

Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System

日本語プロトコール TB308J 2002年8月作成

I. はじめに	1
II. 製品の構成	2
III. 一般的な考慮事項	3
VI. ゲル片および PCR 産物の調製	3
A. Membrane Wash Solution の調製	3
B. ゲル片の溶解	4
C. PCR 反応の処理	4
V. DNA 精製	5
A. 遠心法による DNA 精製	5
B. 吸引法による DNA 精製	5
VI. 困ったときには	6
VII. 参考文献	8
VIII. 付録	8
A. バッファーと溶液の組成	8
B. 関連製品	8

I. はじめに

Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System は、トリス酢酸(TAE)またはトリスホウ酸(TBE)で作製した標準アガロースゲルや低融点アガロースゲルからの 100bp ~ 10kb の DNA 断片の抽出・精製、あるいは PCR 産物の PCR 反応液からの直接精製に用いることのできるキットで、95%もの回収率が得られます(DNA 断片のサイズに依存; 表1) PCR 産物は、余剰のヌクレオチドやプライマーを除去するために通常精製が行われます。本製品はメンブレンベースのシステムで、40µg までの DNA 結合能を有し、単離した DNA 断片または PCR 産物の回収をわずか 20 分間で行うことができます(所要時間はサンプル数や使用するプロトコールに依存) 精製された DNA は、蛍光自動シーケンシングやクローニング、標識制限酵素消化、または in vitro 転写・翻訳にそのままお使いいただけます。

Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System は、カオトロピック塩の存在下で DNA がシリカメンブレンに結合する性質にもとづいています。DNA 断片を電気泳動で分離後、目的のバンドを切り出し、グアニジンイソチオシアン酸(GTC; Membrane Binding Solution) の存在下で溶解します。あるいは、増幅後、PCR 反応液の分画を Membrane Binding Solution に加え、直接精製します。このシステムでは、溶解したアガロースゲル片からでも PCR 産物からでも DNA 精製を行えます。溶解したゲル片、または PCR 産物は、微量遠心機を用いてメンブレンを通過させます。その際に、DNA はシリカの表面に結合し、単離されます(セクション V.A) 単離された DNA 断片または PCR 産物を洗浄後、DNA を水で溶出します。別法として、溶解したゲル片や PCR 産物を SV Minicolumn を通し、DNA 断片を吸引により洗浄する方法もあります(セクション V.B) Vacuum Adapters(カタログ番号 A1331) を用いると、バキュームマニフォールド(例えば Vac-Man[®] Laboratory Vacuum Manifold, 20-sample capacity(カタログ番号 A7231) または Vac-Man[®] Jr. Laboratory Vacuum Manifold, 2-sample capacity(カタログ番号 A7660)) を用いることができます。

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System は、直鎖の DNA 断片、スーパーコイル状のプラスミド DNA、あるいは 1 本鎖の直鎖または環状 DNA に用いることができます。1 本鎖 DNA の収量は 2 本鎖 DNA の収量と比べて低くなるのが予想されます。

表 1. 2 本鎖 DNA (dsDNA) サイズと収率

PCR 産物 (55 ~ 1,000bp) 直鎖状 pGEM®-3Zf(+) プラスミド (3,199bp) または Lambda Hind III 断片 (9,416bp および 23,130bp) をトリプリケートで 1% アガロースゲル片 (1 × TAE バッファー) から精製し、エチジウムブロマイド染色で定量した。

DNA 断片サイズ	収率
55bp	26%
70bp	39%
85bp	55%
100bp	84%
500bp	89%
1,000bp	92%
3,199bp	95%
9,416bp	95%
23,130bp	47%

II. 製品の構成

製品名	サイズ	カタログ番号
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	10 回分	A9280

各システムには10回の精製に十分な次の試薬が含まれます。

- 4ml Membrane Binding Solution
- 3ml Membrane Wash Solution (concentrated)
- 1.25ml Nuclease-Free Water
- 10 Wizard® SV Minicolumns
- 10 Collection Tubes (2ml)
- 5 Vacuum Adapters

