

Product Information

Diffinity RapidTip®2

for PCR Purification with Polymerase Removal

Catalog Number D2947

TECHNICAL BULLETIN (日本語)

製品説明

Diffinity RapidTip2 には PCR 反応液からの DNA ポリメラーゼを除去するために必要な全ての要素が含まれています。独自の吸着技術により、PCR 反応溶液の各要素に対して異なる親和性がある機能的なチップです。反応液をマイクロピペッターでチップ内部に吸い込むことで不純物を除去することが出来ます。たった 1 分間のピペッティングによる混合で、反応溶液中の DNA をすぐにその後のアプリケーションに使用できる高品質な状態まで精製することが出来ます。

製品用途

Diffinity RapidTip2 は、サンガーシーケンシング解析、制限酵素による切断、および TA クローニングなどのアプリケーションに先立って、PCR 反応溶液の精製を目的としてデザインされております。Diffinity RapidTip2 はほとんどのユニバーサルタイプのマイクロピペッターに適合します。Diffinity RapidTip2 は PCR 反応溶液に含まれる DNA ポリメラーゼを効率的に除去するだけでなく、最大 90% の dNTP、プライマー、およびプライマーダイマーを除去することが出来ます。一方、100bp から 10kb の PCR により増幅された DNA 断片の回収率は最大で 90% を示します。本製品は 50µL の PCR 反応溶液の使用に最適化されています。

本製品に含まれるもの

製品	Catalog Number	容量
Diffinity RapidTip2 for PCR Purification with Polymerase Removal	D2947	8 回分
		48 回分
		96 回分

本製品に含まれないが、実験操作に必要なもの

- ・PCR 反応溶液
- ・精製した PCR 反応溶液を保存するための新しいチューブ
- ・マイクロピペッター (手動あるいは電動)
- ・溶液を移すための、標準的なマイクロピペットチップ (必要に応じて)

安全上のご注意

Diffinity RapidTip2 は試験研究用途専用です。医薬品、家庭用、あるいはその他の用途には使用しないでください。取扱いにおける安全性の情報については、SDS をご参照ください。

Diffinity RapidTip2 を使用したピペッティングに関するガイドライン

効率よく PCR 反応溶液を精製するには、慎重なピペッティング操作が重要です。より良い結果を得るために、以下のピペッティングに関するガイドラインをご参照ください。

1. 粒子を事前に膨潤させる

最初の吸い込みステップで、約半量の PCR 反応溶液を吸い込み、混合せずに 5 秒間そのままにして粒子に PCR 反応液を浸潤させてください。その後残りの半量を吸い込み、吐出してください。

2. よく混合する

効率の良い混合を行うため、吸入・吐出のサイクルにおいて必ず PCR 反応溶液とチップ内部の粒子が混ざるようにピペティングしてください。最初の数回の吸入・吐出サイクルでは、粒子がよく拡散するよう、PCR 反応溶液をゆっくりと吸い込んでください。ただし、粒子がチップの先端に沈殿してしまうため、ピペティングの間隔が 1-2 秒を超えるような非常にゆっくりとした吸入・吐出サイクルは避けてください。

3. チップ先端を精製する反応溶液に浸しておく

吸い込みの過程で、チップ先端を必ず PCR 反応溶液の表面に浸しておいてください。チップ先端を溶液表面から離して吸い込むと、気泡を取り込んで精製効率を低下させるおそれがあります。

4. チューブの底面にチップ先端を近づけすぎない

チップ先端を PCR 反応溶液の入ったチューブ底面にくっつけてしまうと、吸い込み効率が下がるおそれがあります。

5. 粒子が反応溶液から分離した場合のリカバリ

混合中に PCR 反応溶液から粒子が分離してしまった場合、マイクロピペッターを下方向に軽く叩いて粒子を反応溶液に浸るように落としてください。

保存条件

室温で保存

Diffinity RapidTip2 使用方法

サンプルの調製

Diffinity RapidTip2 は 50 μ L の反応液量を扱うのに最適化されており、液量が 45-55 μ L の反応液に対して最大効果を発揮するようにデザインされています。

