

アガロースゲルからの核酸抽出

Thermostable β - Agarase

Code No. 317-07123(30 units), 311-07121(300 units)

マニュアル(第5版)1010-1805

I 製品説明

アガラーゼは、融解させた(ゾル化させた)アガロースを neoagarose-oligosaccharides に分解する酵素で、分解後のアガロース溶液は再びゲル化しなくなります。この性質を利用し、アガラーゼはアガロースゲルからの核酸抽出に応用されています。

アガラーゼによる核酸抽出のメリットは、①操作が簡単、②有害な試薬を使用しない、③大きなDNA断片でも比較的傷つけることなく回収できる、ことが挙げられます。

本品は、耐熱性微生物に由来するアガラーゼであり、従来のアガラーゼと比較して極めて耐熱性に優れています。

<特長>

- 簡単&短時間な操作
- 至適反応温度が高く、スタンダードタイプのアガロースにも使用可能。
- ゲル分解液をそのままクロニングや制限酵素反応等に使用可能。
- 大きなDNA断片もせん断の影響が少なく回収可能。

本酵素は国立研究開発法人海洋研究開発機構、海洋・極限環境生物圏領域における研究により、有人潜水調査船「しんかい 6500」を用いて深海から採取された耐熱性微生物に由来しています。詳しくは、シーエムシー出版『酵素開発・利用の最新技術』第5章 深海微生物からの有用酵素の探索 p.41-52(著者: 秦田勇二、大田ゆかり、日高祐子、能木裕一)をご参照下さい。



提供: (国研)海洋研究開発機構

II 製品内容

構成: Thermostable β -Agarase (30 units / 300 units) × 1 本

活性: 1 unit/ μ l

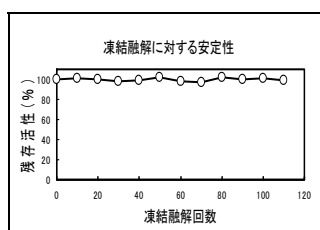
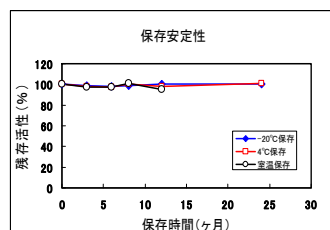
形状: 50 mmol/l NaCl, 20 mmol/l Tris-HCl (pH7.5)

単位の定義:

1unit は、60°Cで1分間当たり1 μ mol のD-ガラクトースに相当する量の還元糖をアガロースゲルから生成する酵素活性とする。

III 保存条件

保存温度: 冷蔵 (2~10°C)



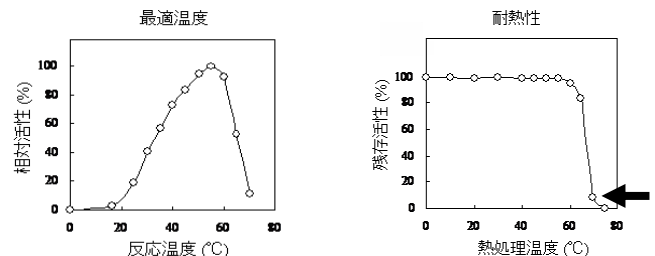
IV プロトコール

基本プロトコール

- ① 切り出したアガロースゲルブロック 200 mg (~200 μ l) をチューブに入れる。
↓
- ② 5~10 分間加熱し、アガロースゲルを完全に融解する。^{*1}
↓
- ③ アガロースゲルが融解したことを確認し、50~65°Cの恒温槽に移す(30~60 秒ほど放置し冷ます)。^{*2} }^{*3}
- ↓
- ④ 6 units (6 μ l) の Thermostable β -Agarase を添加し、混和する。^{*4}
↓
- ⑤ 50~65°Cで 5~10 分間保温し、アガロースを分解する。^{*5}
↓
- ⑥ 氷上に静置し、再凝固しないことを確認する。^{*6}
(必要に応じてアルコール沈殿・精製を行う)^{*7}

*1 アガロースやバッファーの種類によってゲル融点は異なる。

*2 Thermostable β -Agarase は 50~60°Cで最大活性を示す(左図)。また、Thermostable β -Agarase は 70°Cで 30 分間加熱しても 10%以上活性が維持される(右図: 矢印)。



データ提供 (国研)海洋研究開発機構

*3 低融点タイプアガロース(ゲル融点 65°C以下、TAE 使用)の場合、このステップ②・③を省くことができる。

*4 使用する酵素量は減らすことができる(裏面 VI Q&A 参照)。

*5 アガロースゲルブロックの量や容器の大きさ、Thermostable β -Agarase の添加量によって反応時間が異なる。

*6 氷冷で再凝固しなければアガロースが完全に分解されたと判断できる。回収したDNA溶液を電気泳動したい場合、酵素を熱処理(90°C、5分間)で失活させるか、フェノール・クロロホルム処理をしてから用いる。

*7 未分解ゲルが残ってしまった場合、遠心分離により除去するか、再度プロトコールのはじめから反応を行う。必要であればアルコール沈殿・精製を行う。

V トラブルシューティング

トラブルと対策

未分解ゲルが残る

Thermostable β -Agarase の反応が不十分であることが予想される。

1. 基本プロトコールのステップ②(ゲル溶解反応)で、ゲルが完全に融解していることをピペッティングなどで確認してから Thermostable β -Agarase を添加する。
2. Thermostable β -Agarase の添加量を増やす。
3. Thermostable β -Agarase を添加した後のゲル分解反応時間をのばす。

