

**製品名 : Long ssDNA Gel Extraction Kit for 10kb**

**商品番号: DS650**

本製品は研究用試薬です。

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

- ・本キットの操作には別途エタノールとイソプロパノールが必要です。
- ・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。
- ・抽出工程には50℃と70℃に加温する操作があります。ヒートブロックや湯浴などが必要となります。
- ・長鎖一本鎖DNA (long ssDNA) のアガロースゲル電気泳動にはローディングバッファーとしてDenaturing Gel-Loading Buffer (商品番号DS611もしくはDS612) が必要です。本キットには含まれておりませんが、別途弊社から御購入頂けます。本マニュアル、5ページの関連製品欄をご参照ください。

**製品説明**

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。スピナラム、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 (55~75%)
- ・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\*<sup>1</sup> は使用していない。
- ・調製可能なlong ssDNAのサイズ: 3,000~10,000 bases \*<sup>2</sup>
- ・スピナラムのlong ssDNA結合容量: 最大10 μg
- ・溶出容量: ≥ 15 μl

\* 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。

## 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。

## Protocol

### STEP 1: Crystal Violet を含むアガロースゲルの作成

ここでは100 mlの0.8% アガロースゲルの作成の一例を示します。

1. 0.8 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 μl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。

### STEP 2: 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 μl Crystal Violet Solutionを添加)。<sup>\*1</sup>
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。<sup>\*2, \*3, \*4</sup>
3. 泳動槽に予め冷やしておいた1×TAEを適量注ぐ。<sup>\*5</sup>
4. STEP 1で作成したアガロースゲルをセットする。
5. long ssDNAのサンプルに3倍容量のDenaturing Gel-Loading Bufferを加え混和する。<sup>\*6, \*7, \*8</sup>
6. 70℃, 5分加熱する。
7. 氷上で1分急冷する。<sup>\*9, \*10</sup>
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℃を超えないようにする。<sup>\*2</sup>
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。<sup>\*11, \*12</sup>
10. カミソリ等で目的のlong ssDNAのバンドを切り出す。<sup>\*13, \*14</sup>



**図 1. Crystal Violetを含むアガロースゲルを用いたゲル電気泳動**

0.8%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 μl。  
可視光下で撮影。

Lane 1: 6 kb Fragment両端にニックを導入し、変性処理したpLSODN (6 kb Fragment)<sup>\*15</sup> 6 μg  
Lane 2: 10 kb Fragment両端にニックを導入し、変性処理したpLSODN (10 kb Fragment)<sup>\*15</sup> 6 μg

← 10 kb (1μg)  
← 6 kb (1μg)

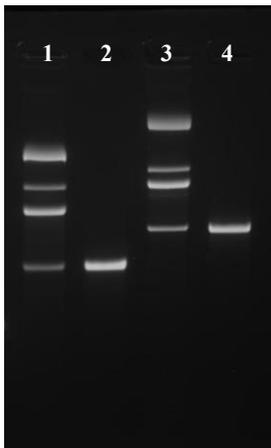
- \*1 泳動バッファーはCrystal Violet Solutionを添加した1×TAEを用います。
- \*2 安全のため、電気泳動はドラフトチャンバー内で行うことをお勧めします(さらに泳動槽上面をキムタオルなどで覆っても良いでしょう)。Crystal VioletやEtBrなどを用いた電気泳動を閉鎖空間内(低温室など)で行うのは避けてください。これらの色素は、電極での電気分解で生じた気泡の破裂とともに空气中に放出されることが知られています。
- \*3 低温(20℃以下)での電気泳動が推奨されます。泳動バッファーを低温に保つことによって、より高い解像度と強い染色が得られます。泳動バッファーの温度が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 dH<sub>2</sub>O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 Denaturing Gel-Loading Bufferは本キットには含まれていません。別途弊社から御購入頂けます。本マニュアル、4ページの関連製品欄をご覧ください。
- \*7 DNAを充分に変性させるには、予めlong ssDNAのサンプル(ニックを導入したプラスミドなど)から**塩を除いておくことが重要**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。特に沈殿を70%エタノールで二回洗浄することと、洗浄の際に激しくボルテックスすることが有効です。また、エタノール沈殿操作や洗浄操作では、遠心操作の後上清を除去しますが、その後もう一度遠心して壁面に付着している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。
- \*8 高い精製度のlong ssDNAを得るためには、バンドあたり0.5 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0.25 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。
- \*9 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。
- \*10 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。
- \*11 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。
- \*12 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。バンドが薄くなるようであれば電気泳動中に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。
- \*13 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。
- \*14 余分なゲルはできるだけ取り除いてください。
- \*15 pLSODN (6 kb Fragment) は、6 kb fragment DNA 断片(両端にニック酵素サイト Nt.BspQI と Nb.BbvCI を有する)を 13 kb のプラスミドに挿入して構築したプラスミドです。pLSODN (10 kb Fragment)も同様に 10 kb fragment DNA 断片を 20 kb のプラスミドに挿入して構築したプラスミドです。これらのプラスミドを二つのニック酵素(Nt.BspQI と Nb.BbvCI)で処理して用いています。ニック酵素処理した pLSODN (6 kb Fragment) は 2 本の直鎖状 ssDNA (6 kb と 13 kb) と一つの環状 ssDNA (19 kb) を与えます。同様にニック酵素処理した pLSODN (10 kb Fragment)は 2 本の直鎖状 ssDNA (10 kb と 20 kb) と一つの環状 ssDNA (30 kb) を与えます。