製品名	サイズ	カタログ番号
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	50 回分	A9281

各システムには50回の精製に十分な次の試薬が含まれます。

- 20ml Membrane Binding Solution
- 15ml Membrane Wash Solution (concentrated)
- 2.5ml Nuclease-Free Water
- 50 Wizard® SV Minicolumns
- 50 Collection Tubes (2ml)

製品名	サイズ	カタログ番号
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	250 回分	A9282

各システムには250回の精製に十分な次の試薬が含まれます。

- 100ml Membrane Binding Solution
- 75ml Membrane Wash Solution (concentrated)
- 13ml Nuclease-Free Water
- 250 Wizard® SV Minicolumns
- 250 Collection Tubes (2ml)

保存条件: 全ての構成部品は室温 (22 ~ 25) で保存してください。冷蔵保存する必要はありません。Membrane Binding Solution は遮光保存してください。使用期限は製品のラベルをご参照ください。

III. 一般的な考慮事項

アガロース(海草から抽出される直鎖状ポリマー)は、核酸の電気泳動による分離に一般的に用いられています。通常のアガロースは 87 ~ 89 で融解し、36 ~ 39 で凝固します。低融点アガロースでは、多糖鎖に水酸基が導入され、その結果アガロースはより低い温度で融解・凝固します(それぞれ 65 と 24 ~ 28)。低融点アガロースは電気泳動の後のゲルからインタクトな DNA 断片を回収する必要がある場合によく用いられます。Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System を用いると、標準または低融点アガロースゲルのいずれからでも、プロトコルを変えずに、また収率に差がなく DNA を回収することができます(セクション 5)

標準的な実験着(白衣)と手袋を着用してください。特にエチジウムブロマイド染色したアガロースゲルを取り扱う際には注意してください。UV から目を守るために UV カットのフェイスシールドを着用してください。ゲル片を切り出すときには、UV への自身の露出時間を短縮するために、また DNA へのニック導入を抑えるために、素早く操作してください。

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System は、様々な増幅酵素、バッファー、PCR 増強剤を用いて生成した PCR 産物に用いることができます。ミネラルオイルは精製に影響を与えません。

IV. ゲル片と PCR 産物の準備

準備するもの

(溶液の組成はセクション VII.を参照ください)

- ・1.5ml 微量遠心チューブ
- ・エタノール(95%)
- ・アガロースゲル(標準ゲルまたは低融点ゲル; ゲルからの精製時のみ)
- ・TAE または TBE 電気泳動バッファー(ゲルからの精製時のみ)
- ・50 ~ 65 のヒーティングブロック(ゲルからの精製時のみ)

A. Membrane Wash Solution の準備

精製を始める前に、下記に示す量の 95%エタノールを Membrane Wash Solution に加える(表 2)。ボトルのラベルに添加したことを記録する。蒸発を防ぐために使用後はボトルキャップをきつくしめてください。

表 2 . 各サイズの Membrane Wash Solution への 95%エタノールの添加量

サイズ	Membrane Wash Solution のパーツ番号	95%エタノールの量
10 回用	A929A	15ml
50 回用	A929B	75ml
250 回用	A929C	375ml

