



Wizard® SV を用いたGelおよびPCR用のクリーンアップ

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

By Natalie Betz, Ph.D., and Tom Strader, B.S., Promega Corporation

概要

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemは、アガロースゲル片からのDNA断片の精製や増幅反応液からの直接精製をSV Minicolumnsを使って迅速に行うことができるキットです。精製されたDNAは、以降の蛍光シーケンシングやクローニング、標識、増幅、制限酵素消化、in vitro 転写・翻訳といった様々なアプリケーションに最適です。

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemは、標準アガロースゲルや低融点アガロースゲルからのDNA断片の精製や、増幅反応液からのPCR産物の直接精製に用いることができるキットです。

はじめに

DNA断片の精製は、分子生物学的研究において非常に頻繁に用いられる技術で、PCR、クローニング、シーケンシング、制限酵素消化、その他の酵素的操作などのアプリケーションに先立って行われます。電気溶出によってDNAをアガロースゲル片から精製することもよくありますが(1)、この方法は時間がかかり、得られたDNAもきわめて希薄であるため、さらにエタノール沈殿で濃縮する必要があります。

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemは、トリス酢酸(TAE)バッファーまたはトリスホウ酸(TBE)バッファー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・精製に用いることのできるキットで、70~95%の回収率を得ることができます。このシステムにおけるアガロース濃度の使用実績は最大3%で、アガロースの製造元の違いにより性能に差が生じることはありません。また、低融点のアガロースでも高融点のアガロースでも使用することができ、以降のアプリケーションでDNAの機能に差が生じることはありません。

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemでは、ゲルからの抽出のほかにも増幅反応液から100bp~10kbのPCR産物を直接精製することができます。回収率は80~95%です。PCR後に実施する多くのアプリケーションでは、取り込まれていないヌクレオチド、プライマー、バッファー、酵素を予め除去しておくことが必須とされているが、少なくとも望ましいとされます。

本製品はメンブレンベースのシステムであり、DNA結合能は最大40µgで、単離したDNAをわずか15分で回収することができます(所要時間はサンプル数に依存)。精製されたDNAは、以降の蛍光自動DNAシーケンシングやクローニング、標識、制限酵素消化、in vitro 転写・翻訳などといった様々なアプリケーション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。ゲルから精製する場合は、電気泳動後にゲルから目的のDNAバンドを切り出し、グアニジンイソチオシアナ酸(Membrane Binding Solution)の存在下で溶解します。PCR後の精製の場合は、Membrane Binding Solutionを増幅反応液に直接添加します。溶解したゲル片は、マイクロ遠心機または吸引装置を用いてメンブレンを通過させます。その際、DNAはシリカメンブレンの表面に結合し、単離されます。

結合したDNA断片をMembrane Wash Solutionで洗浄後、DNAを水で溶出します。このシステムは、直鎖のDNA断片やPCR産物、スーパーコイル状のプラスミドDNA、あるいは直鎖または環状の1本鎖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ことが予想されます。

