

## MinElute®

# プロトコールとトラブルシューティング

### MinElute PCR Purification Kit

低溶出量でのPCR産物（70 bp～4 kb）精製用

### MinElute Gel Extraction Kit

低溶出量でのDNAフラグメント（70 bp～4 kb）の  
ゲル抽出

### MinElute Reaction Cleanup Kit

酵素反応液からのDNA（70 bp～4 kb）  
クリーンアップ用



# 目次

## プロトコール

### **MinElute 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

### **MinElute Gel Extraction Kit**

マイクロ遠心機を利用する方法 8

吸引マニホールドを利用する方法 11

### **MinElute Reaction Cleanup Kit**

マイクロ遠心機を利用する方法 14

吸引マニホールドを利用する方法 16

トラブルシューティング 18

# MinElute PCR Purification 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、PCR 反応液から 2 本鎖 DNA フラグメントを、高い最終濃度で精製することを目的にデザインされました（英語版 Handbook 12 ページ参照）。MinElute スピнкаラムを用いれば、遠心操作により 70 bp から 4 kb のフラグメントを、プライマー、ヌクレオチド、ポリメラーゼ、塩などから分離できます。

### 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 に混和します（例；120  $\mu$ l の pH indicator I と 30 ml の Buffer PB あるいは 600  $\mu$ 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 反応液に 5 倍容量の Buffer PB を加えて混和する。ミネラルオイルなどを除去する必要はない。**  
例えば、50  $\mu$ l の PCR 反応液（オイルを含まない量）には 250  $\mu$ 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  $\mu$ 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. **ラックにセットした 2 ml コレクションチューブ（添付）に MinElute カラムをのせる。**
4. **DNA をカラムに結合させるために、サンプルを MinElute カラムにアプライし、1 分間遠心する。**  
最大の回収率を得るために、サンプル液は残さず全てカラムに添加してください。
5. **ろ液は棄てる。同じチューブの上に MinElute 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に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。

6. 洗浄のため、750  $\mu$ lのBuffer PEをMinEluteカラムに添加し、1分間遠心する。
7. ろ液は棄て、MinElute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、最高スピードでカラムを遠心する。

**重要：**ろ液を除去した後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。

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MinEluteカラムをのせる。
9. DNAの溶出を行なうために、10  $\mu$ lのBuffer EB (10 mM Tris-Cl、pH 8.5)あるいは水をメンブレン表面の中央に添加し、カラムを1分間放置後、1分間遠心する。

**重要：**カラムに結合したDNAが完全に溶出されるように、必ずメンブレン表面の中央部分に溶出バッファーを注入してください。10  $\mu$ lの溶出バッファーを用いた場合の平均溶出液量は9  $\mu$ 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 3 (英語版Handbook 15ページ) を参照してください。

# MinElute PCR Purification Kit プロトコール

## 吸引マニホールドを利用する方法

MinElute 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。以下のプロトコールは、PCR反応液から2本鎖DNAフラグメントを、高い最終濃度で精製することを目的にデザインされました（英語版 Handbook 12 ページ参照）。吸引法によるサンプル処理により、70 bp～4 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（例；120  $\mu$ l の pH indicator I と 30 ml の Buffer PB あるいは 600  $\mu$ 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 反応液に 5 倍容量の Buffer PB を加えて混和する。ミネラルオイルなどを除去する必要はない。**  
例えば、50  $\mu$ l の PCR 反応液（オイルを含まない量）には 250  $\mu$ 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  $\mu$ 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 MinElute カラムを準備する。**
  - 3a. **QIAvac 24 Plus（英語版 Handbook 34 ページ参照）：**  
QIAvac 24 Plus のルアースロットに最高 24 個までの MinElute 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 35 ページ参照）：

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のせる。QIAvac 6S を吸引装置に接続する。

マニホールドのルアーアダプター上のルアーコネクタに各 MinElute 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。ルアーコネクタに MinElute カラムを挿入する。

### 4. DNA 結合のために、サンプルをデカントあるいはピペットにより MinElute カラムにアプライし吸引する。サンプルがカラムを通過後、吸引を止める。

最大の回収率を得るために、サンプル液は残さずすべてカラムに添加してください。

カラムへ1度に添加可能な最大容量は 800  $\mu$ l です。800  $\mu$ 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、750 $\mu$ l の Buffer PE を MinElute カラムに添加後、吸引する。

