

アガロースゲルからの核酸抽出キット

---

---

# ISOSPIN Agarose Gel

マニュアル（第4版）

---

---

Code No. 311-07981

NIPPON GENE CO., LTD.



## I 製品説明

ISOSPIN Agarose Gel (アイソスピン アガロースゲル) は、スピнкаラムを用いてアガロースゲルから DNA 断片を抽出・精製するためのキットです。

本キットは、カオトロピックイオン存在下で DNA がシリカへ吸着する原理を応用しており、フェノールやクロロホルムなどの毒性有機溶媒を使用しません。使用するスピнкаラムは、カラム容積を最大限確保しており、内封されたシリカゲル膜は、十分な DNA 吸着容量と高い溶出効率を確保しています。

本キットでは、高濃度のアガロースゲル (5%以下) でも使用でき、約 30 分間で簡単に DNA を回収できます。得られた DNA は、制限酵素反応、シーケンス、クローニングなどの分子生物学実験に使用することができます。

## II キット内容

キット内容品	(100 回用)	備考
ISAE Buffer	75 ml × 2 本	溶液の色 : 黄色 ※
ISW Buffer	100 ml × 1 本	エタノール含有 (洗浄液)
ISE Buffer	10 ml × 1 本	組成 : 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) (溶出液)
Spin Column	50 本 × 2 袋	上部パーツ : カラム 下部パーツ : Collection Tube

※ ISAE Buffer 中に析出が起こる場合がありますが、このような場合には、容器ごと 37°C~60°C 程度でインキュベートし、析出物を完全に溶解させてからご使用下さい。

## III 保存

### 室温保存

- ・ ISW Buffer には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速やかに蓋を閉め、保管して下さい。

## IV 使用上の注意

- ・ 本品は、試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
- ・ 試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱わないで下さい。
- ・ 本品の取り扱い、マニュアル記載内容通りに行ってください。
- ・ マニュアル記載内容と異なった取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。
- ・ 製品安全性データシート（MSDS）につきましては、ニッポンジーンホームページ（<http://www.nippongene.com/>）にてご覧いただけます。

## V プロトコール

### <キット以外に必要なもの>

- ・ マイクロピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ 1.5 ml マイクロチューブ
- ・ 遠心分離機
- ・ ヒートブロック
- ・ イソプロパノール

### <必要に応じて別途用意するもの>

- ・ 2.0 ml マイクロチューブ
- ・ 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)

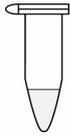
### <抽出プロトコール>

- ① アガロースゲル電気泳動し、EtBr 染色した後、UV 照射下で目的のバンドを切り出す。切り出したアガロースゲル断片を 1.5-2 ml マイクロチューブに移して、重さを量る。

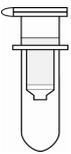
注)

- ・ 1.5 ml マイクロチューブを使用する場合、アガロースゲル断片は 250 mg 以下にする。
- ・ 2.0 ml マイクロチューブを使用する場合、アガロースゲル断片は 340 mg 以下にする。
- ・ UV 照射時間はできる限り少なくする。

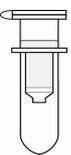
↓



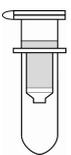
- ② アガロースゲル断片に 3 倍量の ISAE Buffer (黄色の溶液) を添加する。  
例) アガロースゲル断片 100 mg あたり ISAE Buffer を 300  $\mu$ l 加える。
- ③ 50°C で 10 分間保温する。途中 2 分間毎に数回転倒混和し、アガロースゲル断片を完全に溶解させる。
- ④ ゲルを溶解させた溶液の色が黄色のままであることを確認する。  
注) 溶液の色が変わることはほとんどの場合ありませんが、まれにアガロースゲル断片が溶解するにつれて pH がアルカリ性に傾き、溶液の色が黄色からオレンジ色、紫色に変化する場合があります。黄色でない場合は、3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) をゲル溶解液に対して 1/60 量加えることで溶液の色を黄色に戻すことができます (例えば、アガロースゲル断片 100 mg に ISAE Buffer を 300  $\mu$ l 加えたゲル溶解液 (約 400  $\mu$ l) の場合、3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) は 6.7  $\mu$ l 添加する)。
- ⑤ ゲル溶解液に 1/4 量 (=ゲル断片と等量) のイソプロパノールを添加して、数回転倒混和する。軽くスピンドウンする。  
例) アガロースゲル断片 100 mg に ISAE Buffer を 300  $\mu$ l 加えたゲル溶解液 (約 400  $\mu$ l) に、100  $\mu$ l のイソプロパノールを添加する。



