

FastGene™ ゲル/PCR抽出キット

Cat.No. FG-91202 (100 preps) , FG-91302 (300 preps)



目次

コンポーネント.....	2
保管と準備	2
安全にご使用していただくために —リスクとアドバイス—	3
キットの仕様	3
プロトコル	
ゲルバンドカッターによるアガロースゲルからのゲル切片の切り出し.....	4
アガロースゲルからのDNA抽出	5
PCR産物の精製	6
サポートプロトコル	
PCR産物の精製.....	7

コンポーネント

FastGene™ ゲル /PCR 抽出キット	FG-91202 (100 preps)	FG-91302 (300 preps)
FastGene™ GP カラム	100 個	300 個
2 mL コレクションチューブ	100 個	300 個
結合バッファー GP1	80 mL	200 mL
洗浄バッファー GP2 濃縮液	25 mL	40 mL
溶出バッファー GP3 * ¹	10 mL	30 mL
FastGene™ ゲルバンドカッター (トライアルキット)	5 本	5 本
核酸染色試薬		
MidoriGreen Advance * ² (トライアルキット)	50 µL	50 µL
MidoriGreen Direct * ² (トライアルキット)	50 µL	50 µL

*¹ 溶出バッファーの組成は次のとおりです：10 mM Tris-Cl, pH 8.5 (EDTAは含まれておりません)

*² 操作方法は別紙の取扱説明書をご参照ください。

キットに含まれないアイテム

試薬：96-100% エタノール

消耗品：1.5 mL 遠心チューブ

 ディスプレイブルピペットチップ

装置：マニュアルピペット、遠心チューブ用遠心機、ヒートブロック、ボルテックスミキサー、防護用品 (白衣、グローブ、ゴーグル)

保管と準備

FastGene™ ゲル/PCR抽出キットは、室温 (15–25°C) にて湿気を避けて保管して下さい。この条件でキットを保管した場合、最長12カ月間は性能と品質が落ちることなく安定性が保たれます。バッファーを使用する前には、沈殿の有無を確認し、必要に応じて37°Cで再溶解してください。

プロトコルを開始する前に、以下の準備をしてください。

FastGene™ ゲル /PCR 抽出キット	FG-91202 (100 preps)	FG-91302 (300 preps)
洗浄バッファー GP2 濃縮液	100 mL のエタノール (96–100%) を添加混合します	160 mL のエタノール (96–100%) を添加混合します

安全にご使用いただくために —リスクとアドバイス—

警告：FastGene™ゲル/PCR抽出キットは、研究目的での使用に限られます。人や動物の疾病診断目的には、ご使用いただけません。化学物質を取り扱う際は常に、実験に適した白衣、使い捨てグローブ、保護ゴーグルを着用してください。本キットの使用は、ラボ実験の訓練を受けた方が、医薬品安全性試験実施基準に基づいて行うことを強く推奨いたします。

FastGene™ゲル/PCR抽出キットの以下のコンポーネントには、下記の物質が含まれております。

結合バッファー GPI

チオシアン酸グアニジンを含みます：刺激物

キットの仕様

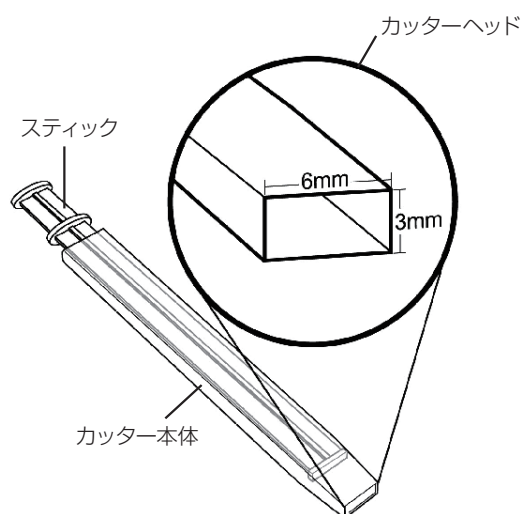
FastGene™ゲル/PCR抽出キットは、アガロースゲルからのDNA抽出と、PCR産物の精製を目的として開発されました。

