

MonoFas[®]

研究用試薬キット

DNA 精製キット I

PCR 産物およびアガロースゲルからフラグメント DNA を精製用

取扱説明書



株式会社アニモス

目次

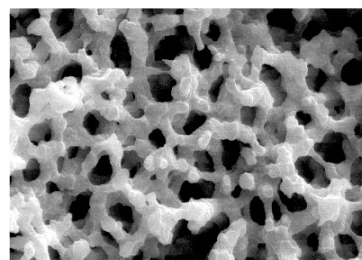
1. 製品説明	- 3 -
2. 製品内容	- 3 -
3. 製品仕様	- 4 -
4. 必要な試薬及び器具	- 5 -
5. カラム使用上の注意事項	- 5 -
6. DNA 抽出プロトコールの簡易フロー	- 6 -
7. 保存及びその他の注意	- 10 -
8. 保証期間	- 10 -

1. 製品説明

この度は MonoFas[®] DNA 精製キット I をお買い上げ頂きありがとうございます。性能を十分に発揮させるために本取扱説明書をよくお読みのうえ、正しく使用してください。本製品は PCR 産物およびアガロースゲルからフラグメント DNA を精製するためのキットです。抽出には DNA 吸着特性のあるモノリス状シリカゲル(以下、シリカモノリスと略す)を固定したスピнкаラムを用います。シリカモノリスは多孔質シリカの骨格と流路(マクロ孔)が一体となった三次元ネットワーク構造を持ちます。

本製品を用いると、以下3点の特長が得られます。

1. 通液性が良く、シリカ骨格と DNA 断片が効率よく接触できるため、PCR 産物からは約4分間で、ゲル抽出物からは約9分間でフラグメント DNA を精製することができます。
2. カラムにフィルターが不要なため、貴重なサンプルを効率よく回収し試料を傷つけません。また、保持能力が高いため、35 bp~35 kbp の DNA 断片を精製することができます。
3. DNA 断片を PCR 後の溶液およびアガロースゲルから高効率で回収できます。また、プライマー・酵素・基質・塩類が除去されます。



精製されたフラグメント DNA は、蛍光シーケンス法により 98%以上の精度で、500 塩基以上解析可能であることを確認しています。

2. 製品内容

本製品を受け取りましたら、梱包内容、スピнкаラムの外観、数量、バッファー液等に異常がないか確認してください。内容違い、数量違い、スピнкаラムの外観等に異常がありましたら、すみやかに弊社へご連絡ください。

Cat. No.	A01-0001	A01-0002	A01-0003	A01-0004
回数	25	50	100	250
スピнкаラム	25 本×1 袋	50 本×1 袋	50 本×2 袋	50 本×5 袋
Buffer A (吸着、溶解)	14 mL	28 mL	55 mL	138 mL
Buffer B (洗浄)	14 mL	28 mL	55 mL	138 mL
Buffer C (溶出)*	6 mL	6 mL	11 mL	28 mL

* 溶出液を回収するチューブは付属していません。別途 1.5 mL~2.0 mL の遠心チューブを用意して下さい。

* Buffer C は、10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA (Free) (pH 8.5)です。

MonoFas[®] DNA 精製キット I

3. 製品仕様

	PCR 産物からの精製	アガロースゲルからの精製
標準操作時間	4 分	9 分
DNA 結合量	< 10 µg	< 10 µg
アガロースゲル処理量	—	< 1g
最小溶出量	10 µL	10 µL
適応 DNA サイズ	35 bp ~ 35 kbp	35 bp ~ 35 kbp
DNA 回収率	> 85% (100 bp ~ 5 kbp) > 60% (5 kbp ~ 35 kbp)	> 80% (100 bp ~ 5 kbp) > 50% (5 kbp ~ 35 kbp)
プライマー除去率	95 %	—

○ 溶出量毎の回収率と DNA サイズ毎の回収率

溶出量 (µL)	回収率 (%)
5	83
10	89
15	91
20	88
25	83

DNA サイズ (bp)	回収率 (%)
35	65
80	80
100	85
500	93
1,000	96
2,000	94
5,000	92
10,000	96
15,000	96
20,000	95
30,000	92