### 6. 各 MinElute カラムをマイクロ遠心チューブあるいは添付の 2 ml のコレクションチューブに移す。10,000 x g 以上で1分間遠心操作する。

**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 MinElute カラムをのせる。

### 8. DNA の溶出を行なうために 10 $\mu$ l の Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) あるいは水をメンブレン表面の中央に添加し、カラムを1分間放置後、1分間遠心する。

**重要：** カラムに結合した DNA が完全に溶出されるように、必ずメンブレン表面の中央部分に溶出バッファーを注入してください。10  $\mu$ l の溶出バッファーを用いた場合の平均溶出液量は 9  $\mu$ 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  $^{\circ}$ 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 3（英語版Handbook 15ページ）を参照してください。

# MinElute 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 ~ 4 kb の DNA フラグメントを高い最終濃度で抽出、精製することを目的にデザインされました。1 個の MinElute カラムにつき、最大 400 mg のアガロースの処理が可能です。

### 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)。
- 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 10,000 x g 以上で、室温 (15 ~ 25 °C) 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 個のスピニングカラムで処理できるゲルスライスの量は 400 mg なので、スライスが 400 mg を超える場合は 2 個以上のスピニングカラムを使用してください。

3. 50 °C 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)。

**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  $\mu$ 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 指示薬を含むので、DNA 結合に最適な pH をチェックするのに大変便利です。



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  $\mu$ lのイソプロパノールを添加してください。

この時点で遠心操作は行なわないでください。

6. ラックにセットした2 mlコレクションチューブ（添付）にMinEluteカラムをのせる。
7. DNAをカラムに結合するために、サンプルをMinEluteカラムにアプライし、1分間遠心する。

最大の回収率を得るために、サンプル液は残さず全てカラムに添加してください。カラムへ1度に添加可能な最大容量は800  $\mu$ lです。800  $\mu$ 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. ろ液は棄て、MinEluteカラムを同じコレクションチューブに再度のせる。
9. 500  $\mu$ lのBuffer QGをスピнкаラムに添加し、1分間遠心する。

10. ろ液は棄て、MinEluteカラムを同じコレクションチューブに再度のせる。

11. 洗浄のため、750  $\mu$ lのBuffer PEをMinElute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。

12. ろ液を棄て、MinEluteカラムをさらに10,000 x g以上で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。

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

14. DNAの溶出を行なうために10  $\mu$ lのBuffer EB（10 mM Tris-Cl、pH 8.5）あるいは水をメンブレン表面の中央に添加し、カラムを1分間放置後、1分間遠心する。

**重要：**カラムに結合したDNAが完全に溶出されるように、必ずメンブレン表面の中央部分に溶出バッファーを注入してください。10  $\mu$ lの溶出バッファーを用いた場合の平均溶出液量は9  $\mu$ 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。

15. 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 3（英語版Handbook 15ページ）を参照してください。

# MinElute Gel Extraction Kit プロトコール

## 吸引マニホールドを利用する方法

MinElute 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。このプロトコールは、TAEバッファまたはTBEバッファ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から4 kbのDNAフラグメントを高い最終濃度で抽出、精製することを目的にデザインされました。1個のMinEluteカラムにつき、最大400 mgのアガロースの処理が可能です。

### 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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個のスピнкаラムで処理できるゲルスライス量は400 mgなので、スライスが400 mgを超える場合は、2個以上のスピнка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MinElute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 34ページ参照）：  
QIAvac 24 Plusのルアースロットに最高24個までのMinElute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。

**4b. QIAvac 6S マニホールド（英語版 Handbook 35 ページ参照）：**

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のせる。QIAvac 6S を吸引装置に接続する。

マニホールドのルアーアダプター上のルアーコネクタに各 MinElute 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。ルアーコネクタに MinElute カラムを挿入する。

**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  $\mu$ 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 指示薬を含むので、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  $\mu$ l のイソプロパノールを添加してください。この時点で遠心操作は行なわないでください。

