



## Wizard® SV 96 PCR Clean-Up System のご紹介

By Megan Buros, Randy Hoffmann, B.S., and Terri Grunst, B.S., Promega Corporation

## 概要

Wizard® SV 96 PCR Clean-Up Systemは、増幅反応液から2本鎖のPCR産物を直接精製することができるハイスループットのDNA断片精製システムです。本システムは様々な使用方法にフレキシブルに対応し、手で操作することも、Beckman社のBiomek® 2000やBiomek® FXなどの自動分注ワークステーションを使って自動で操作することもできます。

Wizard® SV 96 PCR Clean-Up Systemは、ハイスループットの自動化が容易なフォーマットで、PCR断片を迅速に精製することができます。本製品を用いてDNA断片を精製することにより、安定した高い回収率が達成でき、得られたDNA断片は以降の様々なアプリケーションに最適です。

## はじめに

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (カタログ番号 A9281、A9282)では、少検体の2本鎖DNA断片の精製が行えるようにスピニングベースの手動システムを採用しております。Wizard® SV 96 PCR Clean-Up Systemでは、単独スピニング方式の利点を96ウェルのウォークアウェイ自動精製システムに統合することにより、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemの確実性と簡便性にすぐれた精製方法をハイスループットフォーマットに拡張することに成功しました。

Wizard® SV 96 PCR Clean-Up Systemは、PCR増幅により生成したDNA断片を高い回収率で精製することができる迅速・簡便な方法です。このシステムでは精製プロセスを自動化することもでき、グリッパー付属型の96ウェル用分注装置であればどのような装置でも使用することができます。この方法を用いれば、96検体から約20分で2本鎖DNA断片を精製することができます。精製過程においてフェノール/クロロホルム抽出やエタノール沈殿を行う必要はありません。Beckman社のBiomek® 2000とFXの両装置については、実証ならびにバリデーション済みの自動化PCRクリーンアップ方法がすでに確立されています。

## 手順

Wizard® SV 96 PCR Clean-Up Systemは、96ウェルの吸引ろ過ステップにより反応液からPCR断片を効率的に精製するため、面倒な遠心操作を行う必要はありません(図1)。PCRサンプルに等量のMembrane Binding Solutionを添加し、これをBinding Plateにアプライします。2本鎖PCR産物はSV 96のBinding Plateに結合します。結合したPCR断片を洗浄する際にマニホールドを取りはずす必要はなく、ろ液は吸引トラップに直接排液されるため、精製中に排液回収容器を空にする必要がありません。精製されたPCR産物はNuclease-Free WaterによってBinding Plateから溶出し、96ウェルのCollection Plateに回収されます。Collection Plateは保存が容易で、以降のアプリケーションに直接使用することができます。

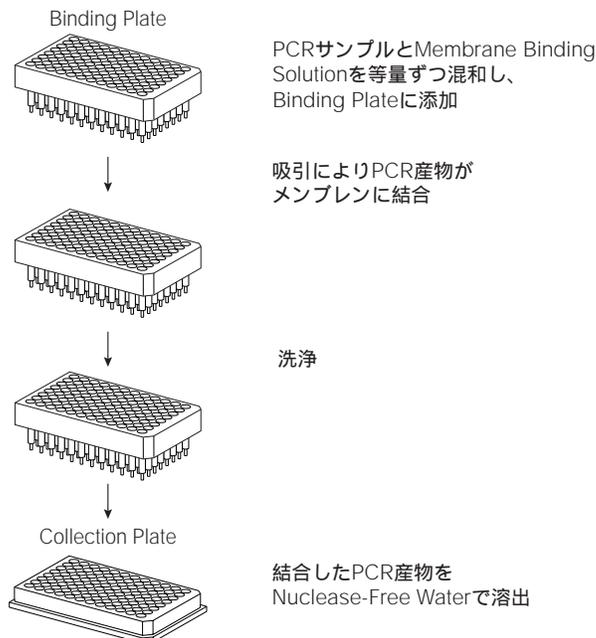


図1. Wizard® SV 96 PCR Clean-Up System プロトコルの概要

## システムの性能

先にご紹介したとおり、プロメガのWizard® SV製品では多様なPCR条件下で生成した2本鎖PCR断片の精製を効率的に行うことができます(3ページの記事をご参照ください)。Wizard® SV 96 PCR Clean-Up Systemは、PCR産物の自動精製・回収が可能で、2本鎖DNA断片を長短にかかわらず効率的に精製することができます(図2)。短い断片(< 500bp)を精製する場合は、洗浄に95%エタノールを使用します。このような簡単なプロトコルの改変と、シリカメンブレンの選択性により、サイズ排除に基づくDNA精製システムでは不可能な短いPCR産物の回収も効率的に行うことができます。

