

製品名: Long ssDNA Preparation Kit

Cat. #	製品名	サイズ	
DS615	Long ssDNA Preparation Kit for 1.5 kb		
Box 1 (−20℃)	pLSODN-1	10 μ g	(0.5 μ g/ μ l)
	pLSODN-2D	10 μ g	(0.5 μ g/ μ l)
	Denaturing Gel-Loading Buffer	1 ml	
	Nicked pLSODN-1 (1.5 kb Fragment)	100 μ l	(0.1 μ g/ μ l, 50 loadings)
Box 2 (RT)	Long ssDNA Gel Extraction Kit for 3kb (#DS640)	25 preps	
DS625	Long ssDNA Preparation Kit for 3.0 kb		
Box 1 (−20℃)	pLSODN-3	10 μ g	(0.5 μ g/ μ l)
	pLSODN-4D	10 μ g	(0.5 μ g/ μ l)
	Denaturing Gel-Loading Buffer	1 ml	
	Nicked pLSODN-3 (3 kb Fragment)	100 μ l	(0.1 μ g/ μ l, 50 loadings)
Box 2 (RT)	Long ssDNA Gel Extraction Kit for 3kb (#DS640)	25 preps	

保存条件: Box 1 は −20℃で、Box 2 は15℃～25℃で保存してください。
受領してから24ヶ月安定です。

キット概要

本キットにより簡便に長鎖一本鎖DNA(long ssDNA)を調製することができます。本法では、PCR、エキソヌクレアーゼ反応、逆転写酵素反応などを用いないことから、内部や末端に変異や欠失を含まない正確な配列を有するlong ssDNAを得ることができます。

本キットでは、dsDNA 断片を得るとほぼ同様の手順で、long ssDNA を調製することができます。まず目的の配列をプラスミドにクローニングし、得られたプラスミドを2つのニッキング酵素、またはニッキング酵素と制限酵素の組み合わせで切断します。このニックを入れたプラスミドを、Denaturing Gel-Loading Bufferを添加して変性させた後、アガロースゲル電気泳動を行います。バンドを切り出し、添付のLong ssDNA Gel Extraction Kit で抽出・精製することで目的のLong ssDNAが得られます。

キットの他に必要なもの

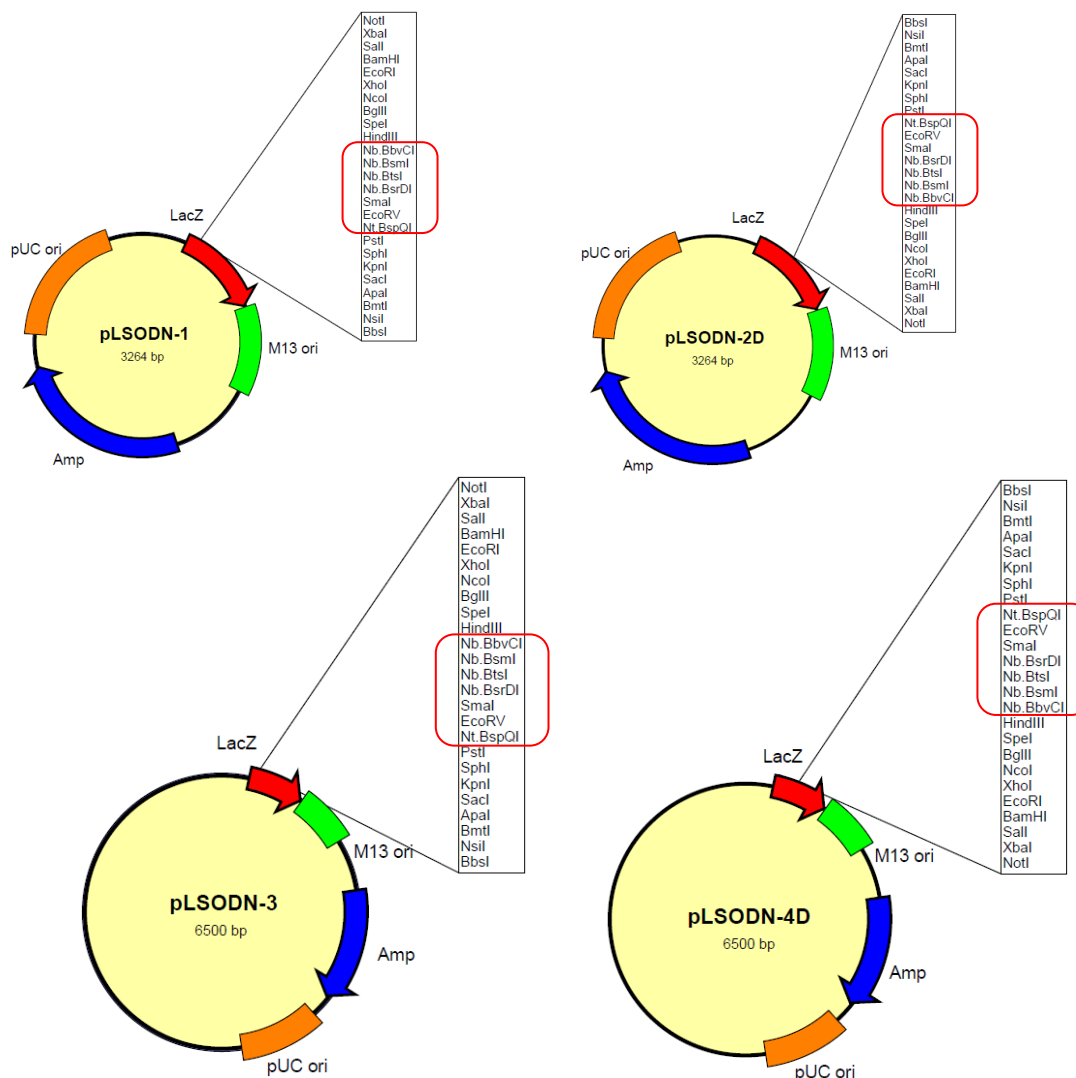
本キットをご使用いただくにあたって下記試薬を別途ご用意ください。

- ・ Nicking Endonuclease (Nt.BspQI、Nb.BsrDI、Nb.BtsI、Nb.BsmI、Nb.BbvCI の内の 1 種又は 2 種)
- ・ アガロース (Seakem GTG™ Agarose 等)
- ・ エタノールとイソプロパノール
- ・ 50℃と70℃に加温できるヒートブロックか湯浴