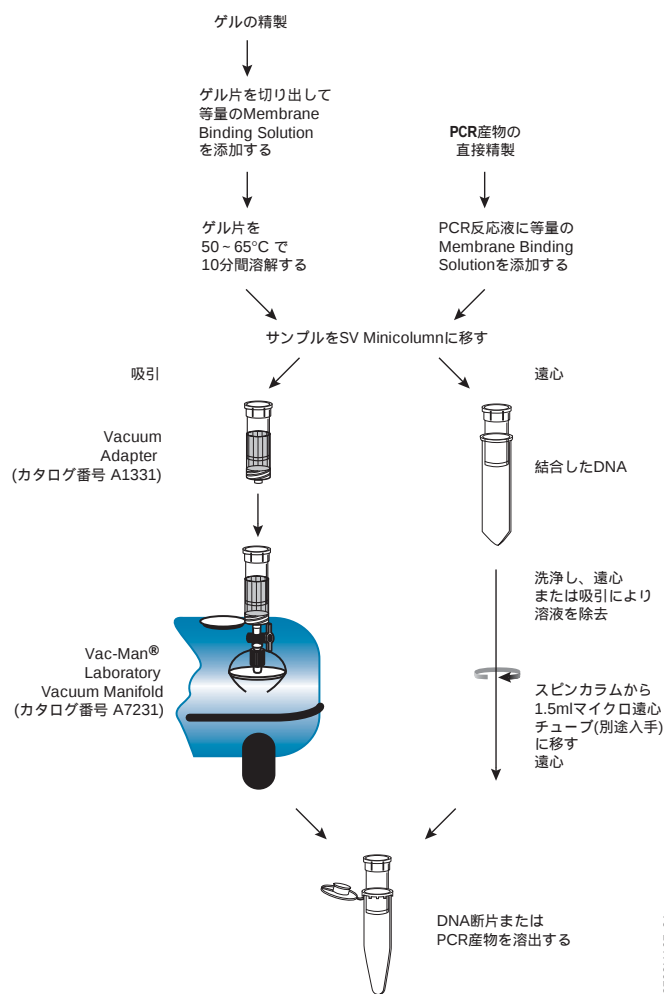


図1. Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemを用いたDNA断片のゲル精製またはPCR産物の直接精製のフローチャート

製品の特性

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemでは、図1に示すシンプルなプロトコルを用います。この手順の所要時間は約15分（サンプル数やサンプルの種類に依存）で、必要な器具はマイクロ遠心機のみです。

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemを用いれば、0.1～10kbのDNA断片を効率的に精製することができます（表1および図2）。回収率は、各350mgの1%アガロース / TAEゲル片から精製したDNAのゲル分析を行うことにより評価しました（カラムあたり1つのゲル片を精製）。DNA断片サイズが大きい場合は、溶出に温水（65～80℃）を用いることにより精製効率を高めることができます。カラムの最大DNA結合容量は40μgですが、本システムでは1ゲル片から10ngという微量のDNA精製にも成功しています。

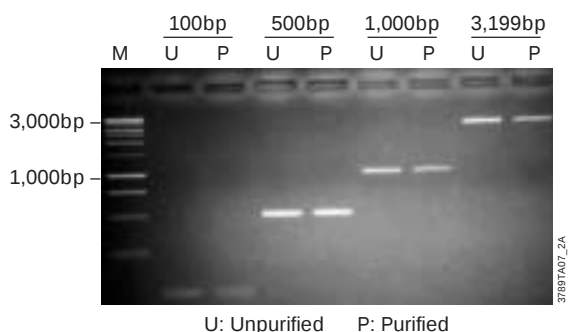


図2. Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemを用いたゲル抽出前後のPCR産物のゲル分析。表示サイズの未精製（U）および精製後（P）のDNA断片を分析した。レーン1は1kb DNA Ladder（カタログ番号 G5711）。U: 未精製 P: 精製後

表1. Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemを用いてアガロースゲルからDNAを精製した場合のDNA断片サイズ別の回収率

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

図3および表2は、直接精製法により精製した様々なサイズのPCR産物について平均回収率を示したものです。100bp、200bp、500bp、1,000bp、1,500bpのPCR産物はPCR Master Mix（カタログ番号 M7501、M7502、M7505）で増幅しました。3,199bpのDNA産物は模擬反応（mock reaction）から精製した直鎖状pGEM®-3Zf（+）Vector DNAです。回収率はゲル分析によって測定しました。このシステムは、取り込まれていないプライマーを増幅反応液から効率的に除去することができ、ミネラルオイルは精製に影響を与えません。

表2. Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemで様々なサイズのPCR産物を処理した場合のDNA断片サイズ別の回収率

DNA 産物のサイズ	回収率
100bp	85%
200bp	87%
500bp	91%
1,000bp	92%
1,500bp	92%
3,199bp	87%

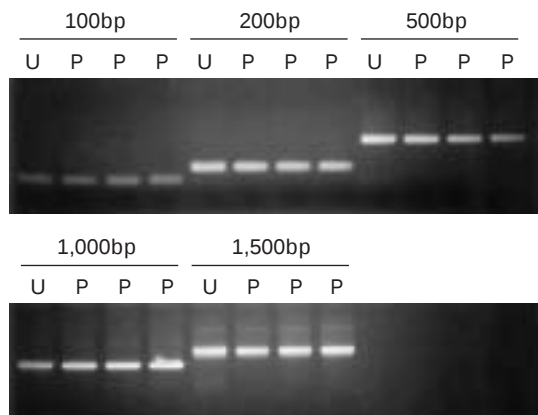


図3. Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemでの直接精製前後におけるPCR産物のゲル分析。表示サイズのDNA断片を精製前（U）および精製後（P）に分析した。

