

QIAquick® Spin プロトコールとトラブルシューティング

QIAquick PCR Purification Kit

PCR産物（100 bp～10 kb）の精製用

QIAquick Nucleotide Removal Kit

酵素反応液からのヌクレオチド（17～40mer）および
DNA（40 bp～10 kb）クリーンアップ用

QIAquick Gel Extraction Kit

ゲル抽出あるいは酵素反応液からのDNA
（70 bp～10 kb）クリーンアップ用



目次

プロトコール

QIAquick PCR Purification Kit

マイクロ遠心機を利用する方法 3

吸引マニホールドを利用する方法 5

QIAquick Nucleotide Removal Kit

マイクロ遠心機を利用する方法 8

QIAquick Gel Extraction Kit

マイクロ遠心機を利用する方法 10

吸引マニホールドを利用する方法 13

トラブルシューティング 16

QIAquick PCR Purification Kit プロトコール

マイクロ遠心機を利用する方法

本プロトコールは、PCRあるいはその他の酵素反応液（英語版 Handbook 8 ページ参照）から一本鎖あるいは二本鎖 DNA を精製するためにデザインされています。その他の酵素反応液のクリーンアップに関しては PCR サンプル用に記述されているプロトコールあるいは MinElute® Reaction Cleanup Kit を使用します。QIAquick スピんカラムを用いてマイクロ遠心機により、プライマー、ヌクレオチド、ポリメラーゼ、塩などが 100 bp ~ 10 kb のフラグメントから取り除かれます。

実験を始める前の重要事項

- 使用前にエタノール（96 ~ 100 %）を Buffer PE に添加します（添加容量は試薬瓶のラベルを参照）。
- すべての遠心ステップは一般的な卓上マイクロ遠心機を用いて 17,900 x g（13,000 rpm）で行ないます。
- pH indicator I と Buffer PB を 1 : 250 で混和します（例：120 µl の pH indicator I と 30 ml の Buffer PB あるいは 600 µl の pH indicator I と 150 ml Buffer PB）。pH indicator I の入った Buffer PB は、pH が 7.5 以下の時に黄色になります。
- pH indicator I をバッファー溶液全量に添加してください。分注したバッファー溶液ごとに pH indicator I を添加しないでください。
- 精製した PCR 産物を高感度なマイクロアレイ・アプリケーションで使用する場合は、pH indicator I を添加していない Buffer PB の使用をお奨めします。

操作手順

1. **PCR サンプルに 5 倍容量の Buffer PB を入れ混和する。ミネラルオイルなどを除去する必要はない。**
例えば、100 µl の PCR 反応液（オイルを含まない量）には 500 µl の Buffer PB を加えてください。
2. **pH indicator I を Buffer PB に添加した場合は、混和物の色が黄色になる。**
溶液の色がオレンジ色あるいは紫色の場合は、3M の酢酸ナトリウム（pH 5.0）を 10 µl 添加し、混和してください。溶液の色が黄色に変わります。
3. **2 ml のコレクションチューブ（添付）に QIAquick スピんカラムをセットする。**
4. **DNA を結合させるために、サンプルを QIAquick カラムにアプライし、30 ~ 60 秒間遠心操作する。**
5. **ろ液は棄てる。同じチューブの上に QIAquick カラムを再度のせる。**
マイクロアレイなどのサンプルのクリーンアップの際はろ液は最終的に標識した核酸が得られるまでは、廃棄せずに保存することを推奨します。
プラスチック廃棄物を減らすためにコレクションチューブを再利用します。

6. 洗浄のために750 μ lのBuffer PEをQIAquickカラムにアプライし、30～60秒間遠心操作する。
7. ろ液は棄て、QIAquickカラムを同じコレクションチューブに再度のせる。さらに1分間カラムを遠心操作する。

重要：ろ液を除去した後にこの遠心操作を行なわなければ、Buffer PE由来の残留エタノールを完全に除去できません。

マイクロアレイなどのサンプルのクリーンアップの際はろ液は最終的に標識した核酸が得られるまでは、廃棄せずに保存することを推奨します。

8. 新しい1.5 mlのマイクロ遠心チューブにQIAquickカラムをのせる。
9. DNAの溶出を行なうために、50 μ lのBuffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) あるいは水 (pH 7.0～8.5) をQIAquickメンブレン表面の中央に添加し、1分間遠心する。あるいはDNA濃度を高めるために、30 μ lの溶出バッファーをQIAquickメンブレンの中央に添加し、1分間カラムを放置後、1分間遠心する。