キット構成

1) Plasmids

下図は pLSODN-1～pLSODN-4 のプラスミドマップです。赤い線で囲んだボックス内はニッキング酵素認識部位を含む領域を示しています。



2) Denaturing Gel-Loading Buffer

Denaturing Gel-Loading Bufferはアガロースゲル電気泳動を用いて目的のlong ssDNAを得るためのローディングバッファーです。ニックを入れたプラスミドにDenaturing Gel-Loading Bufferを混合、加熱・冷却して変性させた後、電気泳動します。電気泳動中、ニックを入れたプラスミドのDNAは変性した一本鎖状態を維持したまま泳動されます。

3) Nicked pLSODN-1 (1.5 kb Fragment) or Nicked pLSODN-3 (3 kb Fragment)*1

製品添付のニックを導入したプラスミドであるNicked pLSODN-1 (1.5 kb Fragment)あるいはNicked pLSODN-3 (3 kb Fragment)は、ゲル電気泳動時の分子量マーカースとしてご利用いただけます。^{*2}これらはゲル上で僅か3本のバンドを与えるだけですが、プラスミドのバックボーンが共通していることから、目的のlong ssDNAの同定や実験のモニターに有用です。^{*4}

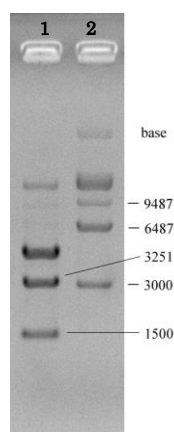


図 1. 分子量マーカであるNicked pLSODN-1 (1.5 kb Fragment)と Nicked pLSODN-3 (3 kb Fragment) の変性後の電気泳動図^{*1, *2, *3}
 1.2%アガロースゲル(1 × TAE)、ゲルはEtBrにて染色しUVライト下で撮影
 Lane 1: 変性処理したNicked pLSODN-1 (1.5 kb Fragment)
 Lane 2: 変性処理した Nicked pLSODN-3 (3 kb Fragment)

- *1 pLSODN-1 (1.5 kb Fragment) は、1.5 kb fragment DNA 断片を pLSODN-1 の 2 つのニッキング酵素サイト間 (Nt.BspQI と Nb.BsrD) に挿入して構築したプラスミドです。pLSODN-3 (3 kb Fragment) も同様に 3 kb fragment DNA 断片を pLSODN-3 に導入して構築したプラスミドです。製品添付の両分子量マーカは、これらプラスミドを二つのニッキング酵素 (Nt.BspQI と Nb.BsrDI) で処理して作製されています。Nicked pLSODN-1 (1.5 kb Fragment) は、ゲル電気泳動で 2 本の直鎖状 ssDNA (1,500 塩基と 3,251 塩基) と一つの環状 ssDNA (4,751 塩基) を与えます。同様に Nicked pLSODN-3 (3 kb Fragment) は 2 本の直鎖 ssDNA (3,000 塩基と 6,487 塩基) と一つの環状 ssDNA (9,487 塩基) を与えます。
- *2 両分子量マーカは、75% Denaturing Gel-Loading buffer 中、0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度になっているので、使用直前に加熱・冷却するだけでゲルにアプライしてご使用いただけます。変性した一本鎖DNAは二本鎖DNAに比べEtBrでの染色が弱くなることが知られていますが、分析を主眼としたアガロース電気泳動では1レーン当たり150 ng～300 ng程度(添付分子量マーカ1.5 μl ～3 μl 相当)で十分な染色像を与えます。
- *3 しばしば Nicked pLSODN-1 (1.5 kb Fragment)では 4,751 塩基の直鎖状 ssDNA のバンドが、Nicked pLSODN-3 では 9,487 塩基の直鎖状 ssDNA のバンドが観察されますが、これらは環状のプラスミド全体の ssDNA のランダムな破断によって生じたバンドで、元はオープンサーキュラープラスミドに由来しています。図 1 では 9,487 塩基の直鎖状 ssDNA のバンドは観察されますが、4,751 塩基の直鎖状 ssDNA のバンドは 4,751 bases のプラスミド全体の環状 ssDNA に重なり観察されていません。
- *4 Nicked pLSODN-1 (1.5 kb Fragment) あるいは Nicked pLSODN-3 (3 kb Fragment)は、分析用途のゲル電気泳動では有用な分子量マーカとなりますが、目的の long ssDNA を切り出し調製するためのゲル電気泳動で使用すると、試料への混入の可能性がありますのでご注意ください。

4) Long ssDNA Gel Extraction Kit for 3kb (#DS640)

キット内容: 25回用

コンポーネント	内容	サイズ
Crystal Violet Solution	Crystal Violet 4mg/ml (2,500 ×)	5 ml
Gel-Dissolving Buffer	カオトロピック塩としてguanidine thiocyanateを含有	45 ml
Wash Buffer 1	Tris-base buffer 使用前に100 % ethanol 45 ml を添加してください	8 ml
Wash Buffer 2	Tris-base buffer 使用前に100 % ethanol 45 ml を添加してください	11 ml
Elution Buffer	10 mM Tris-HCl, pH 8.0	5 ml
Spin Column		25 pieces
Collection Tube		25 pieces

・キット構成成分Gel-Dissolving Buffer には沈殿が生じる場合があります。そのような場合は容器ごと37℃に暖め、析出物を完全に溶解させてからご使用ください。