※ 溶出量毎の回収率は、400 bp の
フラグメント DNA を用いています。

精製後の用途

精製したフラグメントDNAは、下記実験に用いることができます

- ・ 蛍光シーケンシング ・ 制限酵素消化 ・ ライゲーション ・ クローニング
- ・ トランスフォーメーション ・ ノーザン解析 ・ サザン解析 ・ 標識反応

4. 必要な試薬及び器具

- ① MonoFas[®] DNA 精製キット I
- ② 1.5mL 遠心チューブ
- ③ 高速マイクロ遠心機 (20,000 × g (15,000 rpm) の遠心が可能なもの) *
- ④ ドライバスと 1.5mL チューブ用ヒートブロックまたはウォーターバス (70°C で使用可能なもの)
- ⑤ ボルテックスミキサー (2,500 rpm 程度の攪拌ができるもの)
- ⑥ マイクロピペット、マイクロピペット用チップ

* 遠心機によっては使用できないケースがありますので、遠心機の仕様をご確認の上、使用してください。

また本書での以下の基本計算式をもとに相対遠心加速度 (× g) と回転数 (rpm) を算出しております。

ローターの回転半径は、遠心機によって変わりますので、遠心機取扱説明書のローター仕様ページをご確認ください。

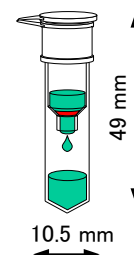
基本計算式

$$RCF = 1.118 \times R \times N^2 \times 10^{-6}$$

RCF: 相対遠心加速度 (× g) R: 回転半径 (mm) N: 回転数 (rpm)