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemでは、様々な増幅酵素、バッファー、PCR増強剤を使用することができます。プロメガでは、PCR添加物が1,000bpのPCR産物の回収効率に及ぼす影響について、13種類の添加物を検討しました。結果は、表3に示すとおり、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemを用いた直接精製においてすべての添加物を使用することができました。

標準的なプロトコルには、50μlのNuclease-Free Waterで溶出するステップが含まれています。しかし、15μlのNuclease-Free Waterで溶出することにより、DNAをさらに濃縮した状態で精製することもできます。表4に、700bpのPCR産物を直接精製により様々な量のNuclease-Free Waterで溶出し、エチジウムブロマイドゲル分析で定量した場合の収率を示しました（実験はトリプリケートで実施）。10μlの場合には、スピバスケット内のシリカメンブレンに十分に水分が行きわたらず、収率が低下するため、10μl未満での溶出はお薦めしません。

表3. 1,000bpのPCR産物をWizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemを用いて直接精製法で精製した場合に種々のPCR添加物が回収率に及ぼす影響

PCR 添加物	回収率*
添加物なし	100%
1M ベタイン	94%
1M Q-Solution	97%
0.1% Triton® X-100	92%
0.1% Tween® -20	87%
0.1% NP-40	82%
5% グリセロール	87%
5% ホルムアミド	90%
5% DMSO	87%
0.5M テトラメチレンスルホキシド**	94%
0.4M スルホラン**	94%
0.4M 2-ピロリドン**	95%
1mM タートラジン	100%
1% Ficoll® -400	100%

* 回収率は、“添加物なし”の回収率に対する相対値として示す。

** 上記PCR添加物の詳細については参考文献2～4を参照。

機能性

本システムを用いて1,000bpのPCR産物をゲル精製し、T-ベクターでのクローニング、制限酵素消化、蛍光自動シークエンシングに関して評価を行いました。精製したDNAは、pGEM® -T Easy Vectorに効率的にライゲーションされ、試験したすべての制限酵素により完全に消化されました（*Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III; データは示していません）。精製した断片にはABI BigDye® Terminator蛍光シークエンシング試薬を使用することが可能で、700bpを上回る平均解析長と、98%を上回る確度が得られました（図4）。TAEアガロースゲル片とTBEアガロースゲル片との間で回収率、クローニング、制限酵素消化、シークエンシングに差は見られませんでした（データは示していません）。同じ1,000bpのPCR産物を増幅反応液から直接精製した場合にも、クローニングおよびシークエンシング効率に関して同様の結果が得られています（データは示していません）。

ゲル精製したDNA断片は、プロメガの様々なTNT® Systemを用いたin vitro転写・翻訳反応用テンプレートとしても、そのまま最適にご使用いただけます（データは示していません）。特に、TNT® T7 Quick SystemやTNT® T7 Quick for PCR DNA Systemでは、直鎖のDNAテンプレートがうまく機能します。

競合他社製品の分析

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemで精製した様々なサイズのDNA断片の回収率を、競合Q社のゲル抽出およびPCR精製用キットで精製した場合の回収率と比較しました。Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemは、競合Q社のキットと同等またはそれ以上の性能を示しました（表5）。また、どちらのシステムを用いた場合も、精製DNAは同等の機能性を示しました（データは示していません）。

通常、1本のスピンバスケットで最大350mgの単一ゲル片を処理することができます。しかし実際には、SV Minicolumnsでは融解したアガロース総量で最大3.5gを処理することができ、これは1%アガロースゲル片の10×350mgに相当します。等量のDNAを1片、2片、5片、あるいは10片のゲル片から精製した場合でも、収率や機能に差は見られませんでした（データは示していません）。このことは、1種類のDNA断片が複数のゲルレーンに分散している場合や、DNA断片が1つの大きな