キット説明

Long ssDNA Gel Extraction Kit は、アガロースゲルから長鎖一本鎖DNA (long ssDNA) を抽出・精製するためのキットです。スピンカラム、バッファー処方、プロトコールは、高純度・高収率にlong ssDNAを調製できるよう最適化されています。また、二本鎖DNAに比べ、脆弱なlong ssDNAを扱うことから、機械的せん断や紫外線による劣化の低減が図られています。本キットで調製したlong ssDNAは、分子生物学の基礎的研究から応用研究まで幅広い用途に用いることができます。

本キットはアガロースゲルからの抽出精製だけでなく、long ssDNAの精製やクリーンアップの用途一般にご使用いただけます。

特徴:

- ・ 長鎖一本鎖DNA (long ssDNA) の抽出・精製に最適化されている。
- ・ 高い回収率 (75～90%)
- ・ 高純度の精製
- ・ 物理的劣化の低減
- ・ 紫外線による損傷の低減
- ・ Crystal Violet によりゲル中のlong ssDNA を青色に染色 (可視光下)。
- ・ 電気泳動中、long ssDNAのバンドを直接観察可能。
- ・ ゲルからのバンドの切り出しが可視光下で容易に行える。
- ・ カオトロピック塩としてGuanidine thiocyanate を用いており、NaI^{*1} は使用していない。
- ・ 調製可能なlong ssDNAのサイズ: 500～3,000 bases ^{*2}
- ・ スピンカラムのlong ssDNA結合容量: 最大5 μ g
- ・ 溶出容量: $\geq 15 \mu$ l.
 - ^{*1} 残存するNaIの除去は困難で、しばしば酵素反応等を阻害します。
 - ^{*2} 200 basesのlong ssDNAも本キットで調整可能ですが、回収率は約40～45%と高くありません。

保存条件

15～25℃で24ヶ月安定

注意 Crystal Violet を扱う際は、手袋や白衣の着用など適切な保護を行って下さい。

実験のアウトライン

本キットでは、dsDNA 断片を得るのと同様の手順で Long ssDNA を調製することが出来ます。まず目的の DNA 断片を pLSODN プラスミドのマルチクローニングサイトにクローニングします。その際、目的の DNA 断片は 2 つのニッキング酵素サイトの間か、ニッキング酵素サイトと制限酵素サイトの間にクローニングします(少なくとも 1 つのニッキング酵素認識サイトを用いる必要があります)。得られた目的 DNA 断片を有するプラスミドを、クローニングに用いた 2 つのニッキング酵素、またはニッキング酵素と制限酵素の組み合わせで切断します。このようにして得られたニックが導入されたプラスミドを Denaturing Gel-Loading Buffer を加えて変性させ、次いでアガロースゲル電気泳動を行います。その後、long ssDNA に対応するバンドを切り出し、添付の Long ssDNA Gel Extraction Kit で抽出・精製することで目的の Long ssDNA が得られます。

下に示した手順で long ssDNA の調製を行います。

Step	Action	Page
STEP 1	目的DNA断片のpLSODNプラスミドへのクローニング	5-6
STEP 2	目的DNA断片を有するプラスミドへのニックの導入	7
STEP 3	エタノール沈殿による脱塩	7
STEP 4	アガロースゲル電気泳動による確認	8
STEP 5	切り出し調製のためのアガロースゲル電気泳動	9-10
STEP 6	目的 long ssDNA のゲル片からの回収	10-11

キットの使用法

STEP 1: 目的DNA断片のpLSODN プラスミドへのクローニング

次ページで示した配列は pLSODN プラスミドのマルチクローニングサイトです。目的の long ssDNA を得るには DNA 断片に適したクローニングサイト間にクローニングする必要があります。図 2 には long ssDNA を得るために推奨されるクローニングサイトの選択方法が図示してあります。その組み合わせは①～③の 3 つになります。

- ① 2 つのニッキング酵素サイト(bottom-strand ニッキング酵素と top-strand ニッキング酵素)
- ② Nt.BspQI サイトと制限酵素サイト (top-strand ニッキング酵素と 5' オーバーハングを生じる制限酵素)。
- ③ Nb タイプのニッキング酵素サイトと制限酵素サイト(bottom-strand ニッキング酵素と 3' オーバーハングを生じる制限酵素あるいは BbsI)。

クローニングの際、**少なくとも一つはニッキング酵素サイトを用いる必要があります**。それによって酵素による切断の際に分子量の異なる 3 種の ssDNA が生成され、そのうちもっとも分子量の小さいものが目的の long ssDNA となります。図 2 に示すよう、①の組み合わせでクローニングすると、酵素処理した後、『目的の long ssDNA (A)』と『ベクター側の直鎖状 ssDNA (B)』と『プラスミド全体の環状 ssDNA (C)』が生じます。②または③の組み合わせでは、『目的の long ssDNA (A)』と『ベクター側の直鎖状 ssDNA (B)』と『プラスミド全体の直鎖状 ssDNA (D)』が生じます。

また、クローニングサイトを選ぶ際は、目的の DNA 断片中にそのニッキング酵素サイトや制限酵素サイトが無いことを確認します。用途によっては目的の long ssDNA の末端に酵素の認識配列に由来する余分な塩基が残るのを最小限にするように、使用する酵素サイトを選ぶ必要があります。もし目的の DNA 断片中にクローニングに使用したいニッキング酵素サイトや制限酵素サイトが既に存在している場合は、long ssDNA の使用目的に影響しない範囲で、そのサイトに変異(例えばサイレント変異)を導入する必要があります。

pLSODN-1 または pLSODN-3 のマルチクローニングサイト

M13 Rv primer
GTG GAA TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA GCT

LacZ
ATG ACC ATG ATT ACG CCA GCG GCC GCT CTA GAG TCG ACG GAT CCG AAT TCC TCG AGC CAT GGA GAT
Met Thr Met Ile Thr Pro Ala Ala Ala Leu Glu Ser Thr Asp Pro Asn Ser Ser Ser His Gly Asp
1 5 10 15 20