5. カラム使用上の注意事項

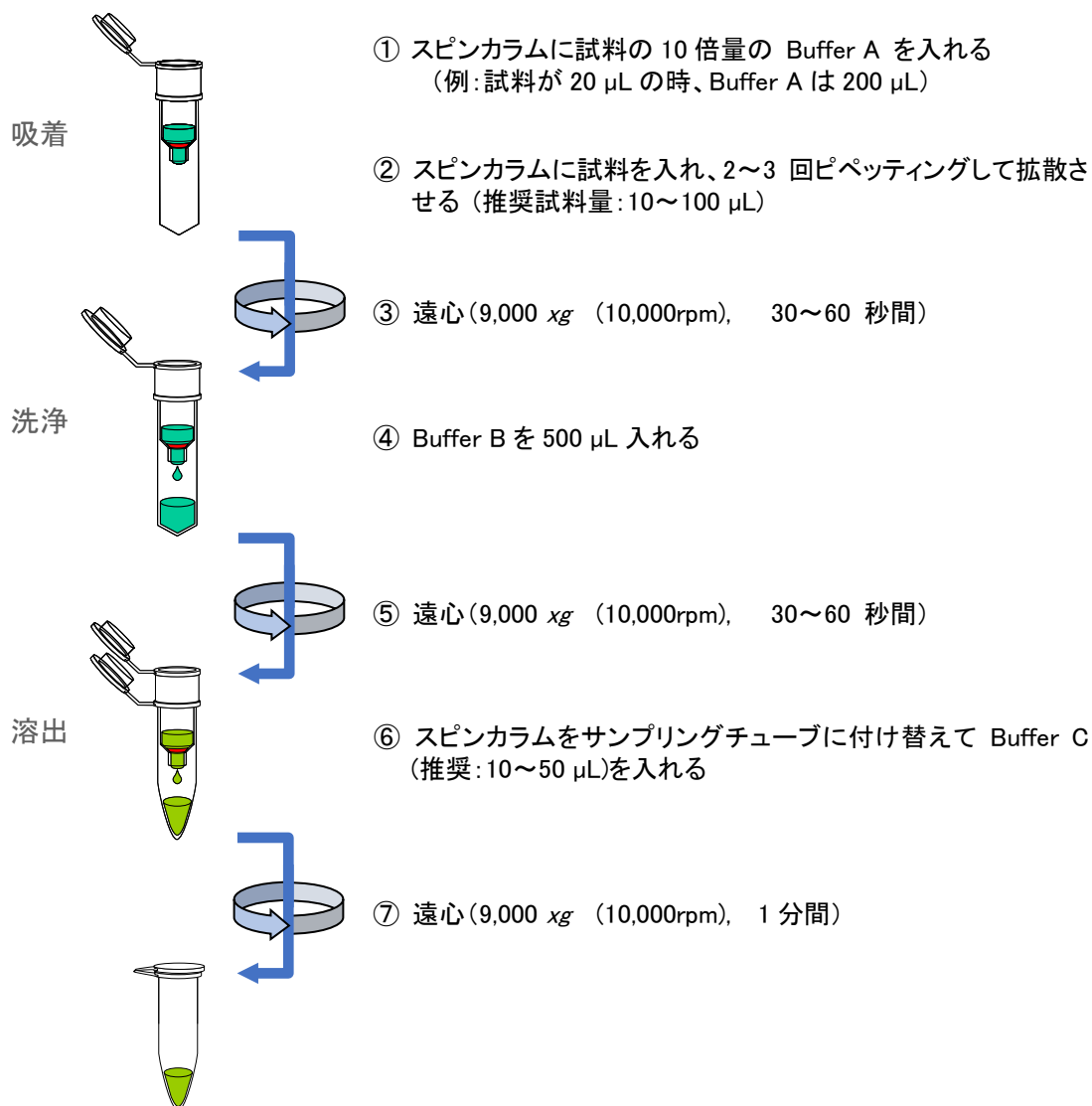
- MonoFas[®] スピнкаラムは落としたり、ぶついたりしないでください。強い衝撃を与えるとシリカモリスが割れることがあります。
- Buffer の保証期間は未開封、室温保存で購入日より 1 年間です。
- すべての工程は遠心操作で行ってください。
- オートクレーブ処理を行う場合には 110°C 以下、20 分以内で行ってください。
- MonoFas[®] スピнкаラムは従来のタイプより通液抵抗が小さくなっており、液の流出を止める場合にはスピнкаラムの蓋を閉めるようにしてください。
- 遠心機を用いる場合はチューブ類が装置の蓋などに接触しない事を確認の上ご使用ください。サイズは右図をご参照下さい。
- 遠心操作時はチューブの蓋を開けた状態で使用してください。蓋を閉めた状態では、スピнкаラム内が陰圧になるためスムーズに通液されません。
- MonoFas[®] スピнкаラムは遠心機以外に、GL-SPE 吸引マニホールドや、QIAvac6c (ルアーアダプター) 吸引マニホールドなどの固相抽出用アクセサリーがご利用になれます。
※ GL-SPE 吸引マニホールドはジーエルサイエンス社の、QIAvac6s はキアゲン社の製品です。
- 精製 DNA を分子生物学的操作に用いる場合には、十分に滅菌された容器や滅菌水などを用いてください。
- 本製品は消耗品ですので再使用はできません。
- ご所属の機関の倫理委員会の規定に従い作業してください。また、カラムの廃棄の際には、遺伝情報が残らないことと、感染症への配慮を考慮してください。
- 余ったバッファーの廃棄方法は、安全データシート (SDS) に記載された通り廃棄ください。



6. DNA 抽出プロトコルの簡易フロー

① PCR 産物の精製プロトコール

以下のプロトコールは、PCR 産物からの増幅 DNA 精製に対応しています。すべての工程において、スピнкаラムの蓋は、開けた状態で遠心操作を行ってください。（蓋を閉めた状態では、スピнкаラム内が陰圧になるためスムーズに通液されません。）



<注意事項>

工程①: PCR 産物と Buffer A の混合は不要です。スピнкаラムに Buffer A を入れて長時間静置すると漏出する場合がありますが、回収率に影響はありません。