- ⑥ メンブレンに DNA を吸着させるため、混合液を全量 Spin Column に添加する。  
注) 混合液量が多く Spin Column に一度に添加できない場合はステップ⑥~⑧を繰り返して、1 本の Spin Column に全量を添加して下さい。
- ⑦ 遠心 (12,000  $\times$  g、1 分間、室温) する。
- ⑧ Spin Column のカラムを外し、Collection Tube 中のろ液を捨てた後、カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。

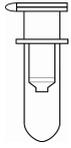


- ⑨ 500  $\mu$ l の ISAE Buffer (黄色の溶液) を Spin Column に添加する。
- ⑩ 遠心 (12,000  $\times$  g、1 分間、室温) する。
- ⑪ ろ液を捨てて、カラムを Collection Tube に再度戻す。



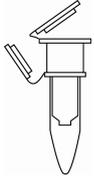
- ⑫ 洗浄のため、750  $\mu$ l の ISW Buffer を Spin Column に添加する。
- ⑬ 遠心 (12,000  $\times$  g、1 分間、室温) する。
- ⑭ ろ液を捨てて、カラムを Collection Tube に再度戻す。





- ⑮ Spin Column を空の状態のまま遠心（12,000×g、1 分間、室温）し、メンブレンを乾燥させる。

注） ISW Buffer に含まれるエタノール分を取り除くため。



- ⑯ Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上へのせる。
- ⑰ DNA を溶出させるため、50  $\mu$ l の ISE Buffer をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置する。

注） ISE Buffer（10 mM Tris-HCl, pH 8.5）の代わりに Nuclease フリー水や TE（pH 8.0）も溶出液として使用できる。

- ⑱ 遠心（12,000×g、1 分間、室温）する。

- ⑲ DNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される。

## <簡易プロトコール>

### 切り出したアガロースゲル断片

← 3 倍量の ISAE Buffer を添加

50°Cで 10 分間保温、途中 2 分間毎に転倒混和

アガロースゲルを完全に溶解

[← 溶液が黄色から変化した場合、1/60 量の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を添加]

← 1/4 量のイソプロパノールを添加

転倒混和

軽くスピンドウン

### Spin Column に混合液を全量添加

← 遠心 (12,000 × g, 1 分間, 室温)  
ろ液を捨てる

← 500 μl の ISAE Buffer を添加  
← 遠心 (12,000 × g, 1 分間, 室温)  
ろ液を捨てる

← 750 μl の ISW Buffer を添加  
← 遠心 (12,000 × g, 1 分間, 室温)  
ろ液を捨てる

← 空の状態遠心 (12,000 × g, 1 分間, 室温)

### Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す

← 50 μl の ISE Buffer をメンブレン中央に滴下  
室温静置 3 分間

← 遠心 (12,000 × g, 1 分間, 室温)

