

Nucleic Acid Purification ガイド

吸引法で核酸精製をスピードアップ



Contents:

- プラスミド
(Wizard® & PureYield™)
- PCR産物
- ゲノムDNA
- Total RNA

Vacuum

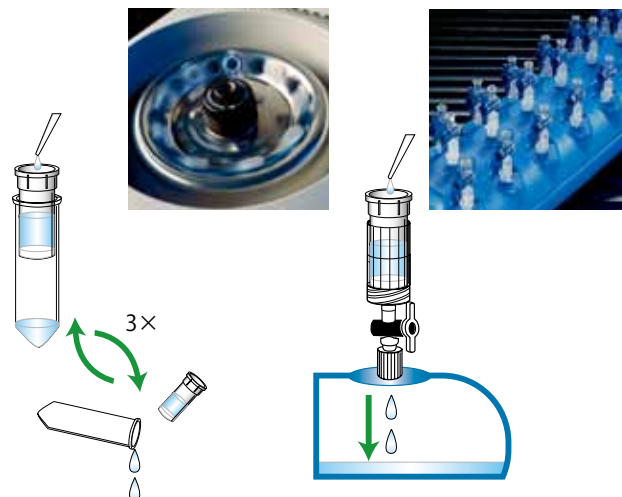
メンブレンテクノロジーと吸引法

マルチプレックス分析やリアルタイム PCR など新しい核酸分析法が汎用されるようになりより純度の高い DNA/RNA を迅速に調製する必要性が生じています。スタートサンプルとしてクオリティーの高い核酸を確実に得ることは実験計画をスムーズに運ぶための重要な要素です。プロメガの核酸精製システムはこれまでに様々な分子生物学的アプリケーションに使用されてきた実績があり、その品質の高さと使いやすさは世界中で認められています。シリカメンブレンと吸引処理法（または遠心）を採用したシンプルなプロトコルにより大幅に核酸の調製時間を削減することができます。

メンブレンテクノロジーを採用したシングルカラム（ミニ&ラージ）、96 ウェルプレート の各フォーマットは、処理量や処理数に応じてお選び頂け、同様の精製クオリティーを共有することができます。カオトロピックな条件下で核酸を選択的に捕捉するシリカ特性を活かした多孔性シリカメンブレンを共通の担体として利用し、試薬の組成 / プロトコルにより精製するターゲットを変えるプロメガ独自の核酸精製技術です。このメンブレンベースのシステムは、優れた洗浄効率、乾燥特性、迅速な操作性などシリカレジンを超えるいくつもの特性を持っています。プロメガでは、これらのメンブレンと最適化された試薬を組み合わせることにより、様々なソースから特定の核酸を精製することができます。Wizard® および PureYield™ とともに遠心法と吸引法により核酸の洗浄操作を行えますが、簡便な吸引法を利用することにより煩雑な遠心機の操作や待ち時間を省略することができます。

吸引法の特長

- ハイスピードな核酸精製
例) PureYield™ Plasmid Maxiprep System なら
約 1 時間で最大 1mg のプラスミドを精製可能
- 吸引マニホールド Vac-Man® で 20/96 サンプルを 1 度に精製
- 洗浄ステップが大幅に簡略化
(煩わしい遠心操作の繰り返しを低減)
- プラスミド、PCR 産物、ゲノム DNA、
Total RNA の各種キットを用意



吸引法の簡便性

遠心法による洗浄ステップでは遠心操作を繰り返すため (Wizard® SV minipreps の場合 3 回)、各ミニカラム / チューブを遠心機にセットし、遠心後に洗浄廃液を捨てる作業も同様に繰り返す必要があります。それに対して吸引法では吸引マニホールドにカラムを一度 セットすれば面倒な洗浄廃液除去工程である煩雑なミニカラム / チューブの付け替えを繰り返す必要がありません。