工程③: 試料を 50 μL 以上処理する場合は、吸着後(工程③の後)に廃液用チューブ中の溶液を取り除き、洗浄工程に移行してください。

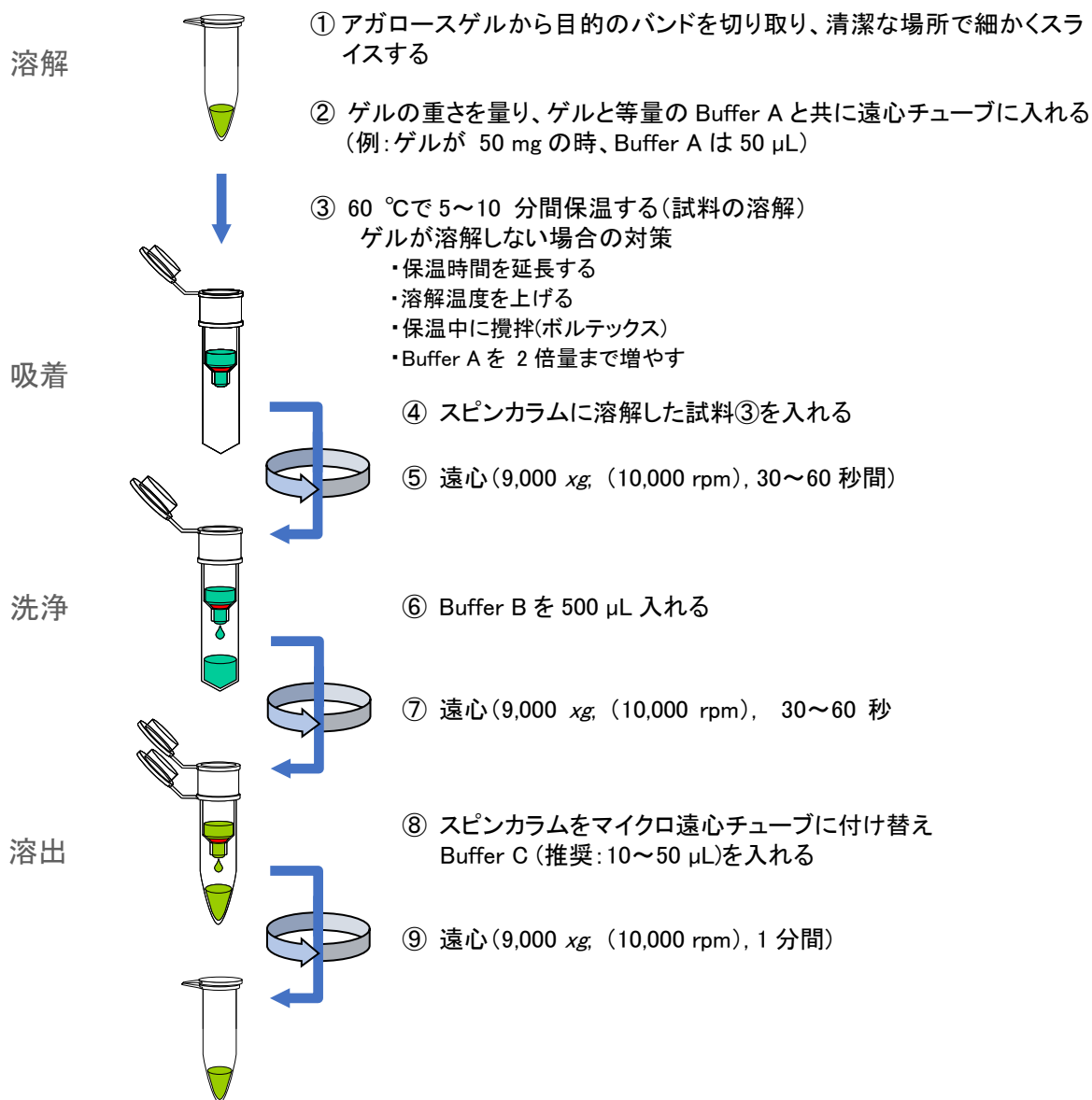
工程⑤: シリカモリスはフィルターがなく通液性がよいため、洗浄後(工程⑤の後)の空遠心は不要です。

工程⑥: Buffer C は、10 mM Tris-HCl +0.5 mM EDTA(Free) (pH 8.5)です。RNase・DNase フリー滅菌水に置き換える事ができます。その場合、pH により回収率が変動するためアンモニア水や水酸化カリウムなどで pH 8.0~8.5 に調整して使用してください。

Monofas[®] DNA 精製キット I

② アガロースゲルからの抽出プロトコール

以下のプロトコールは、アガロースゲルからのフラグメント DNA 抽出・精製に対応しています。操作を開始する前に遠心機を 9,000 xg (10,000 rpm) に設定してください。すべての工程において、スピナラムの蓋は、開けた状態で遠心操作を行ってください。また、60 °C に設定したヒートブロックもしくはウォーターバスを用意してください。(蓋を閉めた状態では、スピナラム内が陰圧になるためスムーズに通液されません。)