重要：結合したDNAを完全に溶出するために、溶出バッファーをQIAquickメンブレンに直接アプライします。50 μ lの溶出バッファーを用いた場合の平均溶出液量は48 μ l、30 μ lの溶出バッファーからの平均溶出液量は28 μ lです。

溶出効率はpHに依存します。最大溶出効率はpH値が7.0～8.5で得られます。溶出に水を使用する場合にはpH値がこの範囲にあることを確認し、緩衝作用のない水では溶出したDNAが分解されやすいことを考慮して-20℃で保存します。精製DNAはTEバッファー (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) でも溶出できますが、EDTAが次に続く酵素反応を阻害することがあります。

10. 精製したDNAをゲルで解析する際には、Loading Dyeに5倍容量の精製DNAを添加する。ゲルにアプライする前に数回ピペッティングし、よく混和する。

Loading dyeには3種類のマーカー色素 (bromophenol blue, xylene cyanol, orange G) が入っており、DNAの移動距離の予測とアガロースゲルの泳動時間の至適化を容易に行なえます。色素の移動距離、アガロースゲルの濃度および泳動バッファーとの相関関係はTable 2 (英語版 Handbook 15 ページ) を参照してください。

QIAquick PCR Purification Kit プロトコール

吸引マニホールドを利用する方法

QIAquick スピнкаラムは、通常のルアーコネクタ付き吸引マニホールド（例；QIAvac Luer AdaptorsとQIAvac 6S/QIAvac 24 Plus）で使用できます。本プロトコールは、PCRあるいはその他の酵素反応液（英語版 Handbook 8 ページ参照）から一本鎖あるいは二本鎖DNAを精製するためにデザインされています。その他の酵素反応液のクリーンアップに関してはPCRサンプル用に記述されているプロトコールあるいはMinElute Reaction Cleanup Kitを使用します。吸引法によるサンプル処理により、100 bp～10 kbのフラグメントからプライマー、ヌクレオチド、ポリメラーゼ、塩などが取り除かれます。

実験を始める前の重要事項

- 使用前にエタノール（96～100%）を Buffer PE に添加します（添加容量は試薬瓶のラベルを参照）。
- 一定で安定した吸引が行なわれるよう、操作ステップごとに吸引スイッチを必ず一旦切ってください。
- pH indicator I と Buffer PB を 1 : 250 に混和します（120 μ l の pH indicator I と 30 ml の Buffer PB あるいは 600 μ l の pH indicator I と 150 ml Buffer PB）。pH indicator I の入った Buffer PB は、pH が 7.5 以下の時に黄色になります。
- pH indicator I をバッファー溶液全量に添加してください。分注したバッファー溶液ごとに pH indicator I を添加しないでください。
- 精製した PCR 産物を高感度なマイクロアレイ・アプリケーションで使用する場合は、pH indicator I を添加していない Buffer PB の使用をお奨めします。

操作手順

1. **PCR サンプルに 5 倍容量の Buffer PB を入れ混和する。ミネラルオイルなどを除去する必要はない。**
例えば、100 μ l の PCR 反応液（オイルを含まない量）には 500 μ l の Buffer PB を加えてください。
2. **pH indicator I を Buffer PB に添加した場合は、混和物の色が黄色になる。**
溶液の色がオレンジ色あるいは紫色の場合は、3M の酢酸ナトリウム（pH 5.0）を 10 μ l 添加し、混和してください。溶液の色が黄色に変わります。
3. **ステップ 3a、3b あるいは 3c に従って吸引マニホールドと QIAquick カラムを準備する。**
 - 3a. **QIAvac 24 Plus（英語版 Handbook 33 ページと Figure 7 参照）：**
QIAvac 24 Plus のルアースロットに最高 24 個までの QIAquick スピнкаラムがセット可能です。使用しない部分はルアープラグで塞ぎ、QIAvac 24 Plus を吸引装置に接続します。

3b. QIAvac 6S マニホールド（英語版 Handbook 34 ページと Figure 8 参照）：

QIAvac 6S リッドを開く。QIAvac のトッププレートのスロットに QIAvac Luer Adaptor を装着するか、使用しないスロットはブランクで塞ぐ。QIAvac 6S リッドを閉じる。QIAvac 本体の内部に廃液トレイを設置後、QIAvac 本体の上にトッププレートをぴったりさせる。QIAvac 6S を吸引装置に接続する。