	ゲル抽出	PCR クリーンアップ
最大サンプル量	ゲル切片 300 mg	PCR 反応液 100 µL
ゲル	< 2.5% TAE または TBE	—
通常の回収率	70-80%	80-90%
結合容量	10 µg	10 µg
DNA フラグメントの長さ	50 bp – 10 kbp	50 bp – 10 kbp
効果的なプライマー除去	—	< 25 bp
溶出量	20-50 µL	20-50 µL
所要時間	20分*	20分

*ゲル切片の溶解時間を含みません。

プロトコル

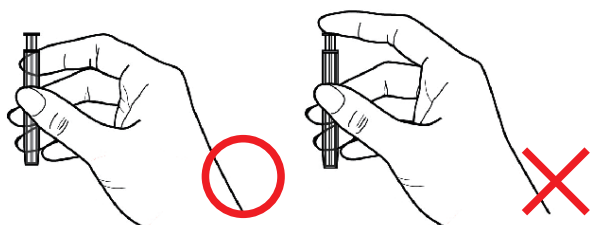
ゲルバンドカッターによるアガロースゲルからのゲル切片的切り出し



ゲル切片の重量は、アガロースゲルのパーセンテージと厚さによって変わります。ゲル切片の重量計算は、この表を参考にしてください。

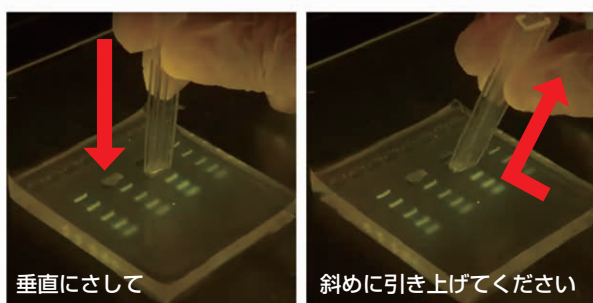
ゲルの厚さ	2% アガロースゲル	1% アガロースゲル
1.0 cm	～ 140 mg	～ 130 mg
0.8 cm	～ 120 mg	～ 110 mg
0.6 cm	～ 100 mg	～ 90 mg

Handling



左図のように、製品のカッター本体部分のみを持つようにしてください。
ピストン構造になっているスティック部分に指等が触れてしまうと、回収したゲルが落ちる可能性が高くなります。

ゲルをUVイルミネーター上に置き、電源を入れます。
それからカッターを用いてDNAバンドを直接カットします。







ゲルバンドカッターをゲルに垂直に押し当て、少し手前に傾けながら引き上げてください。
ゲルバンドカッターを斜めに引き上げると取り込んだゲルが落ちにくくなります。

スティックを押してゲルを遠心チューブに押し出します。



アガロースゲルからのDNA抽出

操作を開始する前に、洗浄 Buffer GP 2が「保管と準備」の手順（2ページ）に従って用意されていることをご確認ください。
別途特別な記載がない限り、通常の卓上型微量遠心機での遠心は13,000 rpm (11,000 – 18,000 × g)で行います。

