

HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit



Cat. No. **YDF100**
100 ミニプレップ

Cat. No. **YDF300**
300 ミニプレップ

DF Buffer: 80ml
Wash Buffer (conc.): 25ml*
Elution Buffer: 10ml
DF Column: 100 本
Collection Tube: 100 本

DF Buffer: 200ml
Wash Buffer (conc.): 40ml**
Elution Buffer: 30ml
DF Column: 300 本
Collection Tube: 300 本

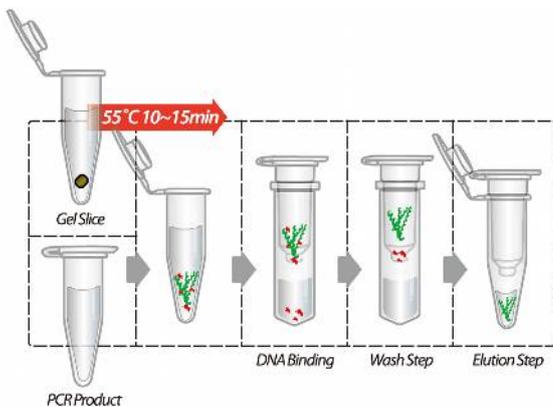
対象サンプル: ゲル 200mg、PCR 溶液 100μl
収量: ゲル 70~80%、PCR 溶液 80~90%
実効結合能: 約 10μg
実効プライマー除去長: <25bp
所要時間: 20分
溶出量: 20~50μl
有効 DNA 断片長: 50bp~10kb

* 初めにご使用になる前に、Wash Buffer にエタノールを 4 倍量 (100ml) 加えてください。

** 初めにご使用になる前に、Wash Buffer にエタノールを 4 倍量 (160ml) 加えてください。

DF Column: メンブレンと一体になった蓋付きカラム
Collection Tube: 蓋の無い樹脂製チューブ

1



ゲルスライス / PCR 産物 → DNA 解離 → DNA 結合 → 洗浄 → DNA 溶出

ゲル用プロトコール

DNA 解離

1. 目的の DNA 断片を含むアガロースゲルスライスを作製し、余分なゲルを除去してゲルスライスを可能な限り小さくする。
2. ゲルスライス 300mg までをエッペンチューブに移し入れる。(エッペンチューブは本製品の付属品ではありません。)
3. DF Buffer 500μl をサンプルに加え、ボルテックスにかけて混ぜ合わせる。
4. ゲルスライスが完全に溶解するまで、55°C で 10~15 分間インキュベートする。インキュベーション中、2~3 分毎にチューブをひっくり返す方法で混ぜ合わせる。

DNA 結合

5. Collection Tube 内に DF Column を設置する。
6. 4 で得られたサンプル混合液 800μl を DF Column に注ぐ。
7. 遠心分離機にフルスピード (10,000xg, 13,000rpm) で 30 秒間かける。
8. 排液を捨て、DF Column を Collection Tube 内に戻す。
9. サンプル混合液が 800μl 以上ある場合は、この DNA 結合の処理 (5~8) を繰り返す。

3

HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit

概要

HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit は、アガロースゲルや PCR などの酵素反応液から DNA 断片 (50bp~10kb) を回収・濃縮するために設計されています。複数の用途に使用できる多収量 DNA/ミニカラムシステムを実現した、非常に優れた製品です。

本製品では、カオトロピック塩 (チオシアン酸 Guanidinium) を使用してアガロースゲルを溶解し、酵素を変性させます。カオトロピック塩溶液中の DNA 断片は、スピンカラム内のグラスファイバー充填材に結合します。不純物を洗い流した後、低塩濃度の溶出緩衝液を加えることにより、精製された DNA 断片が抽出されます。フェノール抽出やアルコール沈殿などの処理を行わなくても、混合液中のカオトロピック塩や酵素、一体化していないヌクレオチドを除去することができます。

品質管理

HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit はロット毎に品質試験を行っています。

DNA の回収率については、水溶液またはアガロースゲルから様々な異なるサイズの DNA 断片を単離する方法で試験を行っています。また、精製された DNA は、アガロースゲルを用いた分析により確認を行っています。

参考文献 (1) Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615.

注意事項 (1) DF Buffer は、刺激性があり有害な チオシアン酸 Guanidinium を含有しています。ご使用中は必ず、白衣、使い捨ての手袋、防護用眼鏡を着用してください。

2

HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit

洗浄

10. DF Column に (エタノールで薄めた) Wash Buffer 600μl を注ぐ。
11. 遠心分離機にフルスピード (10,000xg, 13,000rpm) で 30 秒間かける。
12. 排液を捨て、DF Column を Collection Tube 内に戻す。

※ TAE ゲルを使用する場合は、次の 13 の処理を行ってください。TBE ゲルを使用する場合は、10~12 の処理を再度行ってください。(ホウ酸は除去するのが難しく、その後の実験に影響する可能性があるため、洗浄処理を二度行うことを推奨します。)

13. 再度、遠心分離機にフルスピード (10,000xg, 13,000rpm) で 2 分間かけて、カラム充填材を乾かす。

DNA 溶出

14. 乾いた DF Column を新しいエッペンチューブに移し入れる。(エッペンチューブは本製品の付属品ではありません。)
15. カラム充填材の中央に、Elution Buffer または水を 20~50μl 加える。
16. Elution Buffer または水がカラム充填材に吸収されるまで 2 分間、遠心管を立てて置く。
17. 遠心分離機にフルスピード 2 分間かけて、精製された DNA を溶出させる。