PureYield™ Midi と他社製品の操作時間の比較 (動画)

www.promega.com/multimedia/17483/17483.html

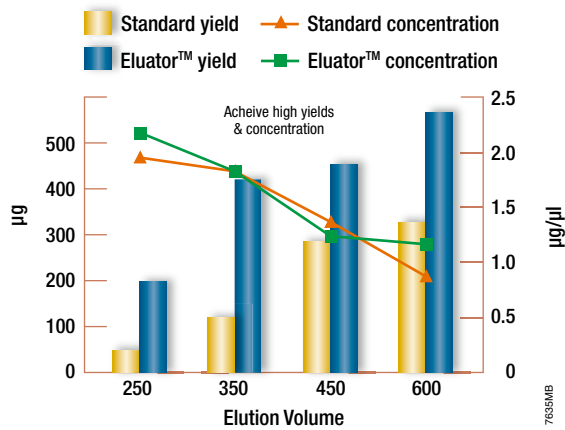


Vac-Man® 96

洗浄廃液はマニホールド外の吸引トラップに排出されるため、精製中にマニホールドを分解する必要がありません。

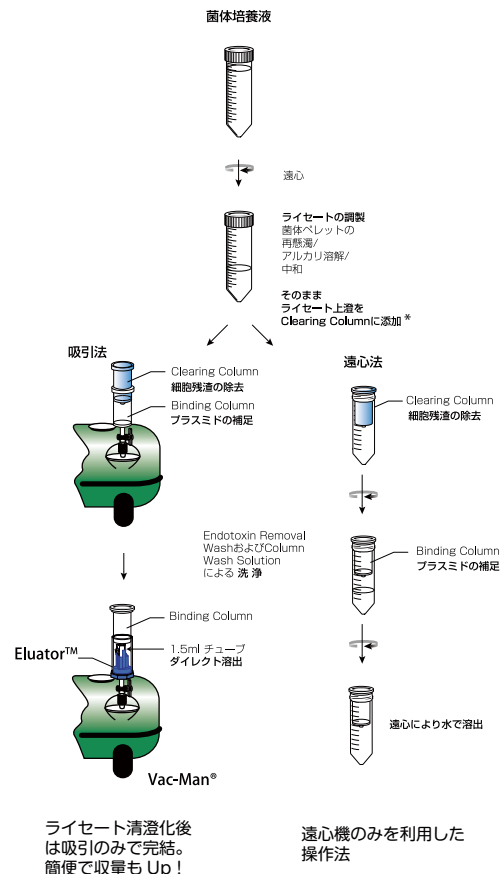
Eluator™ による吸引法：遠心操作にかかる時間を削減し、簡便に大量のプラスミドを調製（Plasmid Midi & Maxi）

Eluator™ Vacuum Elution Device は PureYield™ Midi & Maxi System における溶出操作を吸引法で行うためのデバイスです。これまでの吸引法でも最後の溶出は遠心操作を伴っていましたが、Eluator™ を用いれば吸引により 1.5ml チューブへ核酸を溶出させることができるため、クリアリセート調製後の操作を一貫して吸引法で行うことができます。これにより、複数回の遠心分離で浪費されていた時間（2-3 時間）を短縮することができます。また、収量増加も期待できます。



標準法と Eluator™ を用いた吸引法との収量および濃度の比較

PureYield™ Midiprep を用いて一昼夜菌体培養液（ハイコピープラスミド）50ml からプラスミドを精製した際の収量比較。標準法は遠心による溶出を行った。Eluator™ Vacuum Elution Device を用いれば、1.5ml チューブに直接溶出が可能です。



* 菌体量が多い場合は遠心による清澄化が必要です。

吸引法と遠心法の操作概要

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold, 20-sample capacity	1 セット	A7231	45,000
One-Way Luer Lok® Stopcocks	10 個	A7261	3,000
Eluator™ Vacuum Elution Device	4 個	A1071	20,000
Vacuum Adaptors	20 個	A1331	2,000
製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Vac-Man® 96 Vacuum Manifold	1 セット	A2291	60,000
Collar for Vac-Man® 96 Vacuum Manifold	1 個	A2311	20,000

プロメガ資料： www.promega.co.jp/lit/vacman.html

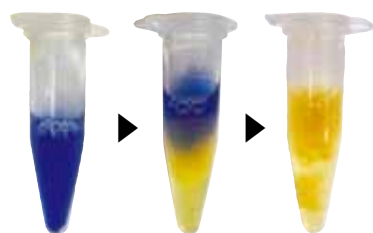
プラスミド精製

ミニプレップシステム (トランスフェクショングレード)

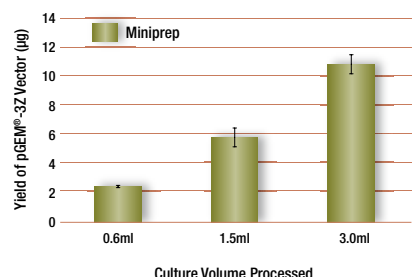
PureYield™ Minipreps System

- ・スピードアップ: 10 分でプラスミドを精製
- ・高純度: トランスフェクショングレードのプラスミドを精製
- ・信頼の結果: 溶解、中和ステップが指示薬により視認可能
- ・柔軟: 吸引法、遠心法が選べます。
- ・収量: 15µg プラスミド