マニホールド内のルアーアダプター上のルアーコネクタに各 QIAquick カラムを挿入する。使用しないルアーコネクタは QIAvac Luer Adapter Set に添付されているプラグで塞ぐ。

3c. その他の吸引マニホールド；メーカーの解説書に従う。各 QIAquick カラムをルアーコネクタに挿入する。

4. DNA を結合するために、デカントあるいはピペッティングによりサンプルを QIAquick カラムにアプライし、吸引装置のスイッチを入れる。サンプルがカラムを通過後、吸引装置のスイッチを切る。

カラムへ1度に添加可能な最大容量は 800 μ l です。800 μ l よりサンプル容量が多い場合には、残りをもう一度アプライしてください。

5. 洗浄のために、750 μ l の Buffer PE を各 QIAquick カラムに添加し吸引する。

6. 各 QIAquick カラムをマイクロ遠心チューブあるいは 2 ml のコレクションチューブ（添付）に移す。17,900 x g（ \sim 13,000 rpm）で1分間遠心する。

重要： Buffer PE 由来の残存エタノールを完全に除去するためにこの遠心操作が必要です。

7. 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブに QIAquick カラムをのせる。

8. DNA の溶出を行なうために、50 μ l の Buffer EB（10 mM Tris-Cl, pH 8.5）あるいは水（pH 7.0 \sim 8.5）を各 QIAquick メンブレンの中央に添加した後、カラムを 17,900 x g（13,000 rpm）で1分間遠心操作する。または DNA 濃度を高めるために、30 μ l の溶出バッファーを QIAquick メンブレンの中央にアプライし、1分間放置した後で遠心操作する。

重要： 結合した DNA を完全に溶出するために、溶出バッファーを QIAquick メンブレンに直接アプライします。50 μ l の溶出バッファーを用いた場合の平均溶出液量は 48 μ l、30 μ l の溶出バッファーからの平均溶出液量は 28 μ l です。

溶出効率は pH に依存します。最大溶出効率は pH 値が 7.0 \sim 8.5 で得られます。溶出に水を使用する場合には pH 値がこの範囲にあることを確認します。また緩衝作用のない水では溶出した DNA が分解されやすいことを考慮して -20°C で保存します。精製 DNA は TE バッファー（10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0）でも溶出できますが、EDTA が次に続く酵素反応を阻害することがあります。

9. 精製したDNAをゲルで解析する際には、**Loading Dye**に5倍容量の精製DNAを添加する。ゲルにアプライする前に数回ピペッティングし、よく混和する。

Loading dyeには3種類のマーカー色素（bromophenol blue、xylene cyanol、orange G）が入っており、DNAの移動距離の予測とアガロースゲルの泳動時間の至適化を容易に行なえます。色素の移動距離、アガロースゲルの濃度および泳動バッファーとの相関関係はTable 2（英語版Handbook 15ページ）を参照してください。

QIAquick Nucleotide Removal Kit プロトコール

マイクロ遠心機を利用する方法

酵素反応液（英語版 Handbook 8 ページ）から放射性物質、ビオチン、DIG で標識した DNA フラグメントあるいは 17 ヌクレオチド以上のオリゴヌクレオチドのクリーンアップ用に本プロトコールはデザインされています。本プロトコールは 10 塩基未満のプライマー、酵素、塩、未反応ヌクレオチドの除去が可能です。本キットはマイクロ遠心機同様に吸引マニホールドでも使用可能です。吸引装置を利用したプロトコールに関しては弊社テクニカルサポートにお問い合わせください。ただし吸引マニホールドで放射性標識サンプルを取り扱うことはお薦めしません。

実験を始める前の重要事項

- 使用前にエタノール（96～100%）を Buffer PE に添加します（添加容量は試薬瓶のラベルを参照）。
- 全ての遠心ステップは一般的な卓上マイクロ遠心機を用いて室温（15～25℃）で行ないます。