・55 μ L を超える PCR 反応液の場合：最大 50 μ L となるように別のチューブに分注してください。

・45 μ L を下回る PCR 反応液の場合：滅菌水などで、液量が 50 μ L になるように希釈してください。DNA サンプル濃度を希釈した場合、濃度を >50ng/ μ L とすると最も良い結果が得られます。

チップの準備

Diffinity RapidTip2 は PCR 反応液を精製することのできる特殊な粒子を含んでいます。この粒子はマイクロピペットのチップ内部の表面に付着した状態で納品されます。より良い結果を得るためには、ご使用前に製品の入っている箱を 2-3 回軽く叩いてチップ先端に粒子が集まるようにしてください。

ホコリのように見える粒子がチップ内部表面に付着しているのが正常な状態です。箱を軽く叩いた後、この粒子がチップ先端側のフィルタの上に 3mm ほどの高さに堆積することを確認してください。

精製の手順

1. マイクロピペッターの吐出量を 60 μ L に設定してください。
2. マイクロピペッターに Diffinity RapidTip2 を装着してください。
注意：2 個以上のサンプルを精製する場合は、生産効率を高めるためにマルチチャンネルのマイクロピペッターを使用することが可能です。
3. チップの先端を 50 μ L の PCR 反応液に入れてください。
4. 最初の反応液の吸い込みで、チップ内部の粒子を膨潤させてください（ピペティングのガイドラインを参照）。
5. 60 秒間、反応液を混合してください（吸い込みと吐き出しを約 15 セット分）。
注意：ピペティングは通常よりも遅い速度で行ってください。吸い込み後、チップ内部に反応液が完全に行き渡るまで待つから混合し、チップ内部の粒子が懸濁した状態になるまで、よく混合してください。
6. 混合が終わったら、新しく用意した滅菌チューブに、Diffinity RapidTip2 で精製した反応液を入れてください。液量の損失をできるだけ防ぐため、マイクロピペッターの排出機構を利用してチップ内部に残った反応液を完全に吐出してください。

精製した PCR 増幅産物は、その後のアプリケーションにすぐに使用することが出来ます。精製されたかどうかを確認する場合は、精製前後のサンプルを隣り合うレーンにアプライし、アガロースゲルなどで電気泳動を行ってください。精製による回収効率を推定する場合、精製前後のバンドの定量が必要です。その場合はライフテクノロジーズ社製の PicoGreen®キットを用いて、アガロースゲル上で定量・可視化を行ってください。

トラブルシューティングガイド

問題	解決方法
DNA 回収率が低い	アガロースゲル電気泳動で、精製前後の PCR 溶液のバンド強度をチェックしてください。 注意：DNA 回収効率を最適化するため、少なくとも 45 μ L 以上の PCR 反応液を精製してください。
マイクロピペッターの吸い込みが遅い、あるいは難しい	① マイクロピペッターの吐出量が 50-60 μ L となっていることを確認してください。 ② チップがマイクロピペッターに隙間なく装着されているかどうか確認してください。 注意：Diffinity RapidTip2 は以下の場合に使用に適しません：界面活性剤、ミネラルオイル、あるいは ready load PCR ミックスのような、粘性を増やすような混合物が入っている場合。
吐出してもチップ内部に反応液が残っている	5 μ L 程度まで液量が残存するのは正常です。 注意：最後のサイクルで、マイクロピペッターの排出機構を利用して完全に反応液を吐出してください。
不純物を取り除くことができない	サンプル処理時に粒子がチップの先端近くに集まっていることを確認してください。マイクロピペッターを正常な速度で吸い込み・吐き出しの操作を行った場合、粒子が混合されていることが確認できます。 注意：気泡が入っている場合はタッピング、あるいは吸い込み・吐き出しを繰り返して取り除いてください。