

PCR 産物精製キット

---

---

# ISOSPIN PCR Product

マニュアル（第4版）

---

---

Code No. 315-08001

NIPPON GENE CO., LTD.

## I 製品説明

ISOSPIN PCR Product (アイソスピン PCR プロダクト) は、PCR 反応液中の PCR 産物を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、操作に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。使用するスピンカラムは、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、約 20 分間という短い時間で PCR 反応液から DNA ポリメラーゼ、塩、プライマー、dNTPs などを取り除き、PCR 産物のみを回収することができます。本キットによって精製された PCR 産物は、各種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
ISB Buffer	100 ml × 1 本	(吸着液)
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

## 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

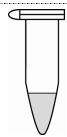
- ・ 本品は、試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
- ・ 試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱いわないで下さい。
- ・ 本品の取扱いは、マニュアル記載内容通りに行ってください。
- ・ マニュアル記載内容と異なった取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。
- ・ 製品安全性データシート（MSDS）につきましては、ニッポンジーンホームページ（<http://www.nippongene.com/>）にてご覧いただけます。

## V プロトコール

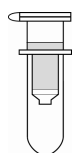
### <キット以外に用意するもの>

- ・ 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

## <プロトコール>



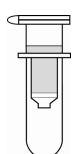
- ① PCR 反応液に 5 倍量の ISB Buffer を添加し、溶液が完全に混合するように転倒混和する。軽くスピンドウンする。  
例) PCR 反応液 50  $\mu$ l あたり ISB Buffer を 250  $\mu$ l 加えます。



- ② メンブレンに PCR 産物を吸着させるため、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②~④を繰り返して、1 本の Spin Column に全量を添加して下さい。

- ③ 遠心 (12,000  $\times$  g、1 分間、室温) する。

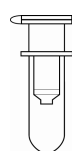
- ④ Spin Column のカラムを外し、Collection Tube 中のろ液を捨てた後、カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。



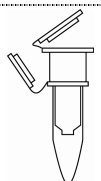
- ⑤ 洗浄のため、750  $\mu$ l の ISW Buffer を Spin Column に添加する。

- ⑥ 遠心 (12,000  $\times$  g、1 分間、室温) する。

- ⑦ ろ液を捨て、カラムを Collection Tube に再度戻す。



- ⑧ Spin Column を空の状態のまま遠心 (12,000  $\times$  g、1 分間、室温) し、メンブレンを乾燥させる。  
注) ISW Buffer に含まれていたエタノール分を取り除くための操作です。



- ⑨ 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。

- ⑩ メンブレンに吸着していた PCR 産物を溶出させるため、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ます。

- ⑪ 遠心 (12,000  $\times$  g、1 分間、室温) する。

- ⑫ PCR 産物が 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>

PCR 反応液

← 5 倍量の ISB Buffer を添加  
転倒混和  
軽くスピンドウン

Spin Column に全量を添加

← 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)

PCR 産物

## 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 の回収効率が低い。	溶出が不十分。	ISE Buffer (溶出液) 量を増やす。(溶出量を増やすと精製される PCR 産物の濃度が低くなります)
		ISE Buffer 添加後、室温で 3 分間必ず静置する。
		ISE Buffer はメンブレンの中央に滴下する。
DNA の回収効率が低い。	PCR 反応液中の PCR 産物の量が少ない。	精製前に PCR 反応液の一部を電気泳動して、増幅を確認する。
		PCR 反応液を複数準備し、それぞれを 1 本のチューブにまとめてから 1 本の Spin Column で精製プロトコルを行う。
		PCR 条件を検討する。
精製した PCR 産物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 Spin Column に添加して洗浄を 2 回行う。
		洗浄後に行う空の Spin Column の遠心時間を 5 分間に延ばす。
精製した PCR 産物の濃度が低い。	PCR 反応溶液中に存在する PCR 産物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 PCR 産物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。	ISB Buffer と PCR 反応溶液の混合は、ピペ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、ピペットチップ、チューブ類は滅菌処理したものを使用する。