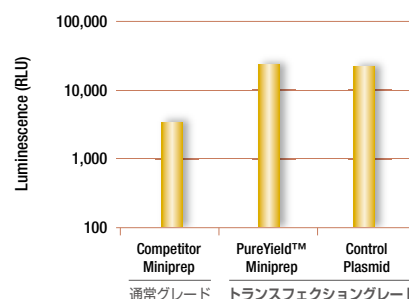
本製品は高純度なプラスミド DNA を迅速に精製するためのシステムです。このシステムでは 600µl から 3ml の菌体培養液から最大 15µg のプラスミド DNA を精製することができ、10 分で操作を完了することができます。プラスミドからタンパク質、RNA、エンドトキシンを除去するためにデザインされたユニークな Endotoxin Removal Wash が組み込まれています。トランスフェクションや in vitro 転写 / 翻訳など繊細なアプリケーションにも適応します。イソプロパノール沈殿や多くの遠心操作が無く、簡便、迅速に精製することができます。このシステムは吸引法または遠心法で操作することができます。



指示薬により不完全な溶解・中和を防ぎます
各ステップを色で目視できるため確実な精製が行えます



菌体培養液量にともなうプラスミドの収量



トランスフェクション効率の比較

CHO細胞にトランスフェクションしたpGL4より発現したホタルルシフェラーゼ活性を比較

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
PureYield™ Plasmid	100 回分	A1223	22,000
Miniprep System	250 回分	A1222	48,000

プロメガ資料: www.promega.co.jp/lit/pureyieldmini.html

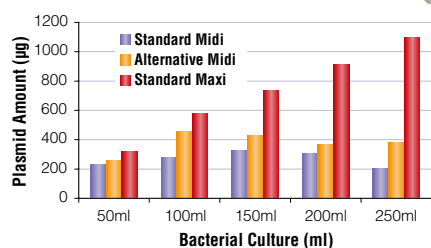
※吸引で処理する場合マニホールドが別途必要です (3 ページ参照)。

ミディ&マキシプレップシステム (トランスフェクショングレード)

PureYield™ Midipreps & Maxipreps System

- ・再現性の向上: 吸引法による簡便で効率的な精製
- ・高純度: トランスフェクショングレードのプラスミド精製
- ・簡便: 重力落下カラムやアルコール沈殿処理が不要
- ・柔軟性: 新規なメンブレンにより大量のプラスミドを精製
- ・収量: Midiprep: 100 ~ 200µg プラスミド DNA
Maxiprep: 1mg プラスミド DNA

トランスフェクショングレードのプラスミド DNA を精製するためにデザインされています。プラスミド DNA は 30 分以内に精製することができ、シリカ - レジンやその他のメンブレンカラム法に比べ所要時間が飛躍的に短縮化されます。大部分のタンパク質、RNA、エンドトキシン混入物を除去するためのユニークな Endotoxin Removal Wash が組合せられており、トランスフェクション、in vitro 転写 / 翻訳 など繊細なアプリケーションへの適応性が向上します。精製プラスミドのイソプロパノール沈殿や高速遠心を用いない迅速な精製が行え、プラスミドの高濃度溶出も可能です。Eluator™ を用いれば溶出も吸引で行えます。



PureYield™ MaxiprepとMidiprep Systemの収量比較

pHMGFP プラスミドを含むJM109 培養液より精製した。Midiprep標準吸引法、Midiprep改変法 (ライセートクリアリングを変更)、Maxiprep標準法で行った (Midiprep標準吸引法では50ml菌体培養液からの精製を推奨)。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
PureYield™ Plasmid Midiprep	25 回分	A2492	27,000
System	100 回分	A2495	96,000
	300 回分	A2496	お問合せ下さい

プロメガ資料: www.promega.co.jp/lit/pureyield.html

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
PureYield™ Plasmid Maxiprep	10 回分	A2392	25,000
System	25 回分	A2393	58,000