Wizard® SV 96 PCR Clean-Up Systemを用いれば、様々なDNAポリメラーゼやPCR添加物を含有する多様なPCR増幅条件でも、回収率に影響することなくPCR産物を精製することができます(図3)。精製したPCR断片は、そのまま蛍光自動シーケンシングに使用することができます。精製した1,000bpのPCR断片の平均Phred 20スコアは600を上回ります。Phredスコアは、ベースコールが正確である確率を示すクオリティ評価値です。スコアが20の場合、ベースコールが正確である確率は99%です(1,2)。

Wizard® SV 96 PCR Clean-Up Systemで精製したPCR断片は、マイクロアレイ分析にも最適です(図4)。PCR産物をPCR添加物の共存下にスポッティングすると、マイクロアレイ分析がうまくいかない場合があります(データは示していません)。図4は、Wizard® SV 96 PCR Clean-Up Systemを用いてPCR産物を精製した場合、PCR反応液中に添加物ベタインが存在してもマイクロアレイ分析に影響がないことを示しています。

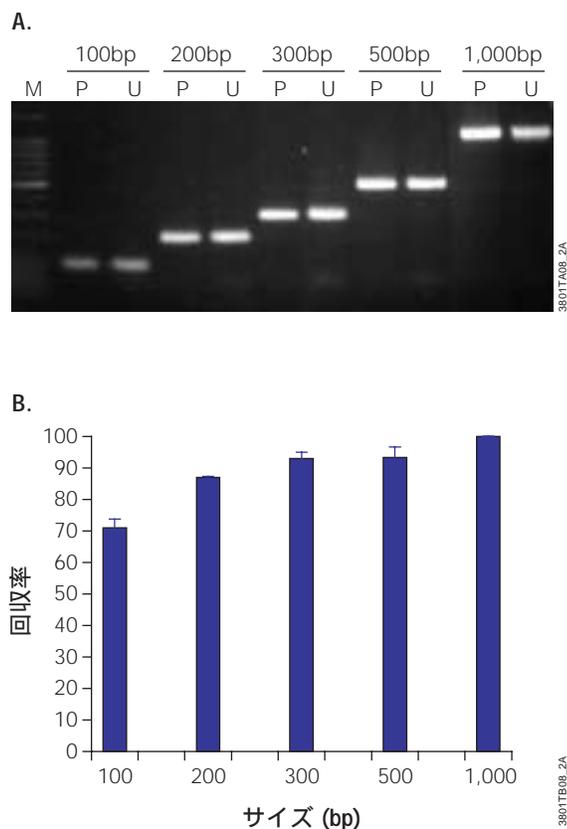


図2. PCR産物の精製および回収率。100、200、300、500、1,000塩基対のPCR断片を、Biomek® 2000自動ワークステーションを用いてWizard® SV 96 PCR Clean-Up Systemで精製した。パネルA：アガロースゲルの分析。精製後(P)および未精製(U)の断片をエチジウムブロマイド染色2%アガロースゲルで分離した。パネルB：精製したPCR産物の回収率。回収率はHitachi FMBIO® Fluorescent Scannerで定量した。結果は、各サイズにつき6つの精製断片の平均値と標準偏差で示した。短いPCR断片(< 500bp)の場合、最適な回収率を得るには95%エタノールで洗浄する必要がある。長い断片(> 500bp)の場合は80%エタノールで洗浄することにより最適な結果が得られる。

### ゲル精製への応用

Wizard® SV 96 PCR Clean-Up Systemを用いた96ウェルフォーマットでゲル片からのDNAの精製も行いました。DNA断片を含有するゲル片を、同重量または等量のMembrane Binding Solutionを添加した96ウェルディープウェルプレートに移します。65℃で10分間インキュベーションしてアガロースを融解させたのち、この溶液をSV 96 Binding Plateにアプライします。次いで吸引し、DNA断片をプレートに結合させます。洗浄および溶出の手順に関しては標準プロトコルを変更する必要はありません(図1)。このように手順を改変することにより、ゲル片からのDNA断片をハイスループットで精製することができます。ゲル片から精製したDNA断片の回収率は、PCRから直接回収した場合と比べて低くなります。通常、Wizard® SV 96 PCR Clean-Up Systemを用いてゲル片から精製したDNA断片の回収率は70%を上回ります(データは示していません)。本アプリケーションの詳細については、プロメガのテクニカルサービスまでお問い合わせください。