注:ゲル片は、精製前にヌクレアーゼフリーの状態、密封したチューブ内で 4 または 20 で 1 週間まで保存できます。

B. ゲル片の溶解

1. いつもどおりのプロトコールでゲルを泳動する。TAEまたはTBEのいずれのバッファーを用いた標準または低融点のいずれのアガロースゲルからでもDNAを抽出できます。
2. 1.5ml 微量遠心チューブを単離する各DNA断片ごとに重さを測定し、記録する。
3. 低波長UVランプとエチジウムブロマイドなどの塩基対の間に入りこむダイを用いて視覚化し、写真を撮る。ニックの導入を抑えるために、ゲルへの照射は必要最低限とする(14)。清浄なメスカカミソリの刃を用いてアガロースの量ができるだけ少なくなるように目的のDNA断片を切り出す。ゲル片を計量した微量遠心チューブに移し、重さを記録する。総重量から空のチューブの重さを引き、ゲル片の重量を求める(注1~3を参照)。
4. Membrane Binding Solution をアガロースゲル10mgにつき10 μ l 添加する。
5. ボルテックスし(注4) 50~65 で10分間、またはゲル片が完全に溶解するまでインキュベートする。アガロースゲルの溶解を早めるために、2~3分おきにチューブをボルテックスする。チューブを室温で短時間遠心し、内容物が底に集まるようにする。アガロースゲルが溶解したら、ゲルは室温では再凝固しません。
6. DNAを遠心法で精製する場合は、セクションV.A.に進む。DNAを吸引法で精製する場合は、セクションV.B.に進む。

注:

1. アガロース濃度3%までは、ほとんど収量の減少なく精製できるという結果を得ています。高いアガロース濃度(2~3%)のゲル片は、1%のアガロースゲル片と比べて完全に溶けるのにより時間を要します。
2. カラムの最大容量は、1回の通過量で350 μ lのMembrane Binding Solutionに溶解した350mgのゲル片となっています。350mgを超えるゲル片では、追加のサンプルをサンプルが全て処理されるまで続けてSV Minicolumnに通過させます。1本のカラムで処理できるアガロースの最大量は約3.5g(10 \times 350mg)です。
3. カラムの最大結合容量は約40 μ gです。少量では10ngの精製に成功しています。
4. 5kb以上のDNA断片はシアリング(せん断)を防ぐために穏やかに混合してください。DNA断片が5kb以上の場合はボルテックスせずに、転倒混和してください。

C. PCR 反応の処理

1. 目的のターゲット配列を通常の増幅条件で増幅させる。
2. 等量のMembrane Binding SolutionをPCR反応に加える(注1~4を参照)。
3. DNAを遠心法で精製する場合は、セクションV.A.に進む。DNAを吸引法で精製する場合は、セクションV.B.に進む。

注:

1. 1本のSV Minicolumnの最大容量は、1mlのPCR反応液を1mlのMembrane Binding Solutionに加えた量となっています(合計2ml)PCR反応液が350 μ lを超える場合は、全てのサンプルが処理されるまで続けてサンプルをカラムに通過させます。
2. カラムの最大結合容量は、カラムあたり約40 μ gです。少量では10ngの精製に成功しています。
3. ミネラルオイルは精製の妨げになりません。
4. シングルバンドを生成しない、または増幅反応の効率が低く、プライマーダイマーがかなり顕著に確認される増幅反応では、目的のバンドをゲル精製することをお勧めします。別法として、提供されたMembrane Wash Solutionに代えて80%エタノール洗浄液を使用することでプライマーダイマーのキャリアオーバーを減少させることもできます。

V. DNA 精製

ゲル片、または PCR 産物をセクション IV の記載にしたがって準備してください。遠心法(セクション V.A) または吸引法(セクション V.B) のいずれかを用いて溶解したゲル片または PCR 産物から DNA を回収します。操作が完了したら、精製した DNA を次のアプリケーションに用いることができます。