操作手順

1. 反応サンプルに 10 倍容量の Buffer PN を入れ混和する。
例えば 50 μ l の反応サンプルに 500 μ l の Buffer PN を添加します。100 bp 以上の DNA フラグメントでは 5 倍容量の Buffer PN を使用します。
2. 2 ml のコレクションチューブ（添付）に QIAquick スピнкаラムをセットする。
3. DNA を結合させるために、サンプルを QIAquick カラムにアプライし、6,000 rpm で 1 分間遠心操作する。
4. 放射性サンプルの場合：
QIAquick カラムを新しい 2 ml のコレクションチューブにセットし、放射性ろ液を含むチューブは適切な方法で廃棄する。
非放射性サンプルの場合：
ろ液を棄て、QIAquick カラムを同じチューブに戻す。
プラスチック廃棄物を減らすためにコレクションチューブを再利用します。
5. 放射性サンプルの場合：
QIAquick カラム洗浄のために、500 μ l の Buffer PE を添加し、6,000 rpm で 1 分間遠心操作する。ろ液を適切な方法で廃棄し、さらに 500 μ l の Buffer PE で洗浄を繰り返す。
非放射性サンプルの場合：
QIAquick カラム洗浄のために、750 μ l の Buffer PE を添加し、6,000 rpm で 1 分間遠心操作する。

- ろ液を棄て、空になった同じチューブに QIAquick カラムを戻す。さらに 17,900 x g (13,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。

重要：ろ液を除去した後にこの遠心操作を行わなければ、Buffer PE 由来の残留エタノールを完全に除去できません。

- 新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブに QIAquick カラムをのせる。

- DNA の溶出を行なうために、100 ~ 200 μ l の Buffer EB (10 mM Tris-Cl、pH 8.5) あるいは水 (pH 7.0 ~ 8.5) を QIAquick メンブレンの中央に添加した後、カラムを 17,900 x g (13,000 rpm) で 1 分間遠心操作する。または DNA 濃度を高めるために、30 ~ 50 μ l の溶出バッファーを QIAquick メンブレンの中央にアプライし、カラムを 1 分間放置した後遠心操作する。

重要：結合した DNA を完全に溶出するために、溶出バッファーを QIAquick メンブレンに直接アプライします。

溶出効率は pH に依存します。最大溶出効率は pH 値が 7.0 ~ 8.5 で得られます。溶出に水を使用する場合には pH 値がこの範囲にあることを確認します。また緩衝作用のない水では溶出した DNA が分解されやすいことを考慮して -20 °C で保存します。精製 DNA は TE (10 mM Tris-Cl、1 mM EDTA、pH 8.0) でも溶出できますが、EDTA が次に続く酵素反応を阻害することがあります。

- 精製した DNA をゲルで解析する際には、Loading Dye に 5 倍容量の精製 DNA を添加する。ゲルにアプライする前に数回ピペッティングし、よく混和する。

Loading dye には 3 種類のマーカー色素 (bromophenol blue、xylene cyanol、orange G) が入っており、DNA の移動距離の予測とアガロースゲルの泳動時間の至適化を容易に行なえます。色素の移動距離、アガロースゲルの濃度および泳動バッファーとの相関関係は Table 2 (英語版 Handbook 15 ページ) を参照してください。

QIAquick Gel Extraction Kit プロトコール

マイクロ遠心機を利用する方法

このプロトコールは、TAEバッファーまたはTBEバッファーの標準的なアガロースゲルあるいは低温融解アガロースゲルから、70 bp ~ 10 kbのDNAフラグメントを抽出、精製することを目的にデザインされました。1個のスピncラムにつき、最大400 mgのアガロースの処理が可能です。本キットはまた酵素反応液からのDNAクリンアップにも使用可能です（英語版Handbook 8ページ）。本プロトコールを用いた酵素反応液からのDNAクリンアップには、反応液に等量のイソプロパノールと3倍容量のBuffer QGを加え混和し、プロトコールのステップ6から始めます。あるいはMinElute Reaction Cleanup Kitを使用します。

実験を始める前の重要事項

- Buffer QGはpHが7.5以下の時、黄色を示します。
- 使用前にエタノール（96～100%）をBuffer PEに添加します（添加容量は試薬瓶のラベルを参照）。
- すべての遠心ステップは一般的な卓上マイクロ遠心機を用いて17,900 x g（13,000 rpm）、室温（15～25℃）で行ないます。

操作手順

1. 清潔で刃の鋭いメスを用いてDNAフラグメントを含むアガロースゲル部分を切り取る。
余分なゲルを取り除いて、ゲルスライスサイズが最小となるようにしてください。
2. 無色のチューブにゲルスライスを入れ重量を測定する。ゲル（100 mgあるいは約100 μ l）に3倍容量のBuffer QGを添加する。
例えば、100 mgのゲルには300 μ lのBuffer QGを添加してください。アガロースゲルの濃度が2%を超える場合は、6倍容量のBuffer QGを添加してください。1個のQIAquickカラムで処理できるゲルスライス最大量は400 mgなので、スライスが400 mgを超える場合は2個以上のQIAquickカラムを使用してください。
3. 50℃で10分間（あるいはゲルが完全に溶解するまで）インキュベートする。ゲルの溶解をよくするため、インキュベーション中、2～3分毎にチューブをボルテックスして溶液を混和する。
重要：アガロースを完全に溶解します。ゲルの濃度が2%を超える場合は、インキュベーション時間を長くします。