**7. DNA をカラムに結合するために、サンプルをピペットで MinElute カラムにアプライシ吸引を行なう。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。**

最大の回収率を得るために、サンプル液は残さず全てカラムに添加してください。

カラムへ 1 度に添加可能な最大容量は 800  $\mu$ l です。800  $\mu$ 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. 500  $\mu$ l の Buffer QG を MinElute カラムに添加後、吸引する。**

**9. 洗浄のため、750  $\mu$ l の Buffer PE を MinElute カラムに添加後、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 MinElute 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添付の 2 ml のコレクションチューブに移す。10,000 x g 以上で 1 分間遠心操作する。**

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MinElute カラムをのせる。
12. DNAの溶出を行なうために10  $\mu$ lのBuffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) あるいは水をメンブレン表面の中央に添加し、カラムを1分間放置後、1分間遠心する。

**重要：**カラムに結合したDNAが完全に溶出されるように、必ずメンブレン表面の中央部分に溶出バッファーを注入してください。10  $\mu$ lの溶出バッファーを用いた場合の平均溶出液量は9  $\mu$ 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℃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 3 (英語版 Handbook 15ページ) を参照してください。

# MinElute Reaction Cleanup 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、制限酵素分解や標識反応などの全ての酵素反応液から2本鎖DNAフラグメントを、高い最終濃度で精製することを目的にデザインされました（英語版 Handbook 12 ページ参照）。MinElute Reaction Cleanup カラムを用いれば、遠心操作により70 bp～4 kbのフラグメントを酵素、プライマー、ヌクレオチド、塩などから分離できます。MinElute カラムのDNA結合容量は5 µgです。

### 実験を始める前の重要事項

- Buffer ERCはpHが7.5以下の時、黄色くなります。
- 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室温10,000 x g以上で行ないます。

### 操作手順

1. 酵素反応液に300 µlのBuffer ERCを加えて混合する。MinElute カラムで処理できる酵素反応液は最大容量は100 µlである。

酵素反応溶液量が20 µl未満の場合には、容量を20 µlに調節してください。酵素反応溶液量が100 µlを超える場合には反応液を分けてそれぞれの溶液にBuffer ERC 300 µlを添加し、それに相当するMinElute カラムの数だけ使用してください。

2. 溶液の色が黄色であることを確認する（酵素反応液添加前のBuffer ERC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 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. ラックにセットした2 mlチューブにMinElute カラムをのせる。
4. DNAをカラムに結合させるために、サンプルをMinElute カラムにアプライし、1分間遠心する。

最大の回収率を得るため、サンプル液は残さず全てカラムに添加します。

5. ろ液は棄てる。同じチューブの上にMinElute カラムを再度のせる。
6. 洗浄のため、750 µlのBuffer PEをMinElute カラムに添加し、1分間遠心する。
7. ろ液は棄て、MinElute カラムを同じチューブに再度のせる。さらに1分間、最高スピードでカラムを遠心する。

**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。

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

9. DNAの溶出を行なうために10 µlのBuffer EB (10 mM Tris-Cl、pH 8.5) あるいは水をメンブレン表面の中央に添加し、カラムを1分間放置後、1分間遠心する。

**重要：**カラムに結合したDNAが完全に溶出されるように、必ずメンブレン表面中央部分に溶出バッファーを添加してください。10 µlの溶出バッファーを用いた場合の平均溶出液量は9 µlです。溶出効率も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 3 (英語版 Handbook 15ページ)を参照してください。

# MinElute Reaction Cleanup Kit プロトコール

## 吸引マニホールドを利用する方法

MinElute 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。このプロトコールは、制限酵素分解や標識反応のような酵素反応液から2本鎖DNAフラグメントを、高い最終濃度で精製することを目的にデザインされました（英語版 Handbook 12 ページ）。吸引法によるサンプル処理操作により、70 bp～4 kbのフラグメントが酵素、プライマー、ヌクレオチド、塩などから分離可能です。

### 実験を始める前の重要事項

- Buffer ERCはpHが7.5以下の時、黄色くなります。
- 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. 酵素反応液に300  $\mu$ lのBuffer ERCを加えて混合する。カラムへ1度に添加可能な酵素反応液の最大容量は100  $\mu$ lである。