A. 遠心法による精製

1. 各々の溶解したゲル片または PCR 反応に対して、1 本ずつ SV Column を Collection Tube に差し込んだもの(SV Minicolumn セット)を準備する。
2. 溶解したゲル片混合液、または PCR 産物調製液を SV Minicolumn セットに移し、室温で 1 分間インキュベートする。
3. SV Minicolumn セットを微量遠心機で 16,000 × g 1 分間遠心する。SV Minicolumn を SV Minicolumn セットから取り外し、Collection Tube 中の液体を捨てる。SV Minicolumn を Collection Tube に戻す。
4. 700µl の Membrane Wash Solution(予め 95%エタノールで希釈; セクション IV.A) を加え、カラムを洗浄する。SV Minicolumn セットを 16,000 × g 1 分間遠心する。前と同じように Collection Tube を空にし、Collection Tube に SV Minicolumn を戻す。500µl の Membrane Wash Solution で洗浄を繰り返し、SV Minicolumn セットを 16,000 × g で 5 分間遠心する。
5. カラムの底にフロースルーの液体がつかないように注意しながら、SV Minicolumn セットを遠心機から取り出す。フロースルーがカラムについてしまった場合は、Collection Tube の中味を捨て、SV Minicolumn セットを 1 分間再遠心する。
6. SV Minicolumn を清浄な 1.5ml 微量遠心チューブに移す。50µl の Nuclease-Free Water をピペットチップでメンブレンに触れないように注意しながら、カラムの中心部に直接アプライする。室温で 1 分間インキュベートする。16,000 × g で 1 分間遠心する。
7. SV Minicolumn を捨て、溶出した DNA が入った微量遠心チューブを 4 °C または -20 °C で保存する。

注:

1. 溶出した DNA の容量は、約 42 ~ 47µl です。DNA をさらに濃縮する必要がある場合は、エタノール沈殿を行ってください。別法として、DNA を 15µl の Nuclease-Free Water で、ほとんど収量を下げることなく溶出することができます。15µl で溶出する場合は、遠心する前にメンブレンが完全に Nuclease-Free Water で覆われていることを確認してください。15µl 未満で溶出することはお薦めしません(表 3 を参照)。
2. 溶出した DNA をアガロースゲル電気泳動で分析する場合は、最終濃度 2 × loading dye を推奨します。

B. 吸引法による DNA 精製

1. 各々の溶解したゲル片または PCR 反応に対してマニフォールド(プロメガの Vac-Man®または Vac-Man® Jr. Laboratory Vacuum Manifold) の各ポートの Luer-Lok に Vacuum Adapter を取り付け、SV Minicolumn を Vacuum Adapter にしっかりとめ込む。
2. 溶解したゲル片または PCR 産物を SV Minicolumn に移し、室温で 1 分間インキュベートする。吸引を開始し、液体を全て SV Minicolumn に通す。

注: 吸引圧は最低で 15 inches of mercury です。吸引圧の換算は、欄外の表をご覧ください。

Inches of Hg から 他の単位への換算	<u>1 Inch Hg</u>	<u>15 Inches Hg</u>
	3.386kPa	50.8kPa
	25.4Torr	381Torr
	0.0334atm	0.501atm
	0.491psi	7.37psi
	2.54cm Hg	38.1cm Hg
	<u>33.86mbar</u>	<u>508mbar</u>

3. 700 μ l の Membrane Wash Solution(95%エタノールで希釈; セクション IV.A を参照)を添加し、カラムを洗浄する。前のステップで SV Minicolumn の側壁についた液滴が洗い流されたことを確認してください。吸引を開始し、液体を SV Minicolumn に通過させます。この洗浄ステップを 500 μ l の Membrane Wash Solution で繰り返す。
4. 吸引を止め、使っていないポートを空け、マニフォールドに通気する。吸引マニフォールドから SV Minicolumn をはずし、SV Minicolumn を Collection Tube に移す。SV Minicolumn セットを 16,000 \times g で 5 分間遠心し、残っている Membrane Wash Solution をカラムから除去する。
5. SV Minicolumn を清浄な 1.5ml 微量遠心チューブに移す。50 μ l の Nuclease-Free Water をメンブレンに触れないように、カラムの中心に直接加える。室温で 1 分間インキュベートする。16,000 \times g で 1 分間遠心する。
6. SV Minicolumn を捨て、溶出した DNA の入った微量遠心チューブを 4 または -20 で保存する。