ゲルの分離	
<ul style="list-style-type: none">FastGene™ ゲルバンドカッターまたは清潔なメスを用いてアガロースゲルからDNAフラグメントを切り出します（アガロースの濃度は<2.5%を推奨します）。ゲル切片をできるだけ少なくするため、余分なアガロースは取り除きます最大で300 mgのゲル切片を遠心チューブに移します（遠心チューブはキットに含まれておりません）。500 µLの結合バッファーGP1をサンプルに加え、ボルテックスミキサーで攪拌します。ゲル切片が完全に溶解するまで、55℃で10-15分間インキュベートします。インキュベーションの間、2-3分毎にチューブを転倒混和します。	
DNAの結合	
<ul style="list-style-type: none">FastGene™ GP カラムをコレクションチューブ内に入れます。前ステップでのサンプル溶液を最大800 µL、FastGene™ GPカラムに分注し、13,000 rpm で30秒間遠心機にかけます。カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ GPカラムをコレクションチューブに戻します。 <p>注意：もしもサンプル溶液が800 µLを超える場合、DNA結合の手順を繰り返してください。</p>	
洗浄	
<ul style="list-style-type: none">600 µLの洗浄バッファーGP2をFastGene™ GPカラムに加え、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ GPカラムをコレクションチューブに戻します。 <p>注意：TAEゲルの場合、次のステップに進んでください。TBEゲルの場合、ホウ酸を完全に除去するために洗浄ステップを繰り返してください。</p>	
乾燥	
<ul style="list-style-type: none">カラムマトリックスを乾燥させるために、13,000 rpmで2分間、再び遠心機にかけます。	
DNA溶出	
<ul style="list-style-type: none">FastGene™ GPカラムを新しい遠心チューブに移します（遠心チューブはキットに含まれておりません）。20-50 µLの溶出バッファーGP3を、カラムマトリックスの中心に加えます。溶出バッファーがマトリックスに吸収されるまで、2分間そのままの状態を保持します。13,000 rpmで2分間遠心機にかけ、精製DNAを溶出します。 <p>注意：大きなフラグメント (>5 kbp) の収量は、あらかじめ温めた溶出バッファー (70℃) を用いることによって改善することが可能です。</p>	

PCR産物の精製

操作を開始する前に、洗浄 Buffer GP2が「保管と準備」の手順(2ページ)に従って用意されていることをご確認ください。
別途特別な記載がない限り、通常の卓上型微量遠心機での遠心は13,000 rpm (11,000 – 18,000 × g)で行います。

サンプルの準備	
<ul style="list-style-type: none">1 : 5の割合で、サンプルに結合バッファーGP1を加えます。(例えば40 µLのPCR反応液に対しては200 µLの結合バッファーGP1を加えます)。 <p>注意：サンプル量が40 µL以下の場合、結合バッファーGP1又はPCRグレード水を用いてサンプル量が40 µLになるよう調節してください。</p> <ul style="list-style-type: none">ボルテックスミキサーで撹拌します。PCR反応液に結合バッファーGP1を加えた総量がPCRチューブの容量を超える場合は、PCR反応液を遠心チューブに移して使用してください。(遠心チューブはキットに含まれておりません)。	
DNAの結合	
<ul style="list-style-type: none">FastGene™ GPカラムをコレクションチューブ内に入れます。前ステップのサンプル溶液をFastGene™ GPカラムに分注し、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ GPカラムをコレクションチューブに戻します。	
洗浄	
<ul style="list-style-type: none">600 µLの洗浄バッファーGP2をFastGene™ GPカラムに加え、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ GPカラムをコレクションチューブに戻します。	
乾燥	
<ul style="list-style-type: none">カラムマトリックスを乾燥させるために、13,000 rpmで2分間、再び遠心機にかけます。	
DNA溶出	
<ul style="list-style-type: none">FastGene™ GPカラムを新しい遠心チューブに移します(遠心チューブはキットに含まれておりません)。20–50 µLの溶出バッファーGP3を、カラムマトリックスの中心に加えます。溶出バッファーがマトリックスに吸収されるまで、2分間そのままの状態を保持します。13,000 rpmで2分間遠心機にかけ、精製DNAを溶出します。 <p>注意：大きなフラグメント (> 5 kbp) の収量は、あらかじめ温めた溶出バッファー (70°C) を用いることによって改善することが可能です。</p>	