酵素反応液量が20  $\mu$ l未満の場合には、容量を20  $\mu$ lに調節してください。酵素反応液量が100  $\mu$ lを超える場合には反応液を分けてそれぞれの溶液にBuffer ERC 300  $\mu$ lを添加し、それに相当するMinEluteカラムの数だけ使用してください。

2. 溶液の色が黄色であることを確認する（酵素反応液添加前のBuffer ERC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  $\mu$ 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MinEluteカラムを準備する。

#### 3a. QIAvac 24 Plus（英語版 Handbook 34 ページ参照）：

QIAvac 24 Plusのルアースロットに最高24個までのMinElute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 35 ページ参照）：**

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のせる。QIAvac 6S を吸引装置に接続する。

マニホールドのルアーアダプター上のルアーコネクターに各 MinElute カラムを挿入する。使用しないルアーコネクターは 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。ルアーコネクターに MinElute カラムを挿入する。

**4. DNA 結合のために、サンプルをデカントあるいはピペットにより MinElute カラムにアプライし吸引する。サンプルがカラムを通過後、吸引装置のスイッチを切る。**

最大の回収率を得るために、サンプル液は残さずすべてカラムに添加してください。

**5. 洗浄のため、750  $\mu$ l の Buffer PE を MinElute カラムに添加後、吸引する。**

**6. 各 MinElute カラムをマイクロ遠心チューブあるいは添付の 2 ml のコレクションチューブに移す。10,000  $\times$  g 以上で 1 分間遠心操作する。**

**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 MinElute カラムをのせる。**

**8. DNA の溶出を行なうために 10  $\mu$ l の Buffer EB（10 mM Tris-Cl、pH 8.5）あるいは水をメンブレン表面の中央に添加し、カラムを 1 分間放置後、1 分間遠心する。**

**重要：** カラムに結合した DNA が完全に溶出されるように、必ずメンブレン表面の中央部分に溶出バッファーを注入してください。10  $\mu$ l の溶出バッファーを用いた場合の平均溶出液量は 9  $\mu$ 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  $^{\circ}$ 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 3（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 14 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     | 溶出バッファーを MinElute メンブレンの中央にのせて、バッファーがメンブレンを完璧に覆っていることを確認する。   |
| d) | 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 PB、QG あるいは ERC の緩衝作用限界を超えている。20 $\mu$ 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 (オレンジ色の場合) でも、酢酸ナトリウム 10 $\mu$ l を添加する。 |

### ゲル

- |    |   |   |
|----|---|---|
| e) | 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°C 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。   |
| f) | ゲル電気泳動専用バッファーの 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 の緩衝作用の限界を超えてしまい、DNA が効率的に結合されない。3M の酢酸ナトリウム (pH 5.0) を 10 $\mu$ l 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 $\mu$ l を添加する。 |

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

PCR : MinElute PCR Purification Kits についてのみの項目。

Reaction Cleanup : MinElute Gel Extraction 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

- g) 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。

### Reaction Cleanup

- h) サンプル容量が少なすぎるか多すぎる サンプル容量は必ず 20 ~ 100  $\mu$ l で使用する。

### PCR

- i) 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 % をアプライして、DNA 収量を予測する。

### 精製した DNA が、続いて行なう実験（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  $\mu$ l の Buffer PE を添加後、室温（15 ~ 25  $^{\circ}$ C）で 5 分間 MinElute 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棄て、MinElute カラムを 10,000 x g 以上でさらに 1 分間遠心する。

### 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 でのゲルスライスの溶解ステップでは、必ず 2 ~ 3 分毎に 1 度、ボルテックスする。

### 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、MinElute カラムを 750  $\mu$ l の 35 % 塩酸グアニジン水溶液（35 g/100 ml）で洗浄する。この後、続けてプロトコルの Buffer PE による洗浄ステップ、溶出ステップへ進む。
- e) 溶出液が分析ゲル上でスメアとして観察される変性 ssDNA を含む 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 を再びアニーリングするために、用意した反応液を 95  $^{\circ}$ C で 2 分間インキュベート後、ゆっくりと室温まで冷却する。酵素を加え、通常の操作へと進む。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、後のアプリーケーションを考慮しなければならない。

Trademarks: QIAGEN®, 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](http://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