プロメガ資料: www.promega.co.jp/lit/pureyieldmaxi.html

※本製品にはスイングローターの遠心機が必要です。
また、吸引で行う場合はマニホールド、Eluator™ が別途必要です (3 ページ参照)。

プラスミド精製

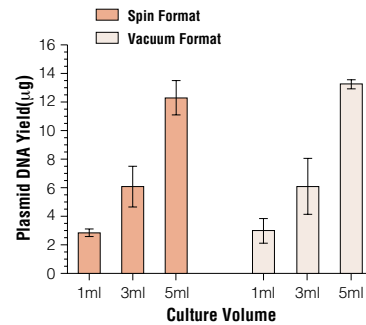
ミニプレップシステム

Wizard® SV Minipreps System

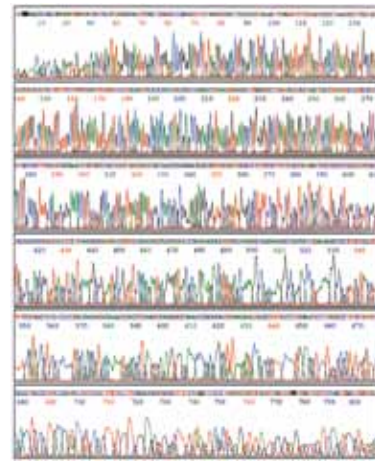


- **高収量**：1 ～ 20µg DNA
- **迅速**：20 個を 45 分以内に精製
- **簡便**：有機溶媒を用いた抽出操作が不要
- **柔軟性**：遠心法と吸引法を選択可能
- **ユニーク**：アルカリプロテアーゼにより EndA+ 大腸菌からの精製も可能
- **アプリケーション**：蛍光シーケンシングを含む分子生物学実験に使用可能

本システムは、遠心法と吸引法のどちらでもプラスミド精製を行える画期的なシステムです。カラムと一体になったシリカメンブレンに DNA が吸着されることを利用しています。遠心法は、一般的なマイクロ遠心機を用いて DNA を精製する方法です。吸引法は、吸引装置（ポンプなど）とマニホールドを利用し、減圧で洗浄を行います。一般的な分子生物学の用途（蛍光シーケンシングや制限酵素処理など）に適応するプラスミド DNA を精製できます。



吸引法と遠心法における収量比較



蛍光BigDye®ターミネーターシーケンシングの結果

各ロットごとに、精製したプラスミドの塩基配列が98%以上の精度で500塩基以上解析できることをABI PRISM® 377 DNAシーケンサーを用いて解析しています。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	50 回分	A1330	11,000
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System + Vacuum Adaptors	50 回分	A1340	12,000
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	250 回分	A1460	44,000
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System + Vacuum Adaptors	250 回分	A1470	45,000
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	1000 回分	A1465	お問合せ下さい

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/wizsvmini.html

※吸引で処理する場合はマニホールドが別途必要です（3 ページ参照）。

96ウェルミニプレップシステム

Wizard® SV 96 Minipreps System



- **柔軟性**：手動と自動のどちらにも順応
- **迅速**：60 分以内に操作完了
- **新しいプレートのデザイン**：プレートの溶出ノズルを長く、口径を大きくすることにより、溶出液の飛沫が最小限
- **汎用性**：蛍光シーケンシングをはじめ一般的な分子生物学実験に最適

この製品は 60 分以内に 96 個のサンプルからプラスミドを同時に精製するシステムです。精製操作は手動でも自動（ロボット）でも行えます。精製されたプラスミドは自動蛍光シーケンシングをはじめ、その他の分子生物学実験に最適です。



手動による精製



自動化例

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Wizard® SV 96 Plasmid DNA Purification System	96 ウェル分	A2250	37,000
	5×96 ウェル分	A2255	142,000
製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Wizard® SV 96 Binding Plates	10 枚	A2271	110,000
Wizard® SV 96 Lysate Clearing Plates	10 枚	A2241	80,000