回収した DNA の純度が低い

高分子量のアガロース分解物が溶液中に残存していることが予想される。

1. 完全にゲルを分解する。
2. 遠心分離により未分解物を沈殿させ、上清を DNA 溶液として使用する。
3. アルコール沈殿・精製を行う。さらに純度を高めたい場合はフェノール・クロロホルム処理を行う。

回収した DNA を電気泳動するとウェル周辺のゲルが薄くなる

Thermostable β -Agarase の活性が残存していることが予想される。

1. 90°C以上で5分以上の熱処理をすることで失活させる。
2. フェノール・クロロホルム処理を行う。

VI Q & A

Q1. 使用する酵素量は減らすことができますか？

A1. Thermostable β -Agarase の基本プロトコールで推奨する酵素量は、200 mg のゲルブロックに対して 6 μ l (6 units) ですが、ゲルの濃度や反応条件によっては 1 回に使用する酵素量を減らすことができます。

反応時間	アガロース濃度	酵素添加量
5 分間処理 (アガロースゲル:200 mg)	1% Agarose S	2 μ l (2 units)
	1.5% Agarose S	3 μ l (3 units)
	2% Agarose S	5 μ l (5 units)
	1.5% Agarose XP	3 μ l (3 units)
10 分間処理 (アガロースゲル:200 mg)	1.5% Agarose S	1.5 μ l (1.5 units)
	2% Agarose S	3 μ l (3 units)
	3% Agarose 21	5.5 μ l (5.5 units)

Q2. DNA の回収率はどのくらいですか？

A2. 原理上、切り出したゲル中の DNA は全量回収されます。

Q3. 反応液の最終溶液量はどれくらいになりますか？

A3. 200 mg のアガロースゲルを用いた場合、最終溶液量は約 200 μ l になります。

Q4. 反応液を濃縮するにはどうすればよいですか？

A4. アルコール沈殿を行なって下さい。

例) 得られた DNA 溶液(ゲル分解液)に対して 0.1 倍量の 3 mol/l Sodium acetate を添加する(必要に応じて共沈剤の Ethachinmate も添加し混合する)。0.8~1 倍量のイソプロパノール(または 2.5 倍量のエタノール)を添加して混合し、室温で 2~10 分間静置後、遠心分離(12K \times g, 10 分間)して上清を除去する。沈殿を残したチューブに 70%エタノールを 1 ml 程度加え、遠心分離(12K \times g, 5 分間)して上清を除去する。沈殿を室温で 15 分間放置して乾燥後、適当量の TE バッファーにて溶解する。

Q5. 分子量の大きい DNA 断片を回収することができますか？

A5. Thermostable β -Agarase は大きな DNA 断片も物理的なせん断の少ない状態で回収することができることを確認しております。(数十 bp ~ 166 kbp の DNA フラグメントを回収して確認)

ただし、取り扱う DNA のサイズが大きくなればなる程、アガロースゲル電気泳動での分離が困難になり、ピペッティング等の操作でもせん断されやすくなります。

Q6. 反応液は PCR 反応に使用できますか？

A6. PCR 反応液に対し、Thermostable β -Agarase を用いたアガロース分解溶液の添加量を 1/8 倍量以下にすることで使用できることを確認しております。

例) PCR 反応液の容量が 20 μ l であれば、アガロース分解溶液の添加量を 2.5 μ l 以下にする。

Q7. 反応液はクローニングに使用できますか？

A7. Thermostable β -Agarase で回収した DNA 溶液を、そのままライゲーション反応と形質転換に使用できることを確認しております。(Ligation - Convenience Kit と ECOS™ Competent *E. coli* DH5 α を使用して確認)

Q8. 反応液は転写反応に使用できますか？

A8. Thermostable β -Agarase で回収した DNA 溶液を、そのまま転写反応に使用できることを確認しております。(CUGA 7® *in vitro* Transcription Kit を使用して確認)

Q9. 反応液はシーケンシングに使用できますか？

A9. Thermostable β -Agarase で回収した DNA 溶液を、そのままシーケンシングに使用できることを確認しております。(ABI 社 377 シーケンサーを使用して確認)

ただし高濃度・高分子量のアガロース分解物が混入すると、解析機器の機種によっては故障の原因につながる可能性があります。高分子量のアガロースゲル分解物は遠心分離やフェノール・クロロホルム処理で除くことができます。

Q10. 変性アガロースゲルからの RNA 抽出に使用できますか？

A10. 使用できますが、変性アガロースゲルブロックに含まれるホルムアルデヒドが酵素活性を阻害するため、添加する酵素量を増やす必要があります。

例) 100 mg の 1.5%アガロース S 変性ゲルブロックを 90°C、5 分間でゲルを融解した後、8 μ l (8 units) の酵素を添加し、60°C、10 分間の反応でアガロースを分解する。

実験例など詳細についてはニッポンジーン
ホームページをご覧ください。

株式会社ニッポンジーン 遺伝子工学研究用試薬
<https://www.nippongene.com/siyaku/>

VII 関連製品

Code No.	製品名	包装単位
312-01193	Agarose S	100 g
319-03244	Agarose 21	100 g
310-06513	Agarose XP	100 g

(注意)

- ・ 国立研究開発法人海洋研究開発機構から提供されたマニュアル掲載の画像、記事、データ等の無断転載、複製、加工、転用を固く禁止いたします。
- ・ 本品は、試薬(試験研究用)として販売しているものです。医薬品の用途には使用しないで下さい。