<注意事項>

工程①:ゲルは清潔なカミソリやメスを用いてスライスし、余分な水分は取り除いてください。

工程③:ゲルが完全に溶解したことを確認してください。

ゲルが溶解しない場合は、保温時間を延長する、溶解温度を上げる、保温中に攪拌(ボルテックス)を行うなどの操作を行ってください。もし、それでも溶解しない場合は、Buffer A を 2 倍量まで必要に応じて添加してください。

工程⑦:洗浄後(工程⑦の後)の空遠心は不要です。

工程⑧: Buffer C は、10 mM Tris-HCl+0.5 mM EDTA(Free) (pH 8.5)です。RNase・DNase フリー滅菌水に置き換える事が

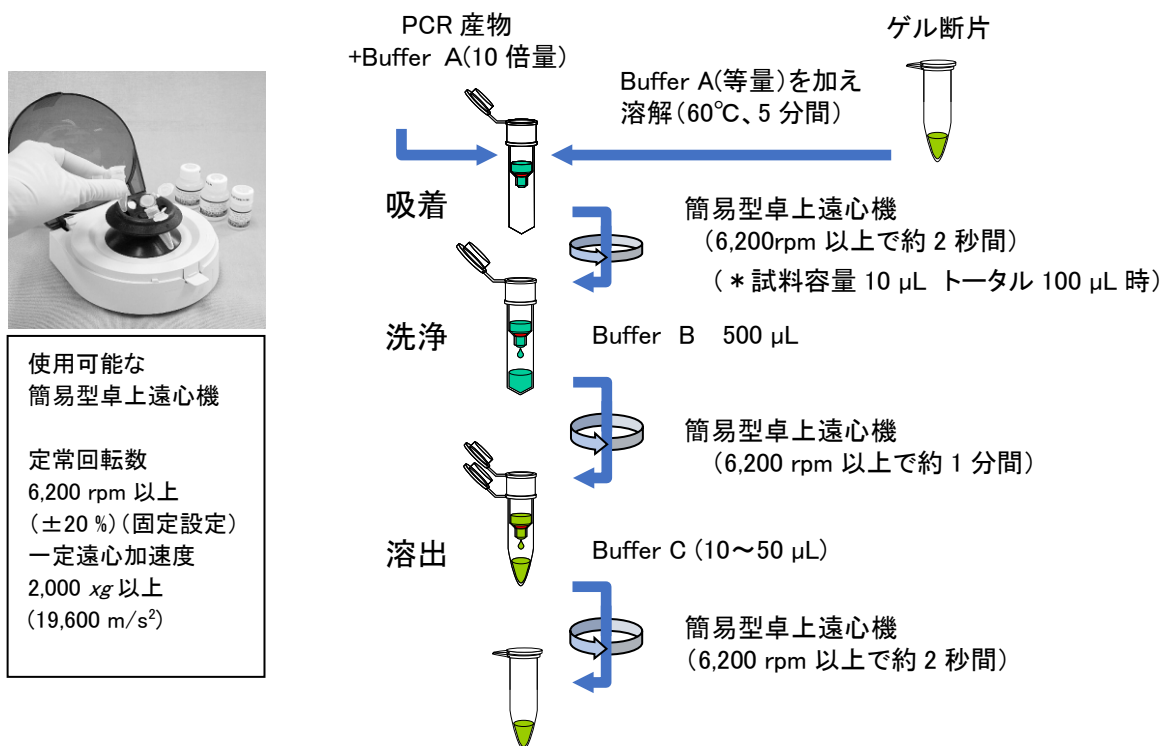
Monofas[®] DNA 精製キット I

出来ます。その場合、pH により回収率が変動するため、アンモニア水や水酸化カリウムなどで pH 8.0~8.5 に調整して使用してください。

③ 卓上遠心機を用いたプロトコール

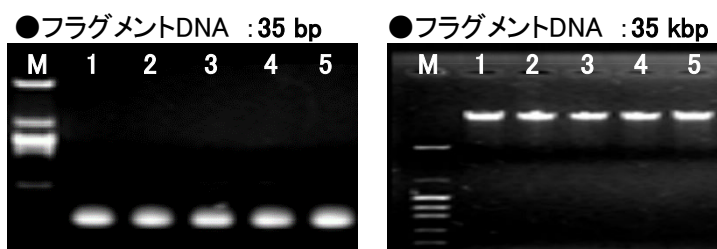
MonoFas[®] DNA 精製キットは、『簡易型卓上遠心機』を用いた精製にも使用可能です。以下のプロトコールは、PCR 産物からの精製およびアガロースゲルからの抽出・精製に対応しています。この方法では、PCR 産物からの精製は約 2 分間、アガロースゲルからの抽出・精製は約 7 分間で処理することが可能です。『簡易型卓上遠心機』を用いる場合にも、遠心操作はスピナラムの蓋を開けた状態で行ってください。

(蓋を閉めた状態では、スピナラム内が陰圧になるためスムーズに通液されません。)



処理容量100 μL以下の場合、回転数・回転時間の変更による回収率の変化は見られません。

○ 遠心方法・遠心時間による回収量の変動(試料容量 10 μ L からの精製例)



レーン 番号	項目	吸着		洗浄		溶出	
		回転数(rpm)	遠心時間	回転数(rpm)	遠心時間	回転数(rpm)	遠心時間
M	pHY Marker	—	—	—	—	—	—
1	未精製 PCR 産物	—	—	—	—	—	—
2	従来遠心法	10,000	30 秒間	10,000	1 分間	10,000	30 秒間
3	従来遠心法	5,000	30 秒間	5,000	1 分間	5,000	30 秒間
4	簡易卓上遠心法	6,200	2 秒間	6,200	1 分間	6,200	2 秒間
5	簡易卓上遠心法	6,200	5 分間	6,200	5 分間	6,200	5 分間