SpeI HindIII Nb.BbvCI Nb.BsmI Nb.BtsI Nb.BsrDI SmaI EcoRV Nt.BspQI PstI
CTA CTA GTA AGC TTC CTC AGC GAA TGC GCA GTG GCA ATG CCC GGG ATG ATA TCG AAG AGC CTG CAG
Leu Leu Val Ser Phe Leu Ser Glu Cys Ala Val Ala Met Pro Gly Met Ile Ser Lys Ser Leu Gln
25 30 35 40

SphI KpnI SacI ApaI BmtI NsiI BbsI M13 Fw primer
GCA TGC GGT ACC GAG CTC GGG CCC GCT AGC ATA TGC ATG TCT TCA CTG GCC GTC GTT TTA CAA CGT
Ala Cys Gly Thr Glu Leu Gly Pro Ala Ser Ile Cys Met Ser Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg
45 50 55 60 65

pLSODN-2D または pLSODN-4D のマルチクローニングサイト

M13 Rv primer
GTG GAA TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA GCT

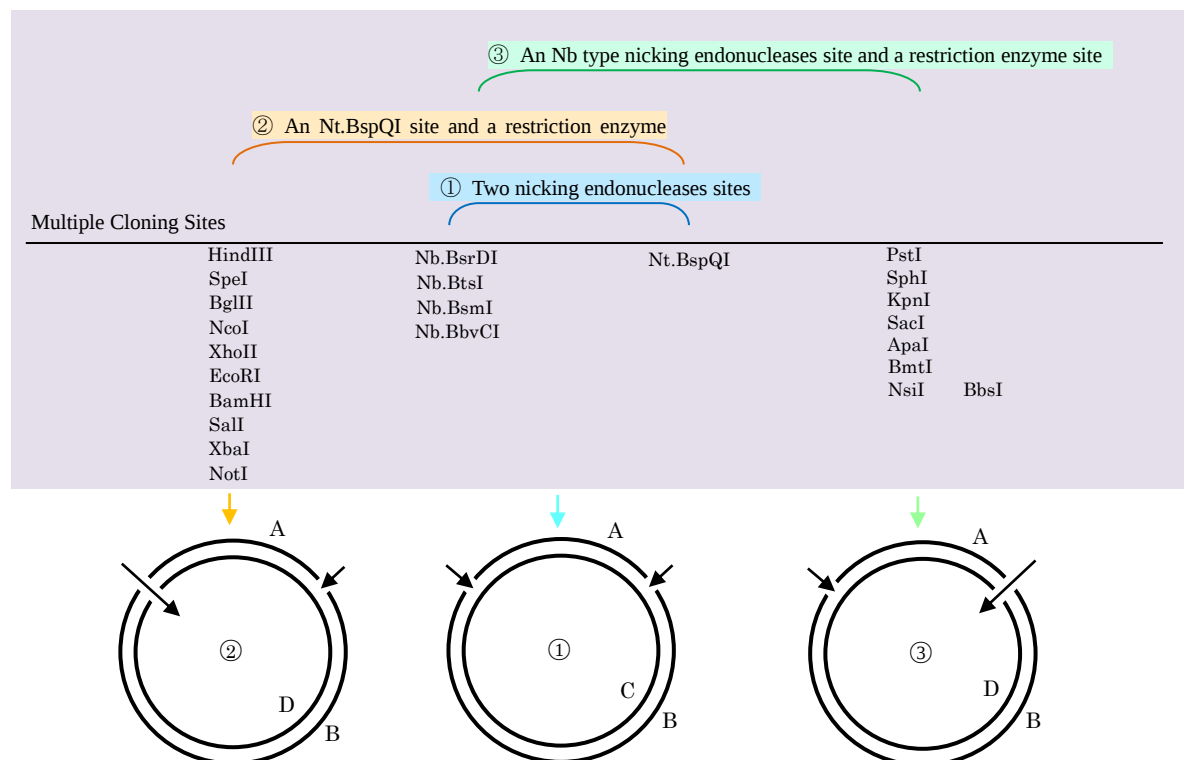
LacZ
ATG ACC ATG ATT ACG CCG AAG ACA TGC ATA GCT AGC GGG CCC GAG CTC GGT ACC GCA TGC CTG CAG
Met Thr Met Ile Thr Pro Lys Thr Cys Ile Ala Ser Gly Pro Glu Leu Gly Thr Ala Cys Leu Gln
1 5 10 15 20

Nt.BspQI EcoRV SmaI Nb.BsrDI Nb.BtsI Nb.BsmI Nb.BbvCI HidIII SpeI BglII
GCT CTT CTA TAT CAT CCC GGG CAT TGC CAC TGC GCA TTC GCT GAG GAA GCT TCA CTA GTA GAT CTC
Ala Leu Arg Tyr His Pro Gly His Cys His Cys Ala Phe Ala Glu Glu Ala Ser Leu Val Asp Leu
25 30 35 40

NcoI XhoI EcoRI BamHI SalI XbaI NotI M13 Fw primer
CAT GGC TCG AGG AAT TCG GAT CCG TCG ACT CTA GAG CGG CCG CGA CTG GCC GTC GTT TTA CAA CGT
His Gly Ser Arg Asn Ser Asp Pro Ser Thr Leu Glu Arg Pro Arg Leu Ala Val Val Leu Gln Arg
45 50 55 60 65

* 長方形のボックスで囲った配列はニッキング酵素サイトです。下向き矢印はセンス鎖のニック導入位置を、上向き矢印はアンチセンス鎖のニック導入位置を示します。

図 2. long ssDNA を得るために推奨されるクローニングサイトの選択方法



ニッキング酵素サイトを少なくとも一つは使用する必要があります。

(A) 目的の long ssDNA、(B)ベクター側の直鎖状 ssDNA、(C)プラスミド全体の環状 ssDNA、(D)プラスミド全体の直鎖状 ssDNA

STEP 2: 目的 DNA 断片を有するプラスミドへのニックの導入

STEP1 で作成した目的の DNA フラグメントをクローニングしたプラスミドを、二つのニックング酵素かニックング酵素と制限酵素の組み合わせで処理します。以下にその一例を示します。