4. ゲルスライスが完全に溶解後、溶液の色が黄色であることを確認する（アガロース溶解前の Buffer QG の色と同様）。

溶液の色がオレンジ色あるいは紫色の場合は、3Mの酢酸ナトリウム（pH 5.0）を 10 μ l 添加し、混和してください。溶液の色が黄色に変わります。

DNAのQIAquickメンブレンへの吸着は、pHが7.5以下においてのみ効率的に行なわれます。Buffer QGに含まれているpH指示薬は、pH 7.5以下で黄色、それより高いpHではオレンジまたは紫色を呈するpH指示薬を含み、DNA結合に最適なpHをチェックするのに大変便利です。

5. ゲルと等量のイソプロパノールをサンプル溶液に添加し、チューブを数回転倒混和する。

例えば、100 mgのアガロースゲルスライスには、100 μ lのイソプロパノールを添加してください。このステップにより500 bp未満および4 kb以上のDNAフラグメント収量が増加します。500 bp～4 kbのDNAフラグメントの収量は、このイソプロパノールを追加処理をしても変わりません。

この時点で遠心操作は行なわないでください。

6. 2 mlのコレクションチューブ（添付）にQIAquickスピncラムをセットする。
7. DNAを結合させるために、サンプルをQIAquickカラムにアプライして1分間遠心操作する。

カラムへ1度に添加可能な最大容量は800 μ lです。800 μ lよりサンプル容量が多い場合には、数回に分けて遠心操作を行なってください。

8. ろ液を棄て、QIAquickカラムを同じコレクションチューブに戻す。
9. 推奨：500 μ lのBuffer QGをQIAquickカラムに添加し、1分間遠心操作する。

このステップで残っているアガロースがすべて除去されます。DNAをダイレクトシークエンシング、in vitro転写反応、マイクロインジェクションなどで使用する場合のみ、このステップを行ないます。

10. 洗浄のため750 μ lのBuffer PEをQIAquickカラムに添加し、1分間遠心する。

注：精製したDNAを平滑末端ライゲーションやダイレクトシークエンシングなどの塩に敏感なアプリケーションに用いる場合には、Buffer PEを添加後、遠心操作を行なう前にカラムを2～5分間放置します。

11. ろ液を除き、QIAquickカラムをさらに17,900 x g (13,000 rpm) で1分間遠心操作する。

重要：ろ液を除去した後にこの遠心操作を行なわなければ、Buffer PE由来の残留エタノールを完全に除去できません。

12. QIAquickカラムを新しい1.5 mlのマイクロ遠心チューブにセットする。

13. DNAの溶出を行なうために、50 µlのBuffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) あるいは水 (pH 7.0~8.5) を QIAquick メンブレン表面の中央に添加し、1分間遠心する。あるいはDNA濃度を高めるために、30 µlの溶出バッファーを QIAquick メンブレンの中央に添加し、1分間カラムを放置後、1分間遠心する。

重要: 結合したDNAを完全に溶出するために、溶出バッファーを QIAquick メンブレンに直接アプライします。50µlの溶出バッファーを用いた場合の平均溶出液量は48 µl、30 µlの溶出バッファーからの平均溶出液量は28 µlです。

溶出効率はpHに依存します。最大溶出効率はpH値が7.0~8.5で得られます。溶出に水を使用する場合にはpH値がこの範囲にあることを確認し、緩衝作用のない水では溶出したDNAが分解されやすいことを考慮して-20℃で保存します。精製DNAはTEバッファー (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) でも溶出できますが、EDTAが次に続く酵素反応を阻害することがあります。

14. 精製したDNAをゲルで解析する際には、Loading Dyeに5倍容量の精製DNAを添加する。ゲルにアプライする前に数回ピペッティングし、よく混和する。

Loading dyeには3種類のマーカー色素 (bromophenol blue, xylene cyanol, orange G) が入っており、DNAの移動距離の予測とアガロースゲルの泳動時間の至適化を容易に行なえます。色素の移動距離、アガロースゲルの濃度および泳動バッファーとの相関関係はTable 2 (英語版Handbook 15ページ) を参照してください。