フラグメントサイズが35 bpでも35 kbpでも、吸着・洗浄は遠心操作で精製可能です。

ただし、洗浄工程では1分間の遠心が必要です。

試料容量が多い場合や回転速度や遠心速度が足りない場合には、スピニングカラムに液が残らないように、遠心時間を長くしてください。試料容量が多い場合には、以下を参考にして、遠心時間を調整してください。

簡易卓上遠心法 6,200 rpm 以上で 2,000 \times g 以上	吸着	洗浄	溶出
試料容量 10 μ L(トータル 100 μ L)	2 秒間	1 分間	2 秒間
試料容量 50 μ L(トータル 500 μ L)	20 秒間	1 分間	2 秒間
試料容量 100 μ L(トータル 1000 μ L)	30 秒間	1 分間	2 秒間

7. 保存及びその他の注意

- 室温(15℃ ~ 25℃)で保存してください。
- 洗浄液には、揮発性の高いエタノールが含まれています。ご使用後は、蒸発を防ぐために必ず蓋を閉めてください。
- MonoFas[®] 抽出・精製キットは温度変化が小さく、湿気の少ない涼しく清浄な暗所に保管してください。
- MonoFas[®] 抽出・精製キットは厳しい品質管理のもとで製造、検査、包装、出荷しておりますが、万一不具合がありましたら弊社までご連絡ください。
- 本製品は DNA 抽出・精製の目的で製造しております。それ以外の目的での使用および本取扱説明書に基づかない方法では使用しないでください。
- 本試薬キットを使用前に、安全データシート(SDS)の記載内容をご一読ください。
安全データシート(SDS)の詳細は弊社 HP(URL <http://www.animos.co.jp>)よりダウンロードして入手願います。

8. 保証期間

- 各種 Buffer の保証期間は未開封、室温保存で購入後 1 年間です。
各種 Buffer が追加で必要な際には、最寄りの支店または営業所までご連絡ください。

ゾルーゲル法によるシリカモノリスは、国立大学法人京都大学 曾我直弘先生、中西和樹先生により開発されました。この技術と、ジューエルサイエンス株式会社が所有する製品商標及び特許のライセンスを受けて、MonoFas[®] シリーズ製品を株式会社アニモスが開発・製造しています。

お問い合わせ先 : 株式会社アニモス

〒333-0844 埼玉県川口市上青木 3-12-18 659 研究室

TEL:048-606-2892 FAX:048-611-7192 E-mail:monofas@animos.co.jp

MonoFas[®] DNA 精製キット I