### DNA 溶液

## VI トラブルシューティング

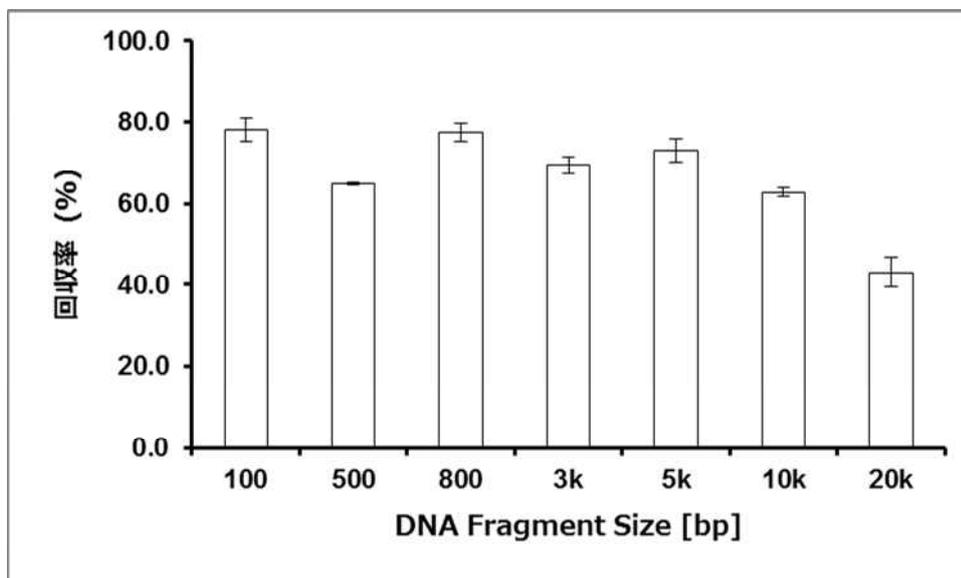
トラブル	予想される原因	対 策
DNA 回収効率が低い。	溶出が不十分。	ISE Buffer (溶出液) の量を増やす。
		ISE Buffer 添加後に、3 分間必ず静置する。
		ISE Buffer はメンブレン中央に滴下する。
	ゲル断片が完全に溶解していない。	50°Cでのインキュベーション時間を延長する。
		ゲル断片の量を予め秤量しておき、正確に ISAE Buffer をゲル断片の 3 倍量加える。
ゲル断片溶解時の pH がアルカリ性になっている。	アルカリ性になっているとゲル溶解液の色が黄色とは異なる色に変化するため、3M 酢酸ナトリウムを添加して pH を調整する。	
ゲル断片中に含まれる DNA 量が少ない。	電気泳動の際にアプライする DNA 量を増やす。	
	ゲル断片を 2 個以上用意し、ゲルの溶解とイソプロパノールの添加まで行った混合液を 1 つにまとめ、1 本の Spin Column へ複数回に分けて全量を添加する。	
精製した DNA 断片が酵素反応に使用できない。	塩類もしくはエタノールが残存している。	ISW Buffer による洗浄後、再度 ISW Buffer (もしくは 80% エタノール) を添加して洗浄を 2 回行う。
		空の Spin Column の遠心を 5 分間に延ばす。
DNA 断片の濃度が低い。	DNA 量に対して溶出液量が多い。	溶出の際、ISE Buffer の量を減らす。(溶出量を 30 $\mu$ l より少なくすると回収効率が 50 $\mu$ l 溶出時よりも低くなります)
精製した DNA 断片をアガロースゲル電気泳動すると、精製前とサイズが異なっている。	DNA がせん断されている。	ゲル断片と ISAE Buffer の混合は、ピペッティングではなく転倒混和で行う。
	DNA がヌクレアーゼにより分解している。	試薬、チューブ類は滅菌処理したものを使用する。

## VII データ

### <製品性能>

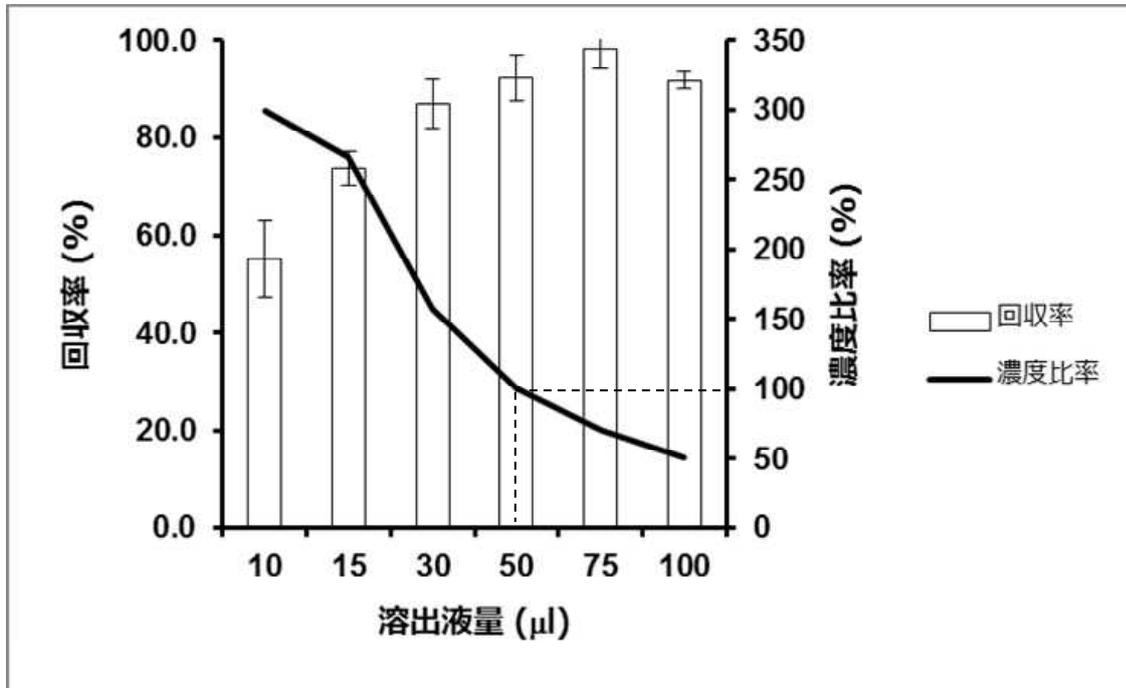
DNA 吸着容量	20 $\mu$ g
カラム容量	900 $\mu$ l
最低溶出量	10 $\mu$ l
回収効率	40 - 80% (100 bp - 20 kbp)