QIAquick Gel Extraction Kit プロトコール

吸引マニホールドを利用する方法

QIAquick スピнкаラムは、通常ルアーコネクタ付き吸引マニホールド（例；QIAvac Luer AdaptorsとQIAvac 6S/QIAvac 24 Plus）で使用できます。このプロトコールは、TAE バッファーまたはTBE バッファーを使用した標準的なアガロースゲルあるいは低温融解アガロースゲルから、吸引装置を利用して70 bpから10 kbのDNAフラグメントを抽出、精製することを目的にデザインされました。1個のスピнкаラムにつき、最大400 mgのアガロースの処理が可能です。本キットはまた酵素反応液からのDNAクリーンアップにも使用可能です（英語版 Handbook 8 ページ）。本プロトコールを用いた酵素反応液からのDNAクリーンアップには、反応液に等量のイソプロパノールと3倍容量のBuffer QGを加え混和します。ステップ4に記載されているように吸引マニホールドをセットアップしてから、プロトコールのステップ7に進みます。あるいはMinElute Reaction Cleanup Kitを使用します。

実験を始める前の重要事項

- Buffer QGはpHが7.5以下の時、黄色を示します。
- 使用前にエタノール（96～100%）をBuffer PEに添加します（添加容量は試薬瓶のラベルを参照）。
- 一定で安定した吸引が行なわれるよう、操作ステップごとに吸引スイッチを必ず一旦切ってください。

操作手順

1. 清潔で刃の鋭いメスを用いてDNAフラグメントを含むアガロースゲル部分を切り取る。

余分なゲルを取り除いて、ゲルスライスサイズが最小となるようにしてください。

2. 無色のチューブにゲルスライスを入れ重量を測定する。ゲル（100 mgあるいは約100 μ l）に3倍容量のBuffer QGを添加する。

例えば、100 mgのゲルには、300 μ lのBuffer QGを添加してください。ゲルの濃度が2%を超える場合は、6倍容量のBuffer QGを添加してください。1個のQIAquick カラムで処理できるゲルスライス最大量は400 mgなので、スライスが400 mgを超える場合は2個以上のQIAquick カラムを使用してください。

3. 50℃で10分間（あるいはゲルが完全に溶解するまで）インキュベートする。ゲルの溶解をよくするため、インキュベーション中、2～3分毎にチューブをボルテックスして溶液を混和する。

重要：アガロースを完全に溶解します。ゲルの濃度が2%を超える場合は、インキュベーション時間を長くします。

4. インキュベーションの間に吸引マニホールドとQIAquick カラムをステップ4a、4b、4cに従って準備する。

4a. QIAvac 24 Plus (英語版 Handbook 33 ページと Figure 7 参照) :

QIAvac 24 Plus のルアー スロットに最高 24 個までの QIAquick スピンカラムをセットする。使用しない部分はルアー プラグで塞ぎ、QIAvac 24 Plus を吸引装置に接続する。

4b. QIAvac 6S マニホールド (英語版 Handbook 34 ページと Figure 8 参照) :

QIAvac 6S リッドを開く。QIAvac のトッププレートのスロットに QIAvac Luer Adapter を装着するか、使用しないスロットはブランクで塞ぐ。QIAvac 6S リッドを閉じる。QIAvac 本体の内部に廃液トレイを設置後、QIAvac 本体の上にトッププレートをぴったりさせる。QIAvac 6S を吸引装置に接続する。

マニホールド内のルアーアダプター上のルアーコネクタに各 QIAquick カラムを挿入する。使用しないルアーコネクタは QIAvac Luer Adapter Set に添付されているプラグで塞ぐ。

4c. その他の吸引マニホールド: メーカーの説明書に従う。各 QIAquick カラムをルアーコネクタに挿入する。

5. ゲルスライスが完全に溶解後、溶液の色が黄色であることを確認する (アガロース溶解前の Buffer QG の色と同様)。

注: 溶液の色がオレンジ色あるいは紫色の場合は、3M の酢酸ナトリウム (pH 5.0) を 10 μ l 添加して混和します。溶液の色が黄色に変わります。

DNA の QIAquick メンブレンへの吸着は、pH が 7.5 以下においてのみ効率的に行なわれます。Buffer QG に含まれている pH 指示薬は、pH 7.5 以下で黄色、それより高い pH ではオレンジまたは紫色を呈するので、DNA 結合に最適な pH をチェックするのに大変便利です。