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/wizsv96pmd.html

※精製処理にはマニホールドが別途必要です（3 ページ参照）。

フラグメント精製

ゲル抽出と PCR 産物精製システム

Wizard® Gel & PCR System



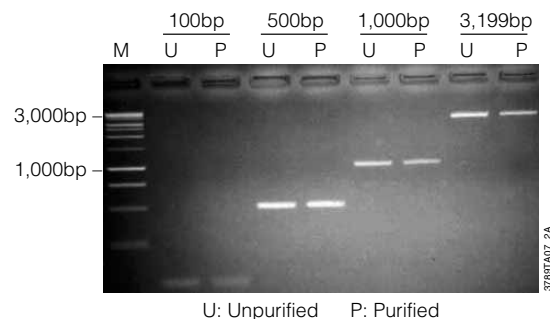
- オールインワン：ゲル精製、PCR 精製の両方が行えます。
- 任意の濃度で溶出可能：溶出液量 15μl でも 98%の回収率
- 柔軟性：遠心法と吸引法を選べます。
- 高い結合容量：最大 40μg
- 高い回収率：70 ~ 95% (100bp ~ 10kb)
- ゲル精製：標準または低融点アガロースゲル (TAE/TBE) から
- アプリケーション：精製した DNA は、自動蛍光シーケンシング、クローニング、ラベリング、制限酵素消化、in vitro 転写 / 翻訳にそのまま使用可能
- 操作時間：20 分以下

本製品は PCR 産物およびゲルスライスからの DNA 抽出を短時間・簡単に精製するためのシステムです。PCR 反応からダイレクトに DNA を精製するだけでなく、同じシステムで TAE および TBE 中のアガロースゲルスライスからの DNA 抽出も行える便利なシステムです。DNA 結合容量 40μg のメンブレンをベースにしたこのシステムは他の SV シリーズ同様に精製操作を遠心 (Spin) または吸引 (Vacuum) で行うことができます。本製品の品質は、精製した DNA が蛍光シーケンシングにより > 98%の精度で 700 塩基以上解析可能であることで確認されています。

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
	250 回分	A9282	45,000
	1000 回分	A9285	お問合せ下さい

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/wizsvgelpcr.html

※吸引で処理する場合、マニホールド、アダプターが別途必要です (3 ページ参照)。



Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systemでゲル抽出する前後のPCR産物のゲル分析

(U) 精製前、(P) 精製後、レーン1：1kb DNA Ladder (カタログ番号 G5711)

DNA断片長ごとの回収率

DNA断片長	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%

溶出液量ごとの回収率

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

96 ウェル PCR 産物精製システム

Wizard® SV 96 PCR System



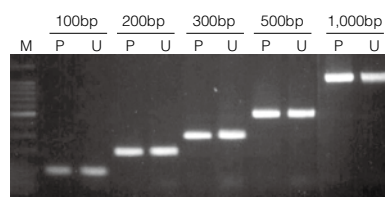
- 便利：処理量に合わせて手動 / 自動が選べる柔軟性
- 迅速：96PCR 産物を約 20 分で精製
- 高い回収率：500bp および 1000bp 断片の平均回収率は 90%
- 柔軟性：ゲルスライスからの DNA 精製にも使用可能
- 機能的：精製 DNA は BigDye ターミネーターシーケンシングやマイクロアレイ分析に最適
- 適応性：多くのロボットプラットフォームに適応

本製品は PCR 産物を 96 ウェルフォーマットで簡単に精製するためのシステムです。メンブレンベースの結合プレートに PCR 産物をトラップし、余剰のヌクレオチドやプライマーを除去します。バキュームマニホールドを用いた手動精製および Biomek® 2000/FX などの自動分注機を用いた自動精製も行えます。

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

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/wizsv96pcr.html

※精製処理にはマニホールドが別途必要です (3 ページ参照)。



PCR産物の精製と回収

PCR断片100, 200, 300, 500および1,000 bpは、Wizard® SV 96 PCR Clean-Up System およびBeckman Biomek® 2000 robotic workstationを組み合わせて精製した。精製後 (P) と精製前 (U) の断片を2%アガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイドで染色した。

ゲノムDNA精製

ゲノム DNA 精製システム

Wizard® SV Genomic DNA System



- **迅速**：ライセート調製後 20 分で操作完了
- **サンプル処理量**：20mg 組織、1.2cm マウス尾、 5×10^6 細胞
- **高収量**：20 ~ 30 μ g DNA (1.2cm マウス尾の場合)
- **高純度**：PCR にそのまま使用可能
- **柔軟性**：遠心法と吸引法を選べます。