目的の 1.5 kb DNA 断片を pLSODN-1 のマルチクローニングサイトの Nt.BspQI サイトと Nb.BsrDI サイトの間にクローニングしてプラスミド pLSODN-1(1.5 kb Fragment)を構築した。同様にして pLSODN-2D (1.5 kb Fragment)と pLSODN-3 (3 kb Fragment)、そして pLSODN-4D (3 kb Fragment) を作製した

構築したプラスミドは、下記の様にニックング酵素 (Nt.BspQI と Nb.BsrDI) で処理し、目的のフラグメントの両端の同一鎖側に一ヶ所ずつニックを導入した。

コンポーネント	容量
plasmid 100 μ g	variable
10x 3.1 NEBuffer	5 μ l
Nt.BspQI (10 unit/ μ l)	5 μ l (50 unit)
Nb.BsrDI (10 unit/ μ l)	5 μ l (50 unit)
dH ₂ O	variable
Total volume	50 μ l

50℃ 60 分間インキュベートした後、温度を上げてさらに60℃で60分インキュベートした。

STEP 3: エタノール沈殿による脱塩

STEP2 でニックを導入したプラスミドは、エタノール沈殿操作によって十分に脱塩する必要があります。**本工程の脱塩操作は long ssDNA の電気泳動を行うにあたって非常に重要です。** 酵素反応で用いた塩や Mg の残存は、dsDNA を安定化し、ニックを導入したプラスミド DNA の変性を妨げるためです。

以下にエタノール沈殿による脱塩操作の一例を示します。

- ニックを導入したプラスミドの反応溶液に 1/10 容量の酢酸ナトリウム (3 M, pH 5.2) 又は NaCl (1M) を加え混和する。^{*1, *2}
- 2.5 倍容量のエタノールまたは 0.7 倍容量のイソプロパノールを加え、混和する。
- 室温あるいは氷上で 10 分インキュベーション。
- 16,000 × g 4℃ 10 分間遠心して、上清を廃棄。
- さらに 1 分間遠心して、残存する液をマイクロピペットで完全に除く。^{*3}
- 70% エタノールを加え、激しくボルテックスする。^{*4}
- 16,000 × g 5 分間遠心して上清を廃棄する。
- さらに 1 分間遠心して、残存する液をマイクロピペットで完全に除く。
- 再度 70% エタノール を加えてリンスする (6 – 8 を繰り返す)。^{*5}
- 沈殿を乾燥させる。
- 沈殿を適当量の TE や dH₂O に溶解する。^{*6}

^{*1} エタノール沈殿を行う前に、使用したニックング酵素や制限酵素を加熱処理やフェノール抽出によって不活化する必要があります。Nt.BspQI と Nb.BsrDI の場合はその必要はありません。

^{*2} 反応バッファー中の塩濃度が高い場合は新たに塩を加える必要はありません (3.1 NEBuffer の場合は、すでに 100 mM NaCl です)。

^{*3} 塩を除くには、残液を完全に取り除く必要があります。

^{*4} ボルテックスすると、沈殿が剥離し 70% エタノール中を激しく浮遊する場合がありますが、再溶解を心配する必要はありません。脱塩操作としてむしろ効果的です。また、脱塩が進むと沈殿が粘稠になります。

^{*5} 十分に脱塩するため、70% エタノールでの洗浄は二回行います。

^{*6} TE や dH₂O への溶解の際、1～3 μ g/ μ l の濃度に調製すると、次の STEP (ゲル電気泳動操作) での取り扱いが容易になります。

STEP 4: アガロースゲル電気泳動による確認

STEP3 で脱塩したニック導入プラスミドをアガロースゲル電気泳動で確認します。

1. 脱塩処理後のニック導入プラスミドDNAに3倍容量のDenaturing Gel-Loading Bufferを加える。^{*1, *2, *3}
2. 70°Cで5分間インキュベートした後、氷上で1分間急冷する。
3. 1.2%アガロースゲルへアプライしゲル電気泳動を行う(1 × TAE、100 V 定電圧)。^{*4, *5}
4. 泳動後、0.5 μg/ml EtBr水溶液に20分ほど浸し、UVトランスイルミネーター上で観察(図3)。

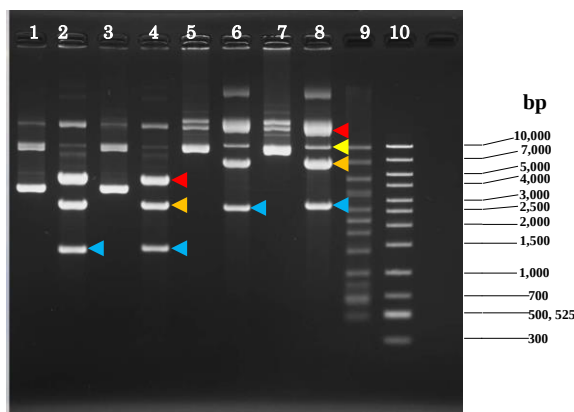


図 3. ゲル電気泳動によるニック導入プラスミドの確認

1.2% アガロースゲル(1 × TAE)

Lane 1:	pLSODN-1 (1.5 kb Fragment)	112.5 ng
Lane 2:	変性処理したNicked pLSODN-1 (1.5 kb Fragment)	250 ng
Lane 3:	pLSODN-2D (1.5 kb Fragment)	112.5 ng
Lane 4:	変性処理したNicked pLSODN-2D (1.5 kb Fragment)	250 ng
Lane 5:	pLSODN-3 (3 kb Fragment)	112.5 ng
Lane 6:	変性処理したNicked pLSODN-3 (3 kb Fragment)	250 ng
Lane 7:	pLSODN-4D (3 kb Fragment)	112.5 ng
Lane 8:	変性処理したNicked pLSODN-4D (3 kb Fragment)	250 ng
Lane 9:	変性処理したDynaMarker® DNA High D ^{*6}	5 μl (loading volume 20 μl)
Lane 10:	未変性のDynaMarker® DNA High D	5 μl