表 3. 溶出液量に対する回収率

700bp の PCR 産物をトリプリケートで直接精製し、エチジウムブロマイド染色で定量した。

溶出液量	50ml のときと比較した回収率
10 μ l	35%
15 μ l	98%
25 μ l	98%
50 μ l	100%
75 μ l	100%
100 μ l	100%

注:

1. 溶出した DNA の容量は、約 42 ~ 47 μ l です。もしも DNA をさらに濃縮する必要がある場合は、エタノール沈殿を行ってください。別に、15 μ l の Nuclease-Free Water で溶出することでほとんど収量の減少無く溶出することができます。15 μ l で溶出を行う場合は、遠心の前にメンブレンが Nuclease-Free Water で完全に覆われていることを確認してください。15 μ l 未満で溶出することはお薦めしません(表 1 を参照)
2. DNA をアガロースゲル電気泳動で分析する場合は、最終濃度 2 \times の loading dye を推奨します。

VI. 困ったときには

症状	考えられる原因	コメント
収量が低い	ゲル片または PCR 反応に加えられた Membrane Wash Solution の比率が間違っていた。	ゲル片または PCR 反応に等量加えたかどうかを確認する(10mg のゲル片または 10 μ l の PCR 反応に対し 10 μ l)
	ゲルの融解が完全でない。	次の精製ステップに進む前にゲル片が完全に融解したことを確認する。ゲル片を完全に融解するためには、50 ~ 65 でのインキュベーションが必要です。
	分光光度計で確認できる量よりも少量の DNA が精製された。	アガロースゲル/エチジウムブロマイドで定量する。
自動蛍光シーケンスで良い結果が得られない	エタノールが Membrane Wash Solution に添加されていない。	Membrane Wash Solution にエタノールを添加し(セクション IV.A) 精製をやり直す。
自動蛍光シーケンスで良い結果が得られない	シーケンシング反応に加えた DNA 量が少なすぎる。	シーケンシング反応に用いる DNA 量を増やすか、エタノール沈殿により DNA を濃縮する。最大 7 μ l までの溶出した DNA を蛍光シーケンシング反応に用いることができます。

症状	考えられる原因	コメント
自動蛍光シークエンスで 良い結果が得られない (続き)	シークエンシング反応に加えた DNA 量が多すぎる。	DNA 量が多すぎると蛍光シークエンシングの妨げになります。より少量の DNA を用いるか、シークエンシングの前に DNA を希釈します。
	溶出に TE バッファーが使用された。	DNA をエタノール沈殿するか、DNA 断片を再度精製し、Nuclease-Free Water で溶出する。
	UV 照射の更に過剰のチミジン ダイマーの形成が起こった。	AT リッチテンプレートのチミジンダイマーの形成を最少限に抑える方法について、参考文献 1 を確認する。
制限酵素消化がうまくい かない	制限酵素の濃度または消化時 間が不十分である。	制限酵素の量を増やすか、インキュベーション時間を増やす。あるいは両方増やす。使用する制限酵素に適切な温度で、最適バッファー中で消化する。
	精製された DNA へのエタノール または塩のキャリーオーバー。	DNA をエタノール沈殿するか、DNA の容量を最終反応容量の 10% かそれ以下にする。
ゲルで確認した DNA の 収量が分光光度計の読 みよりも少なく見える	溶出された DNA 中の微量なコン タミ成分が分光光度計の読みを 人為的に上げてしまっている。	アガロースゲル/エチジウムブロマイドを用いて DNA の収量を定量する。
		DNA をエタノール沈殿する。
A260/A230 比が低い	グアニジンチオシアン酸の混入 がもっとも考えられる	比率が低くとも、このあとのアプリケーションで DNA がうまく機能しないわけではありません。A260/A230 の比率が低いことが気になる場合は DNA をエタノール沈殿する。
Spin Basket が目詰まり した	ゲル片が完全に溶解していな い	50 ~ 65 におけるインキュベーション時間を延長し、ゲル片が完全に溶解したことを確認する。
	ゲル片に対する Membrane Binding Solution の比率が低過 ぎる。	ゲル片に Membrane Binding Solution を 10mg のゲル片あたり溶液が 10 μ l と、同じ比率になるように添加する。
	吸引圧が不十分	吸引法で SV Minicolumn を用いるためには 15 inche of mercury を上回る吸引圧が必要です。吸引が不十分な場合はスピニング法を用いてください。
精製した DNA がゲルに アプライしたときにウェル から浮き上がる	エタノールのキャリーオーバー	Membrane Wash Solution が洗浄ステップからキャリーオーバーされないように注意してください。カラムが湿っている場合は、Collection Tube を空にし、SV Column セットを 1 分間、再遠心します。残留する Membrane Wash Solution を除去するために、SV Minicolumn を最後の遠心ステップで必ず 5 分間遠心してください。 DNA サンプルをゲルにアプライする前に、2 \times loading dye を添加してください。
精製した DNA のバンド がはっきりしていない	DNA がシアリング(せん断)され た	アガロースゲルを Membrane Binding Solution と穏やかに混ぜる。
	DNA がヌクレアーゼで分解され た	使用前に gel running buffer をオートクレーブする。
クローニング効率が低い	グアニジンチオシアン酸の混入 による可能性	DNA をエタノール沈殿で濃縮する