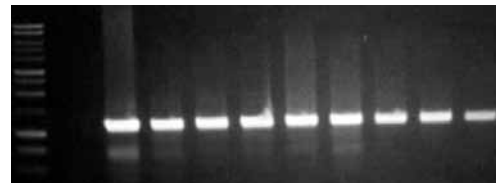
この製品は、組織（マウス尾など）や培養細胞から迅速、簡便にインタクトなゲノム DNA を精製するシステムです。サンプル数にもよりますが通常 20 分で精製することができます。また、このシステムは他の SV シリーズ同様に精製操作を遠心（Spin）または吸引（Vacuum）で行うことができます。組織サンプルの場合、Proteinase K が別途必要です。1 回あたりのサンプル処理量は、組織の場合約 20mg、培養細胞の場合 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 個です。本システムで精製された良質なゲノム DNA は、PCR、アガロースゲル分析、制限酵素処理に最適です。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格（¥）
Wizard® SV Genomic DNA Purification System	50 回分	A2360	18,000
	250 回分	A2361	70,000

プロメガ資料： www.promega.co.jp/lit/wizsvngen.html

※吸引で処理する場合、アダプターが別途必要です（3 ページ参照）。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



精製したゲノムDNAを用いたPCR分析

様々な組織から精製したゲノムDNA各1 μ lをサンプルとし、PCR Master Mix（カタログ番号 M7502）およびマウスIL-1 β 特異的プライマー（1.2kb PCR産物を合成）を用いてPCRを行った。陽性コントロールとしてMouse Genomic DNA（カタログ番号 G3091）を使用した。レーン1、1Kb DNA Ladder（カタログ番号 G5711）；レーン2、陰性コントロール；レーン3、陽性コントロール；レーン4、尾（遠心法）；レーン5、肝臓（遠心法）；レーン6、心臓（遠心法）；レーン7、脳（遠心法）；レーン8、尾（吸引法）；レーン9、肝臓（吸引法）；レーン10、心臓（吸引法）；レーン11、脳（吸引法）

Wizard® SVおよびSV96 Genomic DNA Purification System
による様々なサンプルからのゲノムDNA平均収量

サンプル	サンプル量	平均収量
Mouse Tail Clipping	20mg	20 μ g
Mouse Liver	20mg	15 μ g
Mouse Heart	20mg	10 μ g
Mouse Brain	20mg	6 μ g
CHO Cells	1×10^6 cells	5 μ g
NIH3T3 Cells	1×10^6 cells	9 μ g
293 Cells	1×10^6 cells	8 μ g

96 ウェルゲノム DNA 精製システム

Wizard® SV 96 Genomic DNA System



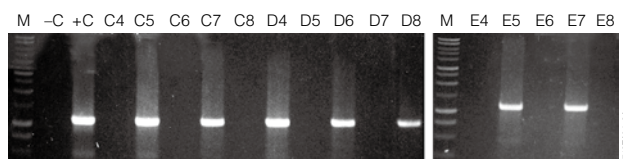
- **迅速**：マウス尾の場合 45 ~ 60 分、培養細胞の場合 30 分で操作完了
- **サンプル処理量**：20mg 組織、1.2cm マウス尾、 5×10^6 細胞
- **高収量**：20 ~ 30 μ g DNA (1.2cm マウス尾の場合)
- **高純度**：PCR にそのまま使用可能
- **自動化**：自動精製に最適のシステム

この製品は、組織（マウス尾など）や培養細胞から 96 ウェルフォーマットで迅速、簡便にインタクトなゲノム DNA を精製するシステムです。このシステムでは手動操作はもとより、自動分注装置を用いた自動化にも対応します。遠心や沈殿操作が不要で、組織 / 細胞のライセートからゲノム DNA 精製まで 1 時間以内に完了します。組織サンプルの場合、Proteinase K が別途必要です。本システムで精製された良質なゲノム DNA は、PCR、アガロースゲル分析、制限酵素処理に最適です。自動分注機で操作する場合は、機器専用のマニホールドが必要です。ゲノム DNA は吸引濾過により精製されるので、遠心操作が不要です。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格（¥）
Wizard® SV 96 Genomic DNA Purification System	1×96 回分	A2370	32,000
	4×96 回分	A2371	119,000

プロメガ資料： www.promega.co.jp/lit/wizsv96gen.html

※手動で操作する場合、マニホールドが別途必要です（3 ページ参照）。



クロスコンタミネーションアッセイ

96ウェルプレートへマウス尾サンプルおよび水を交互に分注し、ゲノムDNAを精製した。精製後、各ウェルから1 μ lを鋳型として、マウスIL-1 β 特異的プライマーで増幅した。10 μ lのPCR産物を1.5%アガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイドで染色した。バンドのサイズは約1.2kb。水をサンプルとしたものからはPCR産物は検出されなかった。