### <DNA Fragment Size による回収効率の変動>

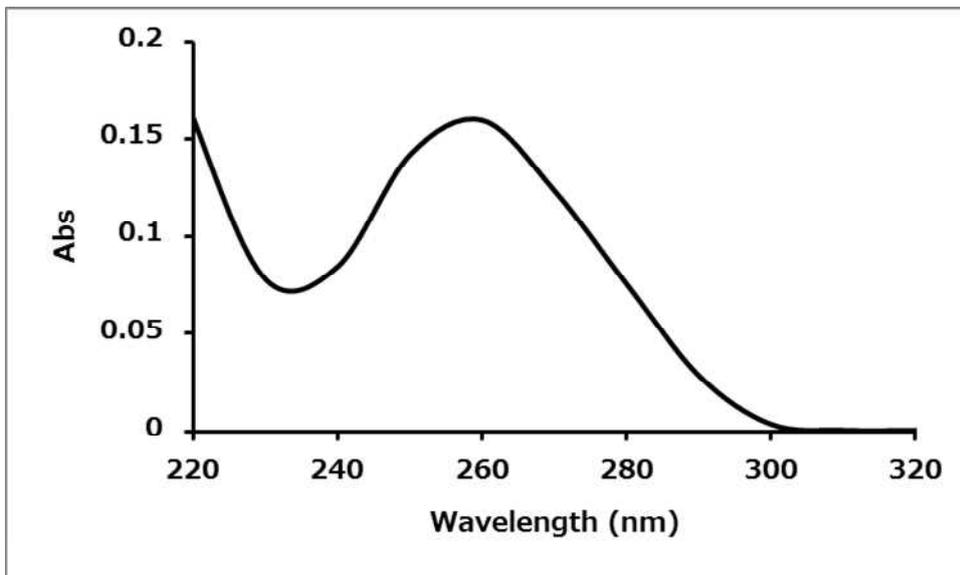


<溶出液量による回収効率の変動と精製産物の濃度変動>

(濃度比率：50  $\mu$ l 溶出時の濃度を 100%とした場合の相対比)



<2%アガロースゲルから切り出した DNA 断片を精製した際の吸光スペクトル>



## VIII 関連製品

Code No.	製品名	包装単位
316-90025	TE (pH8.0)	500 ml
314-90021		100 ml
310-90023		100 ml×6 本
316-90405	1M Tris-HCl (pH8.5)	500 ml
314-90401		100 ml
318-90105	Distilled Water, Deionized, Sterile	500 ml
316-90101		100 ml
312-90103		100 ml×6
316-90081	3M Sodium Acetate (pH5.2)	100 ml
315-90051	EtBr Solution	10 ml
318-90301	10× TAE	5 L
313-90035	50× TAE	500 ml
318-90041	5× TBE	1,000 ml
312-01193	Agarose S	100 g
316-06071	Agarose S Tablet	0.5 g×140 錠
312-01431	Agarose HS	100 g
319-01201	Agarose H	10 g
317-01202		25 g
311-02682	Agarose X	25 g
313-02681		100 g
313-03242	Agarose 21	25 g
319-03244		100g
315-03241	Agarose 21 スティックタイプ°	3 g×25
312-06512	Agarose XP	25 g
310-06513		100 g
316-06515		500 g
317-01182	Agarose L	25 g

マニュアル記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。

**お問い合わせ先**

**株式会社ニッポンジーン**  
研究試薬部 学術営業課

TEL 076 - 451 - 6548

URL <http://www.nippongene.com/siyaku/>

お問い合わせは、お電話もしくはWEB フォームより承っております。