VII. 参考文献

1. Zimmermann, M., Beeck, J. and Wolf, K. (1998) Minimizing the exposure to UV light when extracting DNA from agarose gels. *BioTechniques* **25**, 586.
2. Hengen, P. (1997) Methods and reagents. Protecting vector DNA from UV light. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 182–3.
3. Grundemann, D. and Schomig, E. (1996) Protection of DNA during preparative agarose gel electrophoresis against damage induced by ultraviolet light. *Biotechniques* **21**, 898–903.
4. Cariello, N.F. et al. (1988) DNA damage produced by ethidium bromide staining and exposure to ultraviolet light. *Nucl. Acids Res.* **16**, 4157.

VIII. 付録

A. バッファーと溶液の組成

Membrane Wash Solution

(エタノール添加後)

10mM potassium acetate (pH 5.0)

80% ethanol

16.7μM EDTA (pH 8.0)

セクションIV.Aの表2にしたがって、キットに付属のMembrane Wash Solution (濃縮品)に95%エタノールを添加し、調製する。

1X TE buffer

10mM Tris-HCl (pH 7.5)

1mM EDTA (pH 8.0)

1X TBE buffer

89mM Tris base

89mM boric acid

2mM EDTA (pH 8.0)

Membrane Binding Solution

4.5M guanidine isothiocyanate

0.5M potassium acetate (pH 5.0)

1X TAE buffer

40mM Tris base

5mM sodium acetate

1mM EDTA (pH 8.0)

B. 関連製品

製品	サイズ	カタログ番号
Miniprep Vacuum Adapters	20個	A1331
PCR Master Mix*	10回分	M7501
	100回分	M7502
	1,000回分	M7505
Access RT-PCR Introductory System*	20回分	A1260
	100回分	A1250
	500回分	A1280
AccessQuick™ RT-PCR System*	10回分	A1700
	20回分	A1701
	100回分	A1702
	500回分	A1703
Agarose, LE, Analytical Grade*	100g	V3121
	500g	V3125
Ethidium Bromide Solution, Molecular Grade*	10ml	H5041
TAE Buffer, 10 × *	1,000ml	V4271
TBE Buffer, 10 × *	1,000ml	V4251

* 実験室用

ご質問等ございましたら、お気軽にお問い合わせください。
 プロメガテクニカルサービス: Tel: 03-3669-7980 e-mail: prometec@jp.promega.com