4

PCR 溶液用プロトコール

サンプル前処理

1. PCR 産物 (100µl まで) をエッペンチューブに移し入れる。(エッペンチューブは本製品の付属品ではありません。)
2. サンプル量の 5 倍の DF Buffer を加え、ボルテックスにかけて混ぜ合わせる。

DNA 結合

3. Collection Tube 内に DF Column を設置する。
4. 2 で得られたサンプル混合液を DF Column に注ぐ。
5. 遠心分離機にフルスピード (10,000xg, 13,000rpm) で 30 秒間かける。
6. 排液を捨て、DF Column を Collection Tube 内に戻す。

洗浄

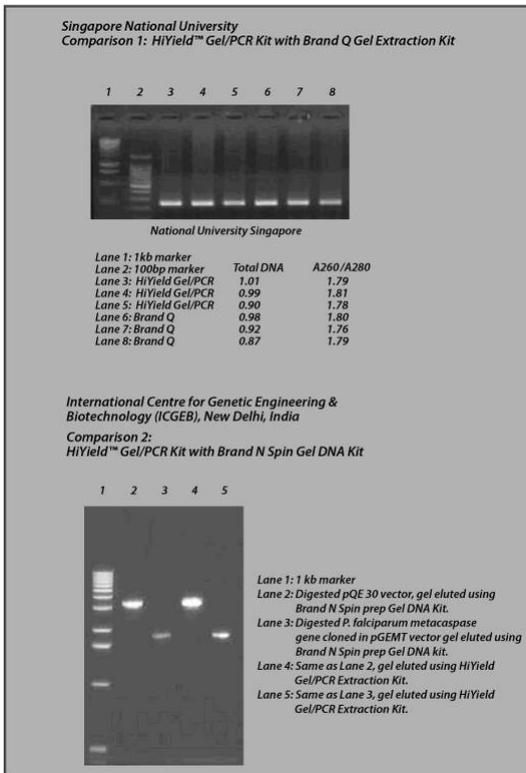
7. DF Column に (エタノールで薄めた) Wash Buffer 600µl を注ぐ。
8. 遠心分離機にフルスピード (10,000xg, 13,000rpm) で 30 秒間かける。
9. 排液を捨て、DF Column を Collection Tube 内に戻す。
10. 再度、遠心分離機にフルスピード (10,000xg, 13,000rpm) で 2 分間かけて、カラム充填材を乾かす。

DNA 溶出

11. 乾いた DF Column を新しいエッペンチューブに移し入れる。(エッペンチューブは本製品の付属品ではありません。)
12. カラム充填材の中央に、Elution Buffer または水を 20~50µl 注ぐ。
13. Elution Buffer または水がカラム充填材に吸収されるまで 2 分間、遠心管を立てて置く。
14. 遠心分離機にフルスピード (10,000xg, 13,000rpm) で 2 分間かけて、精製された DNA を溶出させる。

トラブルシューティング

問題	考えられる原因	解決策
DNA断片の収量が少ない	DNA断片の長さが5kb以上	Elution Buffer を 60°C に温めてから使用してください。
	DNA 溶出不良	酸性条件下では DNA 溶出が上手く行かない場合があります。溶出に最適な pH は 7.0~8.5 です。
	DNA 溶出が不完全	30µl 以上の Elution Buffer がカラム充填材の中央に注がれていることを確認してください。遠心分離機にかける前に、Elution Buffer を全てメンブレンに吸収させてください。
	繰り返し使用された、あるいは、不適切な pH の TAE Buffer や TBE Buffer が使われている	TAE Buffer や TBE Buffer を繰り返し使用することは pH 上昇の原因となります。未使用の TAE Buffer や TBE Buffer を使用してください。
抽出された DNA を用いたその後の実験がうまくいかない	抽出された DNA に塩が混入している	Wash Buffer によるカラムの洗浄を 2 回行ってください。
	DNA断片が変性し一本鎖となっている	チューブを 95°C でインキュベートした後、室温でゆっくり冷やすことにより、再アニーリングを行ってください。
抽出された DNA 中に非特異的 DNA 断片が見られる	ゲルスライスを作製する際メスまたはかみそりの刃が汚れていた	ゲルスライスを作製する際、未使用の、あるいは、清潔な、メスやかみそりを使用してください。
	高濃度アガロースゲル (2.5%超) を使用した ※ 高濃度アガロースゲルのご使用はお勧めしません	ゲルの 2 倍量の DF Buffer を加え、ゲルスライスが完全に溶解するまで 1~2 分毎に混ぜ合わせながらインキュベートしてください。
ゲルスライスが溶解しにくい	ゲルスライスが大きすぎる (300mg 超)	2 本以上のカラムを使用してください。



製品の取扱い方法についてのお問合せは、以下の弊社窓口までご相談ください。

RBC Bioscience 社製品 日本総代理店
有限会社 サイトロブ
マーケティング営業部

〒113-0031 東京都文京区根津 2-4-2-1 階
Tel: 03-5842-1749
Fax: 03-5842-1926
E-mail: rbc@scitrove.co.jp