの量を減らしてください。
2%以上のアガロースを使用している	アガロースゲルの量を減らしてください。
洗浄液による洗浄を行っていない	アガロースゲルからDNAを回収するときは、必ず洗浄液による洗浄を行ってください。

2. 回収した核酸の吸光度による定量が不正確

原因	対策
洗浄が足りない	吸着液には紫外部に吸収を有する物質が含有されています。回収した核酸を定量する場合は、洗浄液および75%エタノールによる洗浄を行ってください。
吸着液を持ち込んでいる	吸着液には紫外部に吸収を有する物質が含有されています。吸着液の除去を注意深く行ってください。チューブのキャップなどに付着した吸着液をティッシュなどで拭うことにより改善されることがあります。

回収した核酸を用いた反応がうまくいかない

原因	対策
塩が反応を阻害している	75%エタノール洗浄を2回に増やして行ってください。吸着液、洗浄液は、高濃度の塩を含有していません。
エタノールが反応を阻害している	エタノール乾燥を行うプロトコールに従って行ってください。
酵素が完全に除去できていない	反応液中のアルカリホスファターゼなどの酵素を完全に除去する場合は、洗浄液および75%エタノールによる洗浄を行ってください。
反応に用いている酵素量が少ない	アガロースゲルから回収した核酸の場合、反応に用いる酵素量を通常より濃く設定することにより良好な結果が得られることがあります。
使用しているアガロースのグレードが低い	高グレードのアガロースを使用してください。
アガロースゲルからバンドを切り出す際に紫外線を当てすぎている	Long wave(365nm付近)の紫外線にて切り出しを行ってください。

[8] 関連商品

品名	内容	Code No.
Magical Trapper®<磁性ビーズ分離用スタンド>	1台	MGS-101



【製造・販売元】

— 価格・在庫に関するお問い合わせ —

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部 (大阪)
〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部 (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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <https://lifescience.toyobo.co.jp/>