### STEP 3: Long ssDNAの抽出

抽出工程開始前に:

- ・ Wash Buffer 1とWash Buffer 2のボトルに各々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°C~25°C)、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、下記プロトコールの工程の5番以下を行って下さい。

1. STEP 2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。
2. ゲル片の3倍容量のGel-Dissolving Bufferを加える。
3. 50°C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。<sup>\*1</sup>
4. 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。
5. Spin ColumnをCollection Tubeにセットする。
6. 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。<sup>\*2, \*3, \*4</sup>
7. 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。<sup>\*5</sup>
8. 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)。<sup>\*3, \*4</sup>
9. 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)。
10. 500 μlのWash Buffer 1をSpin Columnに添加し、キャップをしっかり締めて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)
11. 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)。
12. 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。<sup>\*3, \*4</sup>
13. 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)。<sup>\*3, \*4</sup>
14. 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。
15. 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。
16. 15~40 μlのElution BufferをSpin Columnの中央に静かに滴下した後、70°Cで5分間保温する。<sup>\*6</sup>
17. 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。<sup>\*7, \*8</sup>



**図 2. 調製した long ssDNA のゲル電気泳動による確認。**

0.8%アガロースゲル(5.5cm × 6.0 cm, 1 × TAE)

Lane 1: 6 kb Fragmentの両端にニックを導入し、变性処理したpLSODN (6 kb Fragment) 800 ng

Lane 2: pLSODN (6 kb Fragment) 由来の精製long ssDNA 400 ng

Lane 3: 10 kb Fragmentの両端にニックを導入し、变性処理したpLSODN (10 kb Fragment) 800 ng

Lane 4: pLSODN (10 kb Fragment) 由来の精製long ssDNA 400 ng

← 10 kb (0.4μg)

← 6 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 μl以上になった場合は、Spin Columnへの添加量が500 μl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 μl~40 μl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 μlのElution BufferをSpin Columnに添加した場合の回収容量は36.5 μlに、15 μlのElution Bufferを添加した場合は12 μlとなります。
- \*7 本キットを用いた、12 μgのpLSODN (6 kb Fragment) あるいは12 μgのpLSODN (10kb Fragment)からのlong ssDNAの回収量は、約1.2 μg (計算上100%回収量は2 μg)です。使用カラム数は1本、溶出に用いたElution Buffer量は40 μl です。
- \*8 一般に、シリカベースのスピニングカ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、スピンドウン (例えば 20,000 × gで 1 分間) またはフィルタースピニングカラム (例えばMerck社Ultrafree-MC GV 0.22 μm) 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。

## 関連製品

DS611	Denaturing Gel-Loading Buffer	1 ml × 5	(500 loadings)
DS612	Denaturing Gel-Loading Buffer	1 ml × 2	(200 loadings)
DS615	Long ssDNA Preparation Kit for 1.5 kb		
DS625	Long ssDNA Preparation Kit for 3.0 kb		
DS635	Long ssDNA Preparation Kit for 10 kb		
DS640	Long ssDNA Gel Extraction Kit for 3 kb	(25 preps)	
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<sup>9</sup> cfu/μg)コンピテントセル