青色の矢印、オレンジ色の矢印、赤色の矢印はそれぞれ目的の long ssDNA、ベクター側の直鎖状 ssDNA、プラスミド全体の環状 ssDNA である。黄色い矢印はプラスミド全体の環状 ssDNA がランダムに切れたものである。

- *1 過剰の塩が残存しているとDenaturing Gel-Loading Buffer を添加しても、DNAを一本鎖の状態まで変性させることが出来ません。ニックを導入したプラスミドは、予め充分**脱塩しておく必要があります**。STEP3の脱塩操作をご参照ください。
- *2 ssDNAはdsDNAに比し、EtBr染色での染色が弱くなりますが、ニックを導入したプラスミドのアガロースゲル電気泳動での確認には、150 ng ~ 300 ngのプラスミド量で十分です。
- *3 ニックを導入したプラスミドをロードする際は、その**プラスミド濃度が0.5 μg/μl 以下**(Denaturing Gel-Loading Buffer 添加後の濃度として)になる様に調製することをお勧めします。
- *4 ローディングサンプルの加熱変性は、ゲルへのアプライ直前に行うことをお勧めします。
- *5 1 × TAE の組成は40 mM Tris, 20 mM acetic acid and 1 mM EDTA (ref. 6)です。
- *6 市販のDNA分子量マーカーはDenaturing Gel-Loading Buffer を混和してゲル電気泳動しても、明確な一本鎖DNAに相当するバンドを与えない場合があります。不完全な変性や相補鎖同士の相互作用、高次構造の違いによる移動度の変動等が考えられます。分子量マーカーとしてはニックを導入したプラスミドである本キット添付の分子量マーカーの使用をお勧めします。

STEP 5: 切り出し調製のためのアガロースゲル電気泳動

ニックを導入したプラスミドを、切り出し調製用のアガロースゲル電気泳動に供します。

i) Crystal Violet を含むアガロースゲルの作成

ここでは100 mlの1.2% アガロースゲルの作成の例を示します。

1. 1.2 gのアガロース粉末を100 mlの 1 × TAEに加え混和する。
2. 電子レンジで加熱してアガロース粉末を溶解する。
3. 40 μ lのCrystal Violet Solutionを、溶解したアガロースゲル（100 ml）に加える。
4. アガロースゲルを型枠に注ぎ、コームをセットして固化するのを待つ。

* ゲルは厚めに作成し、深めのウェルを形成させます。サンプルがウェルから溢れ出ないようにして他のバンドのコンタミネーションを防ぐためです。

ii) ゲル電気泳動と目的バンドの切り出し

以下に、一例を示します。

1. 電気泳動に使用する1 × TAEは、予めCrystal Violet Solutionを加え混和し、氷上で冷やしておく(100ml 1 × TAE あたり40 μ l Crystal Violet Solutionを添加)。^{*1}
2. ドラフトチャンバー内に氷を敷いたアイスバケットを置き、その上に泳動槽をセットする。^{*2, *3, *4}
3. 泳動槽に予め冷やしておいた1 × TAEを適量注ぐ。^{*5}
4. i)で作成したアガロースゲルをセットする。
5. STEP3で調製したニックを導入したプラスミドに3倍容量のDenaturing Gel-Loading Bufferを加え混和する。^{*6, *7}
6. 70°C, 5分加熱する。
7. 氷上で1分急冷する。^{*8, *9}
8. アガロースゲルにアプライし、100 V定電圧で電気泳動を行う。泳動中はTAEの温度が20°Cを超えないようにする。^{*2}
9. long ssDNAの青色バンドの移動を観察し、十分にバンドが分離出来たら泳動を止める。^{*10, *11}
10. カミソリ等で目的のlong ssDNAのバンドを切り出す。^{*12, *13}

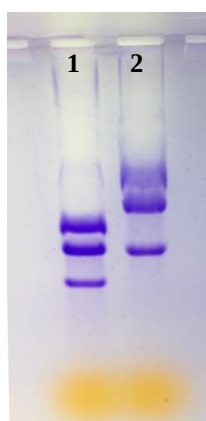


図 4. 切り出し用アガロースゲル電気泳動

1.2%アガロースゲル(5.5cm × 6.0 cm、1 × TAE)、ローディングサンプル量は 24 μ l。
可視光下で撮影。

Lane 1: 変性処理したNicked pLSODN-1 (1.5 kb Fragment) 12 μ g
Lane 2: 変性処理したNicked pLSODN-3 (3 kb Fragment) 12 μ g

← 3.0 kb (2 μ g)
← 1.5 kb (2 μ g)

*1 泳動バッファーはCrystal Violet Solutionを添加した1 × TAEを用います。

*2 安全のため、電気泳動はドラフトチャンバー内で行うことをお勧めします(さらに泳動槽上面をキムタオルなどで覆っても良いでしょう)。Crystal VioletやEtBrなどを用いた電気泳動を閉鎖空間内(低温室など)で行うのは避けてください。これらの色素は、電極での電気分解で生じた気泡の破裂とともに空气中に放出されることが知られています。