Total RNA 精製

Total RNA 精製システム

SV Total RNA Isolation System



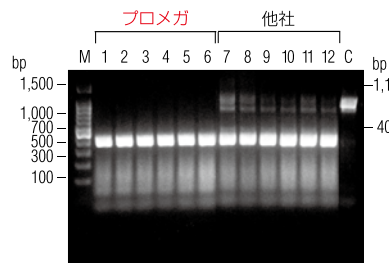
- **確実**：DNase 処理によりゲノムの混入は最低限
- **高性能**：インタクト、高純度、高収量 RNA を調製 (A260/A280>1.8)。
- **順応性**：遠心法 (spin) と吸引法 (vacuum) を選択可能
- **安全性**：フェノール不要で迅速なプロトコル
- **迅速**：組織サンプルの場合、Total RNA を 60 分で単離
- **便利**：同じサンプルからの RNA/DNA 単離も可能。

SV Total RNA Isolation System は細胞、組織や血液などのサンプルから、迅速、安全に Total RNA を効率よく単離する進歩的なシステムです。RNA の単離は遠心法 (spin) あるいは吸引法 (vacuum) により行うことができます。また PCR に影響を及ぼすゲノム DNA の混入を低減する DNase 処理も含まれます。従来のグアニジン・フェノール/クロロホルム方式に比べ短時間に処理することができ、少量サンプルの処理能力に優れています。このシステムで単離された RNA は RT-PCR やノーザンブロッティングを含む通常の分子生物学実験に使用できます。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
SV Total RNA Isolation System	10 回分	Z3101	10,000
	50 回分	Z3100	28,000
	250 回分	Z3105	128,000

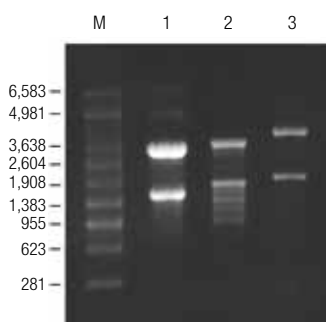
プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/svrna.html

※吸引で処理する場合、マニホールド、アダプターが別途必要です (3 ページ参照)。



RT-PCRによる混入ゲノムDNAの比較

Total RNAはプロメガ及び他社製品を用いて、マウス肝臓 30mgから単離し、イントロンを挟む IL-1βプライマーで RT-PCRを行った。ゲノムDNAの混入があると目的バンド (401bp) の他に1,123bpのバンドが観察されます。



植物、細菌、酵母からのTotal RNA精製

レーン1：大腸菌 (E.coli)、
レーン2：トマト (Lycopersicon.sp.)、
レーン3：酵母 (S.cerevisiae)

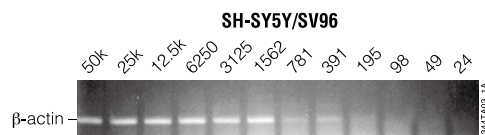
96 ウェル Total RNA 精製システム

SV 96 Total RNA Isolation System



- **高純度**：DNase 処理でゲノム DNA を除去
- **柔軟性**：手動でも自動でも操作可能
- **迅速**：96 サンプル 60 分以内に処理
- **簡単**：フェノクロ抽出、エタノール沈殿、遠心操作が不要
- **保証**：精製された RNA を RT-PCR でテスト済み

本製品は組織培養細胞から純度の高いインタクトな RNA を迅速・簡単に精製するシステムです。Beckman 社の Biomek® 2000 や FX などの自動化ワークステーションにも対応し、1 時間以内に 96 サンプルから Total RNA を精製することができます。また、PCR に影響を及ぼすゲノム DNA の混入を低減する DNase 処理も含まれています。



少数の細胞から精製したTotal RNAのRT-PCRによる検出

Total RNAはヒト神経芽腫細胞 (SH-SY5Y cells) から精製した。溶出液4μlを鋳型として β-Actin Primer Pairs (カタログ番号G5740) で RT-PCRを行った。細胞数を各レーン上に示し、391個の細胞からでも明瞭なバンドを示した。

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
SV 96 Total RNA Isolation System	1×96ウェル分	Z3500	44,000
	5×96ウェル分	Z3505	176,000

プロメガ資料：www.promega.co.jp/lit/sv96rna.html

※精製処理にはマニホールドが別途必要です (3 ページ参照)。

プロメガ株式会社

本社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

※製品の仕様、価格については2010年7月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店