PCR産物の精製

本キットでは、50 bp未満のDNAフラグメントが除去されるようバッファーが最適化されています。

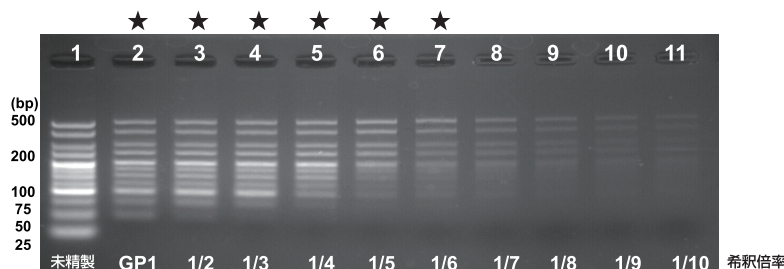
しかし、プライマーダイマーなどのより大きなサイズ (50 bp ~ 100 bp) のDNAフラグメントを除去するために、結合バッファー GP1をPCRグレード水で希釈して用いる方法があります。

最適な希釈倍率については、「回収するDNAフラグメント」と「除去したいDNAフラグメント」、それぞれのサイズと量に依存しますので、いくつかの希釈倍率の条件でお試しくささい。

下記のデータは、結合バッファー GP1希釈による事例です。

ご注意：結合バッファー GP1を希釈することで、DNAのトータル回収率は低下いたします。

〈例〉 結合バッファー GP1希釈によるDNAサイズマーカー回収サイズの違い。



レーン1 : DNAマーカー (500, 400, 300, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 25 bp)

レーン2 : Binding buffer GP1そのまま精製 (標準)

レーン3-11 : Binding buffer GP1を水で希釈して精製

電気泳動条件：4%アガロースゲル 20 min

DNAマーカー (960 ng/5 μ L)各10 μ Lをサンプルとして、Binding buffer GP1を水で1/2 ~ 1/11まで希釈した場合と標準プロトコルどおりに精製した場合で比較しました。溶出は20 μ Lで実施しました。

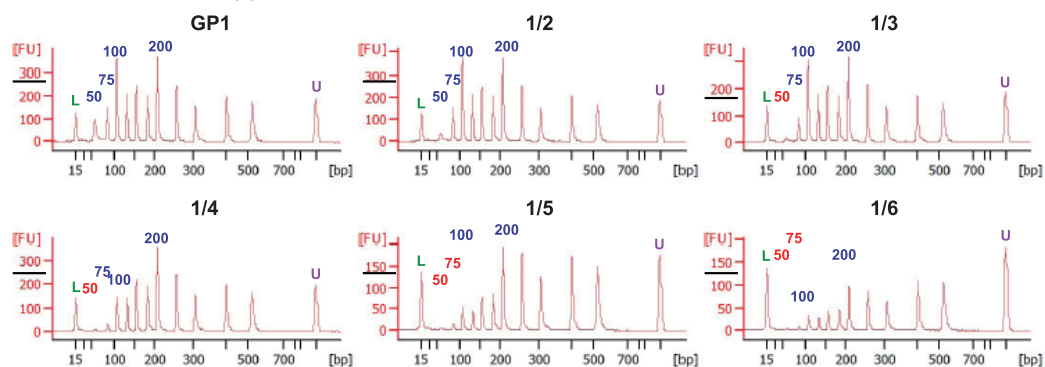
精製後のサンプルの電気泳動は、元のDNA量が等量になるように、各レーンに以下のとおり添加しました。

レーン1 : 5 μ L

レーン2-11 : 10 μ L

〈参考〉 上記の電気泳動画像レーン2 ~ 7 (★印)のサンプルを用いたAgilent Bioanalyzerでの比較データです。

L : Lower Marker U : Upper Marker



日本ジェネティクス株式会社 〒112-0004 東京都文京区後楽1-4-14 後楽森ビル18階

<https://n-genetics.com> ☎ info@genetics-n.co.jp ☎ 03 (3813) 0961 ☎ 03 (3813) 0962