- *3 低温(20℃以下)での電気泳動が推奨されます。泳動バッファーを低温に保つことによって、より高い解像度と強い染色が得られます。泳動バッファーの温度が25℃を超えると染色は弱くなります。染色が弱くなった場合は、電気泳動後、希釈したCrystal Violet 水溶液(100 ml dH₂Oあたり40 μl Crystal Violet Solution)に浸して30分から1時間穏やかに振盪することによってゲルを再染色できます。
- *4 ゲルを低温に保って泳動を行うために、アイスバケットに敷いた氷上に電気泳動槽を置くことをお勧めします。
- *5 予め氷上で冷やした1×TAEを用いるだけでも、電気泳動中のゲルをある程度低温に保つことが出来ます。
- *6 DNAを充分に変性させるには、予めニックを導入したプラスミドを**脱塩しておくことが重要**です。酵素反応やエタノール沈殿で用いたKClやNaCl、NaOAc等が残存しているとDenaturing Gel-Loading Bufferを添加しても、DNAを一本鎖の状態まで変性できません。その結果、電気泳動での目的long ssDNAのバンドが減少し、ゲル抽出しても充分な量を得る事が出来なくなります。もし、電気泳動後の目的long ssDNAのバンドが予想より少ない場合は、サンプル中の塩の残存が考えられます。塩を除く方法としてはエタノール沈殿が推奨されます。STEP3の脱塩操作をご参照ください。
- *7 高い精製度のlong ssDNAを得るためには、バンドあたり1 μg以上の目的long ssDNAをロードすることをお勧めいたします。また同時に、ニックを導入したプラスミドをロードする際は、その**プラスミド濃度が0.5 μg/μl 以下**(Denaturing Gel-Loading Buffer 添加後の濃度として)になる様に調製することをお勧めします。また、Crystal Violetを用いた電気泳動では、long ssDNAは100 ng程度から検出可能です。
- *8 ローディングサンプルの加熱変性は、ゲルへのアプライ直前に行うことをお勧めします。
- *9 サンプルをウェルにアプライする際はサンプルがあふれ出ないように気を付けて下さい。目的以外のバンドの混入の原因になります。ゲルを作成する際に、比較的厚く、ウェルを深く作成することをお勧めします。
- *10 Crystal Violetを添加したアガロースゲルを用いることによって、目的long ssDNAの青色バンドがゲル中を移動する様子を、自然光下、リアルタイムで観察する事が出来ます。充分にバンドが分離したら電気泳動を止め、直ちに次の操作に移る事が出来ます。
- *11 Crystal Violetは正に荷電した分子で、電気泳動中は陰極側に移動するので、泳動バッファーとアガロースゲルの正極側のCrystal Violet濃度は徐々に低下します。必要なら電気泳動中にCrystal Violet Solutionを補充します。一例としては、30分毎に25 μl のCrystal Violet Solutionを正極側の250ml 泳動バッファーに添加します。
- *12 泳動槽から取り出したアガロースゲル中のlong ssDNAは可視光化で明確な青色バンドを与えます。ベンチ上での目的バンドの切り出しは容易です。
- *13 余分なゲルはできるだけ取り除いてください。

STEP 6: Long ssDNAの抽出

抽出工程開始前に:

- ・ Wash Buffer 1ボトルとWash Buffer 2ボトルに各々45 ml のエタノールを加えて混和して下さい。
- ・ 工程の4番目でイソプロパノールが必要です。
- ・ 工程の全ての遠心操作は室温(20℃～25℃)、16,000 × g (通常のマイクロ遠心機では約13,000 rpm)で行って下さい。低温での遠心操作は回収率低下の原因になります。
- ・ 本キットは酵素反応後のlong ssDNAのクリーンアップにもご使用いただけます。その用途に使用する場合は、酵素反応溶液に3倍容量のGel-Dissolving Bufferと1倍容量のイソプロパノールを加えてよく混和した後、下記プロトコルの工程の5番以下を行って下さい。

- STEP5で切り出したバンドのゲル片を1.5~2 ml マイクロチューブに移して重さを測る。
- ゲル片の3倍容量のGel-Dissolving Bufferを加える。
- 50℃で10~15分間保温する。途中何度かボルテックスし、ゲル片を溶解する。^{*1}
- 完全に溶解したことを確認後、1倍容量(ゲル片と等量)のイソプロパノールを加えて良く混和する。
- Spin ColumnをCollection Tubeにセットする。
- 混合液をSpin Columnに添加し、1分間遠心(16,000 × g、室温)する。Collection Tube内のろ液を1 ml ピペットを用いて吸引廃棄する。^{*2, *3, *4}
- Spin Columnを再度1分間遠心する。残存するろ液を10 μl か100 μl ピペットで完全に除去する。^{*5}
- 500 μl のWash Buffer 1をSpin Columnに添加し、1分間遠心する。Collection Tube内のろ液を1 ml ピペットを用いて吸引廃棄する(1回目の洗浄)。^{*3, *4}
- もう一度Wash Buffer 1でSpin Columnを洗浄する(工程の8番を繰り返す。2回目の洗浄)。
- 500 μl のWash Buffer 1をSpin Columnに添加し、キャップをしっかりと締めて5秒間ボルテックスする(Spin Column内壁全体の洗浄。3回目の洗浄)
- 1分間遠心する。遠心後、Collection Tube内のろ液を残したまま再度5秒間ボルテックスする(Spin Column外壁とCollection Tube内壁の洗浄)。
- 1分間遠心する。遠心後、Collection Tube内のろ液を1 ml ピペットを用いて吸引廃棄する。^{*3, *4}
- 500 μl のWash Buffer 2をSpin Columnに添加し、1分間遠心する。遠心後、Collection Tube内のろ液を1 ml ピペットを用いて吸引廃棄する(4回目洗浄)。^{*3, *4}
- Spin Columnを再度1分間遠心して、残存していたWash Buffer 2を完全に押し出す。
- Spin Columnを新しい1.5mlマイクロチューブ(サンプル回収用)に装着する。
- 15~40 μl のElution BufferをSpin Columnの中央に静かに滴下した後、70℃で5分間保温する。^{*6}
- Spin Columnが冷えない内に素早く1分間遠心してLong ssDNAを溶出する。^{*7, *8, *9}

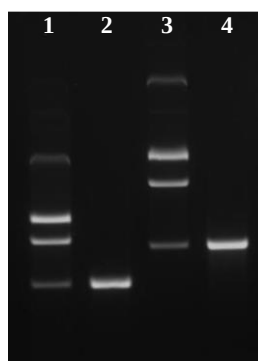


図 5. 調製した long ssDNA のゲル電気泳動による確認。

1.2%アガロースゲル(5.5cm × 6.0 cm、1 × TAE)

Lane 1: 変性処理したNicked pLSODN-1 (1.5 kb Fragment)	800 ng
Lane 2: pLSODN-1 (1.5 kb Fragment) 由来の精製long ssDNA	400 ng
Lane 3: 変性処理したpLSODN-3 (3 kb Fragment)	800 ng
Lane 4: pLSODN-3 (3 kb Fragment) 由来の精製long ssDNA	400 ng