6. ゲルと等量のイソプロパノールをサンプル溶液に添加し、チューブを数回転倒させて混和する。

例えば、100 mg のアガロースゲルスライスには、100 μ l のイソプロパノールを添加してください。このステップにより 500 bp 未満および 4 kb 以上の DNA フラグメント収量が増加します。500 bp ~ 4 kb の DNA フラグメントの収量は、このイソプロパノール処理を追加しても変わりません。

この時点で遠心操作は行なわないでください。

7. DNA を結合させるために、サンプルを QIAquick カラムにアプライして吸引装置のスイッチを入れる。サンプルが完全にカラムを通過した後、吸引装置のスイッチを切る。

カラムへ 1 度に添加可能な最大容量は 800 μ l です。800 μ l よりサンプル容量が多い場合には、数回に分けて添加してください。

8. 推奨: 500 μ l の Buffer QG を QIAquick カラムに添加し吸引する。

このステップにより、残っているアガロースがすべて除去されます。DNA をダイレクトシークエンシング、in vitro 転写反応、マイクロインジェクションなどで使用する場合のみ、このステップを行ないます。

9. 洗浄のため0.75 mlのBuffer PEをQIAquickカラムに添加し、吸引する。

注：精製したDNAを、平滑末端ライゲーションやダイレクトシークエンシングなどの塩に敏感なアプリケーションに用いる場合には、Buffer PEを添加後、遠心操作を行なう前にカラムを2～5分間放置します。

10. 各QIAquickカラムを新しい1.5 mlのマイクロ遠心チューブあるいは2 mlのコレクションチューブ（添付）に移す。17,900 x g（～13,000 rpm）で1分間遠心する。

重要：Buffer PE由来の残存エタノールを完全に除去するために、この遠心操作が必要です。

11. 新しい1.5 mlのマイクロ遠心チューブにQIAquickカラムをのせる。

12. DNAの溶出を行なうために、50 µlのBuffer EB（10 mM Tris-Cl、pH 8.5）または水（pH 7～8.5）をQIAquickメンブレンの中央に添加した後、カラムを17,900 x g（13,000 rpm）で1分間遠心操作する。あるいはDNA濃度を高めるために、30 µlの溶出バッファーをQIAquickメンブレンの中央にアプライし、1分間放置した後に1分間遠心操作する。

重要：結合したDNAを完全に溶出するために、溶出バッファーをQIAquickメンブレンに直接アプライします。50 µlの溶出バッファーを用いた場合の平均溶出量は48 µl、30 µlの溶出バッファーからの平均溶出量は28 µlです。

溶出効率はpHに依存します。最大溶出効率はpH値が7.0～8.5で得られます。溶出に水を使用する場合にはpH値がこの範囲にあることを確認し、緩衝作用のない水では溶出したDNAが分解されやすいことを考慮して-20℃で保存します。精製DNAはTEバッファー（10 mM Tris-Cl、1 mM EDTA、pH 8.0）でも溶出できますが、EDTAが次に続く酵素反応を阻害することがあります。

13. 精製したDNAをゲルで解析する際には、Loading Dyeに5倍容量の精製DNAを添加する。ゲルにアプライする前に数回ピペッティングし、よく混和する。

Loading dyeには3種類のマーカー色素（bromophenol blue、xylene cyanol、orange G）が入っており、DNAの移動距離の予測とアガロースゲルの泳動時間の至適化を容易に行なえます。色素の移動距離、アガロースゲルの濃度および泳動バッファーとの相関関係はTable 2（英語版Handbook 15ページ）を参照してください。

トラブルシューティングガイド

コメント

回収率が低い、あるいは全く回収されない

- a) Buffer PE にエタノールが含まれていない
使用前に必ずエタノールを Buffer PE（濃縮液）に加える。正しく調製された Buffer PE を用いて再度実験を行なう。
- b) 溶出バッファーが適切でない
DNA は低塩濃度のバッファー（例； Buffer EB：10 mM Tris-Cl、pH 8.5）あるいは水でのみ効率的に溶出される。“Elution in low-salt solutions”（英語版 Handbook 13 ページ）参照。
- c) 溶出バッファーを適切にアプライしていない
メンブレンが完全にバッファーで覆われるように、必ず QIAquick メンブレン表面の中央部分に溶出バッファーを注入する。これは特に少量の溶出量（30 μ l）を用いる際に重要。