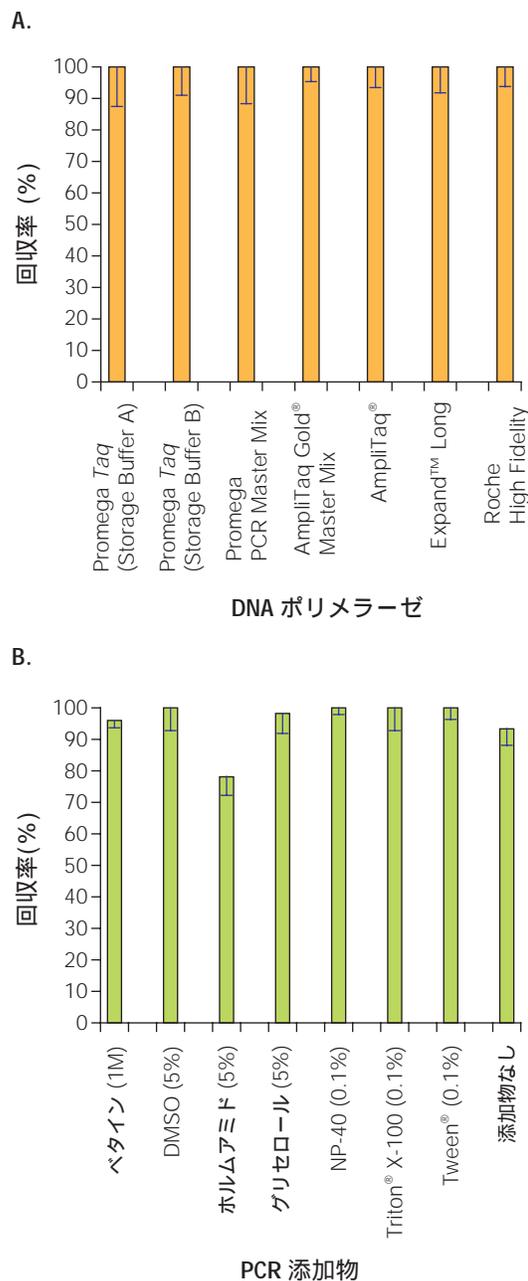


図3. PCR産物の回収率は増幅条件の相違による影響を受けない。複数のポリメラーゼ(パネルA)およびPCR添加物(パネルB)を用いて生成したPCR産物の精製後の回収率を評価した。結果は、4精製検体の平均値と標準偏差として示す。

## Beckman社Biomek® 2000およびFXロボットワークステーションを用いた自動化PCRクリーンナップ

Wizard® SV 96 PCR Clean-Up Systemのプロトコールは、分注ワークステーションを用いた自動化に容易に応用することができます。プロメガでは、Wizard® SV 96 PCR Clean-Up SystemをBeckman社のBiomek® 2000およびFXロボットで使用できることを確認済みです。Biomek® 2000のデッキの初期設定を図5に示します。Biomek® FXの場合はデッキの設定が異なる可能性があります。FXを用いる方法では、少なくともSPEおよびSPEホルダー-ALPS、チップローダー、および96ウェルヘッド用の8つのポジションが必要となります。Wizard® SV 96 PCR Clean-Up Systemを自動分注ワークステーションで使用するには、各ワークステーション専用の吸引装置が必要となります。Biomek®用のPCR断片精製プログラムを表1に示します。

### 結論

Wizard® SV 96 PCR Clean-Up SystemはハイスループットのDNA断片精製システムで、PCR産物を手動・自動にかかわらず迅速に精製することができる柔軟なフォーマットを備えています。本製品を用いてDNA断片を精製することにより、安定した高い回収率が達成でき、得られたDNA断片は、以降の蛍光自動シーケンシングやマイクロアレイ分析などのアプリケーションに最適です。