← 3.0 kb (0.4μg)

← 1.5 kb (0.4μg)

- *1 ゲル片を完全に溶解します。ゲル片の溶解が不完全の場合、回収率が低下したり、調製したlong ssDNAへのアガロースやバッファー混入の原因になります。
- *2 ゲル溶解液とイソプロパノールとの混合液量が500 μ l以上になった場合は、Spin Columnへの添加量が500 μ lを超えないように、複数回に分けて添加してください。
- *3 Collection Tubeに回収されたろ液は、デカンテーションで捨てないでください。Collection Tubeのエッジや内壁上部がろ液で汚染されます。ろ液の除去は1 mlピペットを用いて丁寧に行ってください。
- *4 Collection Tubeに回収されたろ液にSpin Columnの先端が接触しないように注意してください。洗浄ステップ毎に新しいCollection Tubeに取り換えるのも良い方法です。本キットには余分なcollection tubeは含まれていませんが、市販の多くのチューブが適合します (Corning Axygen #MCT-200-NC等)。
- *5 Gel-Dissolving Bufferやその希釈液、イソプロパノール混合液で別途Spin Columnを洗浄しないでください。
- *6 一般的な溶出液量は15 μ l～40 μ lとなります。Elution Bufferの代わりに純水を用いても回収率は変わりません。40 μ lのElution BufferをSpin Columnに添加した場合の回収容量は38 μ lに、15 μ lのElution Bufferを添加した場合は13 μ lとなります。
- *7 本キットを用いた、12 μ gのpLSODN-1(1.5 kb Fragment)あるいは12 μ gのpLSODN-3 (3 kb Fragment)からのlong ssDNAの回収量は、約1.7 μ g (計算上100%回収量は2 μ g)です。使用カラム数は1本、溶出に用いたElution Buffer量は40 μ lです。
- *8 一般に、シリカベースのスピнкаラムから溶出したサンプルには、少量のシリカ担体が混入しています。必要に応じて、スピンドアウン(例えば 20,000 $\times$ gで 1 分間)またはフィルタースピнкаラム(例えばMerck社Ultrafree-MC GV 0.22 μ m)を用いた濾過によってサンプルに混入したシリカ担体を除去することができます。
- *9 分光光度計によってIssDNA量を定量する場合は、測定前にサンプルをスピンドアウンして混入したシリカ担体を除去することをお勧めします。シリカ担体が混入していると、UVが散乱して220nm～320nmのベースラインが均一に押し上げられ、IssDNA量を過大に見積もってしまう恐れがあります。

トラブルシューティングおよびよくあるご質問

問題	考えられる原因	対応
ゲル電気泳動でssDNA のバンドが きれいに分離しない	塩の残存	STEP3のエタノール沈殿による脱塩操作を行ってください。塩が残っているとバンドの分離が不十分になることがあります。特に、70%エタノールでの洗浄は2 回行い、その際にボルテックスを行ってください。また、沈殿操作や洗浄操作で上清を除去した後は、もう一度遠心して残液を集めマイクロピペットでしっかり除いてください。
Long ssDNA の収率が低い		
1.5kb より小さな long ssDNA の調製を Long ssDNApreparation kit for 3.0kb (Cat. No. DS625)を用いて行えるか。	原理上、本品で1.5 kb 以下のlong ssDNAを調製することも可能ですが、1.5 kb 以下のlong ssDNA を調整する場合は、『Long ssDNA Preparation Kit for 1.5kb (製品番号DS615)』の使用をお勧めします。製品番号DS625で製品番号DS615と同量のlong ssDNA を取得するためには、多量のプラスミドを処理する必要が生じます。また、ゲルへのアプライ時のプラスミド濃度に制限があることから(約0.5 μg/μl)、バンドの中のlong ssDNA濃度も低下し、精製度と収率に影響する可能性があります。	

参考文献

1. Wakimoto Y, Jiang J, Wakimoto H. (2014) Isolation of single-stranded DNA. Curr Protoc Mol Biol. 1;107:2.15.1–9.
2. Avci-Adali M, Paul A, Wilhelm N, Ziemer G, Wendel HP. (2009) Upgrading SELEX technology by using lambda exonuclease digestion for single-stranded DNA generation. Molecules. **24**;15(1):1–11.
3. Yoshimi K, Kunihiro Y, Kaneko T, Nagahora H, Voigt B, Mashimo T. (2016) ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. Nat Commun. **20**;7:10431.
4. Gu H, Breaker RR. (2013) Production of single-stranded DNAs by self-cleavage of rolling-circle amplification products. Biotechniques. **54**(6):337–43.
5. Rand KN. (1996) Crystal violet can be used to visualize DNA bands during gel electrophoresis and to improve cloning efficiency. Elsevier Trends Journals Technical Tips Online. **1**(1); 23–24.
6. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

関連製品

DS611	Denaturing Gel-Loading Buffer	1 ml × 5	(500 loadings)
DS612	Denaturing Gel-Loading Buffer	1 ml × 2	(200 loadings)
DS635	Long ssDNA Preparation Kit for 10 kb		
DS650	Long ssDNA Gel Extraction Kit for 10 kb		
DM122	DynaMarker® DNA High D	1 ml	(100 loadings)
DS230	JetGiga Competent Cell (DH5 α)	100 μl × 10	
分注再凍結可能・迅速操作(6分間)・高形質転換効率(>1 × 10 ⁹ cfu/ μg)コンピテントセル			

本品のご利用について

本製品は、研究目的用により販売しております。

製品は特許第 7004651 号および特許第 7305812 号によって保護されています。商業用ライセンスに関する情報については、株式会社バイオダイナミクス研究所にお問い合わせください。本製品またはその改変物を、株式会社バイオダイナミクス研究所の書面による事前の承諾なしに、第三者への転売、商用製品の製造、サービスの提供に使用することはできません。