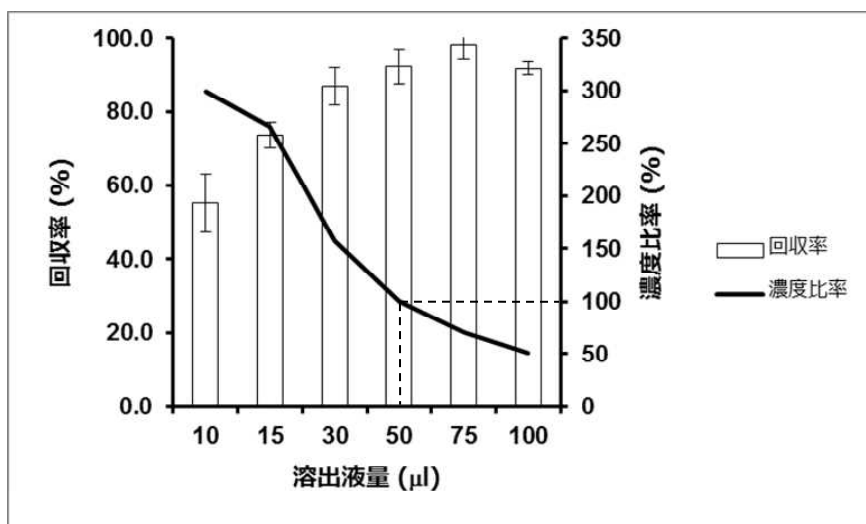
## VII データ

### <製品性能>

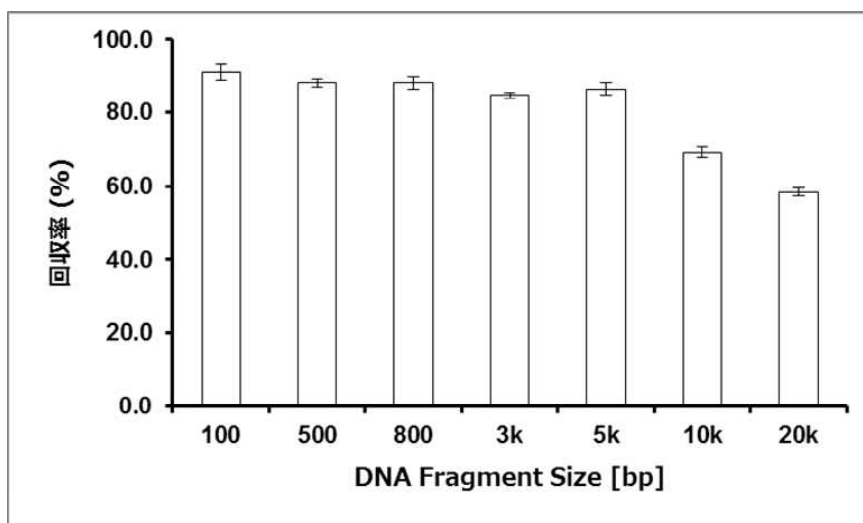
DNA 吸着容量	20 $\mu$ g
最低溶出液量	10 $\mu$ l
回収効率	60-95% (100 bp-20 kbp)
カラム容量	900 $\mu$ l
Primer (single strand DNA) 除去	40 mer 以下

### <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)



### <DNA Fragment Size による回収効率の変動>



## 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
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
311-07763	Gene RED PCR Mix Plus	96 回分
319-07764		960 回分
319-07041	Hot-Start Gene <i>Taq</i>	250 units
315-07043		250 units × 4
311-07523	Hot-Start Gene <i>Taq</i> NT	250 units
319-07524		250 units × 4

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
<p style="text-align: center;"><b>株式会社ニッポンジーン</b> 研究試薬部 学術営業課</p> <p>TEL 076 - 451 - 6548 URL <a href="http://www.nippongene.com/siyaku/">http://www.nippongene.com/siyaku/</a></p> <p>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。</p>