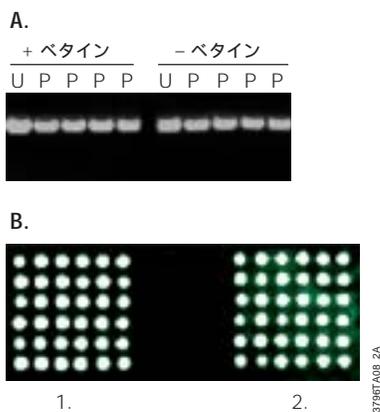


図4. 精製したPCR産物のマイクロアレイ。PCR産物 (300bp) を1Mベタインの存在下または非存在下で増幅し、Wizard® SV 96 PCR Clean-Up Systemを用いて精製した。パネルA: アガロースゲルの分析。ベタインの存在下 (+) または非存在下 (-) に増幅したPCR産物を、精製後 (P) または未精製のまま (U) エチジウムブロマイド染色2%アガロースゲルで分離した。パネルB: 相補的なCy® 3標識 cDNAにハイブリダイズした精製PCR産物の代表的なマイクロアレイブロック。1) 標準的な増幅条件 (ベタイン非存在下) で増幅したPCR産物。2) PCR反応液に1Mベタインを添加。

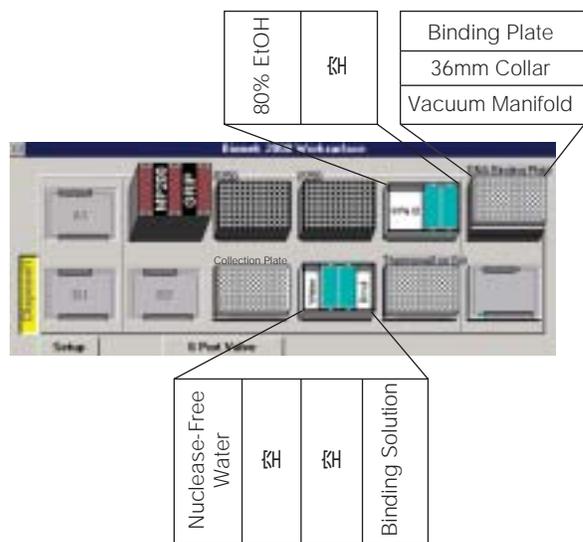


図5. Biomek® 2000のデッキの初期設定。Wizard® SV 96 PCR Clean-Up Systemを使用する場合は、MP200とGripperが必要であり、どちらもポジションA2に設置する。ポジションA1、B1、B2には何も設置しない。P250チップの箱は、ポジションA3およびA4に設置する。ポジションA5には、80%エタノール洗浄液を充填したりザーバーを設置する。ポジションA6には、吸引アセンブリを設置する。吸引アセンブリは、Beckman社製の吸引装置の上部にBeckman社製の36mmカラーを取り付けたものである。Binding Plateはこのカラー上に積み重ねられる。ポジションB3には96ウェルのCollection Plateを設置する。ポジションB4には、Nuclease-Free WaterとBinding Solutionを充填したりザーバーを設置する。ポジションB5には、96ウェルのU底プレート上に96ウェルのPCRプレートを設置する。ポジションB6はカラーホルダーで、Binding Plateからの溶出用の吸引アセンブリの組み立て、取り外し、再組み立てに用いられる。

表1. PCR断片精製用のBiomek® プログラム

手順	作業内容
1	Biomek® を用いて100µlのBinding SolutionをPCRサンプルに添加・混和する。
2	サンプルをBinding Plateに移す。吸引によりサンプルがプレートを通過することによってDNAが結合する。
3	サンプルを200µlの80%エタノールで3回洗浄する*。
4	Binding Plateを軽く吸引乾燥する。
5	Binding Plateをカラーホルダーに移動させ、Collection Plateを吸引装置に設置する。Binding PlateをCollection Plate上部に設置する。
6	Binding PlateにNuclease-Free Waterを添加することにより、DNA断片をCollection Plateに溶出する。

\*断片サイズが500bp未満の場合は95%エタノールを使用することを推奨する。

### 参考文献

- Ewing, B. *et al.* (1998) *Genome Res.* **8**, 175–185.
- Ewing, B. and Green, P. (1998) *Genome Res.* **8**, 186–194.

### 製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Wizard® SV 96 PCR Clean-Up System	1 × 96ウェル分	A9340	25,000
	4 × 96ウェル分	A9341	80,000
	8 × 96ウェル分	A9342	150,000