ゲル

- d) ゲルスライスの溶解が不十分
Buffer QG をゲルスライスに添加後、50℃ でインキュベーションを行なう間、2～3 分毎にチューブをボルテックスで混和する。溶解していないアガローススライス中に DNA が残存する。
- e) ゲル電気泳動用バッファーの pH が高すぎる（結合溶液の色がオレンジ、または紫になる）
電気泳動バッファーを繰り返し何度も利用したり、正しく調製しなかったために、サンプルの pH が Buffer QG の緩衝作用限界を超えてしまい、DNA が効率的に結合しない。10 μ l の酢酸ナトリウム（3M、pH 5.0）をサンプルに添加し混和する。溶液の色が黄色に変われば、DNA 結合に適切な pH である。色の変化が非常に小さい場合（ややオレンジがかった色の場合）でも、酢酸ナトリウム 10 μ l を添加する。
- f) ゲルスライスの量が多すぎる（>400 mg）
QIAquick カラムあたり 400 mg 以下のゲルをアプライした場合にのみ回収率は 70～80% である。ゲルスライスが 400 mg より多い場合は複数の QIAquick カラムを用いる。

ゲル：QIAquick Gel Extraction Kit についてのみの項目。

PCR：QIAquick PCR Purification Kit についてのみの項目。

その他の項目はすべてのキットに当てはまる。

コメント

PCR

- g) PCR産物が不十分あるいはない 精製の前後にアガロースゲルにPCR産物の10%をアプラインして、DNA収量を調べる。

PCR/Gel

- h) イソプロパノール添加後、サンプル溶液が濁ってゼリー状になる 塩の沈殿が原因である可能性があり、この場合サンプルを十分に混和することにより解消する。あるいはゲルスライスが完全に溶解されていない。この場合、混合液をQIAquickカラムにアプラインし、遠心後さらに0.5 mlのBuffer QGをカラムに添加する。室温（15～25℃）で1分間放置後、遠心操作して次の操作に続ける。この洗浄ステップで、残存するアガロースが溶解する。
- i) 結合溶液の色がオレンジ、または紫になる サンプルのpHがBuffer QGあるいはPBの緩衝作用限界を超えている。20 µlの酢酸ナトリウム（3M、pH 5.0）をサンプルに添加し混和する。溶液の色が黄色に変われば、DNA結合に適切なpHである。色の変化が非常に小さい場合（オレンジ色の場合）でも、10 µlの酢酸ナトリウムを添加する。

精製したDNAを用いて行なった実験（例：ライゲーション）で最適に作用しない

- a) 溶出液中の塩濃度が高すぎる 洗浄ステップで、750 µlのBuffer PEを添加後、室温で5分間QIAquickカラムをインキュベートしてから遠心する。
- b) 溶出液中にエタノールが残留している コレクションチューブ中の洗浄ステップのろ液を必ず除去し、QIAquickカラムを17,900 x g（～13,000 rpm）でさらに1分間遠心操作を行なったことを確認する。

ゲル

- c) 溶出液中にアガロースが混入 ゲルスライスの溶解が不完全、または重量が400 mgを超える。Buffer QGによるカラムの洗浄ステップ（オプション）を繰り返す。

コメント

PCR

- d) 溶出液中にプライマー・ダイマーが混入
形成されたプライマー・ダイマーが20 bpより長く、完全に除去されていない。結合ステップの後で、QIAquick カラムを750 μ lの35%塩酸グアニジン水溶液(35 g/100 ml)で洗浄する。その後、続けてプロトコールのBuffer PEによる洗浄ステップと溶出ステップへ進む。
- e) 分析ゲル上でスメアとして観察される変性ssDNAが溶出液に含まれている
続く酵素反応の際、酵素を除いた反応溶液(但し溶出したDNAを含む)を用意する。ssDNAを再びアニリングするために、用意した反応液を95℃で2分間インキュベート後、ゆっくりと室温(15~25℃)まで冷却する。酵素を加え、通常操作へと進む。あるいは10 mM NaClを含む10 mM TrisバッファーでDNAを溶出する。塩および緩衝剤がDNA鎖の再会合を促進する。但しこの場合、溶出液の塩濃度については後のアプリケーションを考慮しなければならない。

Trademarks: QIAGEN®, QIAquick®, MinElute® (QIAGEN Group).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載のQIAGEN製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2007–2008 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒104-0054 ■ 東京都中央区勝どき3-13-1 ■ Forefront Tower II

Tel:03-6890-7300 ■ Fax:03-5547-0818 ■ E-mail:techservice-jp@qiagen.com