表4. 増幅反応液から700bp PCR産物を直接精製した場合の溶出液量別の回収率

溶出液量	回収率*
10μl	35%
15μl	98%
25μl	98%
50μl	100%
75μl	100%
100μl	100%

* 回収率は、50μlの溶出液を用いた場合の回収率に対する相対値として示す。

ゲル片に含まれている場合に有利となります。競合するQ社のゲル抽出用キットのプロトコルでは、スピンカラムあたり400mgを上回る融解アガロースを処理することは推奨されていません。したがって、DNAサンプルが大きなアガロースゲル片に含まれる場合、複数のカラムを使って処理したのち、溶出したDNAをプールし、さらにエタノール沈殿により濃縮する必要性が高いと考えられます。このような処理は時間がかかるだけでなく、エタノール沈殿中にDNA断片を損失する恐れもあります。

1本のSV Minicolumnで最大1mlの増幅反応液を処理することができます。そのため、希薄なPCR産物の濃縮や多量の反応液からの精製にも用いることができます。一方、競合Q社のPCR精製用キットでは、カラムあたり100μlを上回る反応液の処理は推奨されていません。また、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemでは、10μlという微量の反応液からのPCR産物精製にも成功しています。

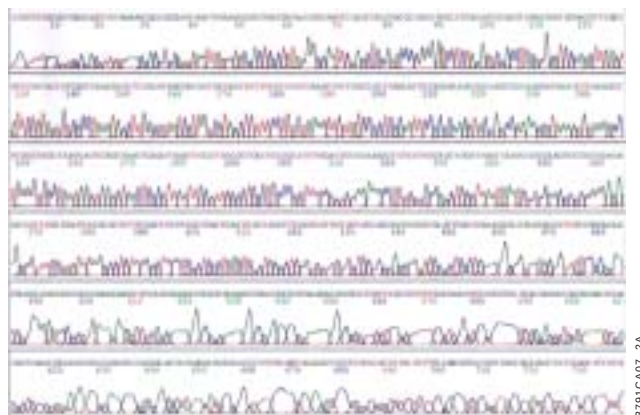


図4. 350mg 1%アガロース / TAE ゲル片から精製した1,000bp PCR産物のABI BigDye® Terminator試薬使用によるシークエンシング

表5. 様々なサイズのDNA断片または PCR産物の回収率に関する Wizard® SV Gel and PCR Clean- Up Systemと競合Q社ゲル抽出および PCR精製用キットの比較

サイズ	Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	競合Q社ゲル抽出用キット
55bp	26%	32%
70bp	39%	41%
85bp	55%	61%
100bp	84%	65%
500bp	89%	91%
1,000bp	92%	75%

サイズ	Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	競合Q社PCR精製用キット
100bp	85%	85%
200bp	86%	84%
500bp	91%	94%
1,000bp	92%	90%

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	50回分	A9281	11,000
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	250回分	A9282	45,000
Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold, 20-sample capacity	1セット	A7231	45,000
Vac-Man® Jr. Laboratory Vacuum Manifold, 2-sample capacity	1個	A7660	3,000
Vacuum Adapters	20個	A1331	2,000

結論

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemは、標準アガロースゲル片からのDNA断片の精製や、増幅反応液からの直接精製に用いることができるキットです。本製品は操作が簡単で、100bp ~ 10kbのDNA断片を70 ~ 95%という回収率で効率的に精製することができます。精製されたDNAは、以降の様々なアプリケーションでそのままご使用いただけます。

参考文献

1. Ausubel, F.M. *et al.* ed. (2001) In: *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., New York, 2.6.1.
2. Chakrabarti, R. and Schutt, C.E. (2002) *Biotechniques* **32**, 866–874.
3. Chakrabarti, R. and Schutt, C.E. (2001) *Gene* **274**, 293–298.
4. Chakrabarti, R. and Schutt, C.E. (2001) *Nucl. Acids Res.* **29**, 2377–2381.