

MinElute™ 96 UF PCR Purification プロトコールとトラブルシューティング

PCR産物の効率的なハイスループット精製用

英語版 Handbook
May 2002 に対応



目次

MinElute 96 UF PCR精製プロトコール (マニュアル操作)	3
実験を始める前の重要事項	3
DNA 溶出のためのマイクロプレート・シェーカーのキャリブレーション	3
精製操作手順	3
BioRobot 3000を用いたMinElute 96 UF PCR精製プロトコール	5
自動化システムを行う際の推薦事項	5
トラブルシューティングガイド	6

MinElute 96 UF PCR 精製プロトコール

(マニュアル操作)

実験を始める前の注意事項

このプロトコールは、マニュアル操作を用いて 96 個までの PCR サンプルを同時に精製するためのプロトコールです。

- MinElute 96 UF PCR Purification Plate を用いる際には、適切な吸引装置 (例 : QIAvac Multiwell Unit, Cat. No. 9014579) が必要です。
- マルチチャンネルのピペットを用いると、PCR サンプルの取り扱いが容易になります。
- MinElute 96 UF PCR Purification Plate からの DNA 溶出には、マイクロプレート・シェーカーの使用をお勧めします。あるいは精製した DNA をピペットで 20 回アップダウンして溶解させることも可能です。
- 脱イオン水 (オプションの洗浄ステップ用) あるいは溶出バッファーを用意してください。

DNA 溶出のためのマイクロプレート・シェーカーのキャリブレーション

以下のステップに従って、マイクロプレート・シェーカーのキャリブレーションを行います。

1. 300 μ l の丸底 96 ウェル・ポリスチレンマイクロプレート (例 ; 96-Well Microplates RB (24), QIAGEN Cat. No. 19581) を使用する。
2. 200 μ l の着色溶液 (例 ; プロモフェノールブルー) を 2 個のウェルにアプライする。
3. 96 ウェルプレートマイクロプレート・シェーカーに載せる。
4. スピードを最低レベルにセットして、徐々にシェーカーのスピードを加速する。プレートがシェーカー上でしっかりと固定されていることを確認する。
5. 溶出の際のシェ - キング速度に、溶液がウェルの外に飛散しない最高速度を用いることを推薦する。

精製操作手順

1. メーカーの説明書に従って、吸引装置の準備をする。
装置の底に、廃液用トレイを置く。
2. 吸引装置の上に MinElute 96 UF PCR Purification Plate をセットする。
3. PCR サンプルを MinElute 96 UF PCR Purification Plate にピペットで添加する。
注 : PCR サンプル量を 150 μ l 以上ロードすると、プライマーを完璧に除去できないことがあります。

4. -800 mbarで10分間あるいはウェルが完全に乾燥するまで、吸引を続ける。吸引装置のスイッチを切る。

注：PCR容量が50 µlを超える場合には、吸引時間を延長します。ウェルが乾燥するまで吸引します。PCR溶液50 µlごとに約10分間の吸引が必要ですが、150 µl以上では計算値より長く吸引する必要があります。
5. (オプション)：50 µlの脱イオン水を各ウェルに添加し、-800 mbarで10分間あるいはウェルが完全に乾燥するまで、吸引を続ける。吸引装置のスイッチを切る。

注：溶出後得られるDNAは、ほとんどのアプリケーションに十分な精度を持つため洗浄ステップの必要はありません。特殊なアプリケーションでより高純度なDNAが必要な場合には、このステップを行います。
6. 吸引装置からMinElute 96 UF PCR Purification Plateを注意深く取り除く。
7. プレートの底に残っている溶液を除去するために、重ねた清潔な吸水紙の上でMinElute 96 UF PCR Purification Plateを軽く叩く。
8. 各ウェルに20 µlの脱イオン水を加える。

DMSO (50% v/v)、3 x SSC、EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) あるいは同様のバッファーを、溶出の際、水の代わりに用いることができる。
9. MinElute 96 UF PCR Purification Plateをマイクロプレート・シェーカー上で、最適な速度で2分間シェークする。(DNA溶出のためのマイクロシェーカーのキャリブレーションを参照)。

注：MinElute 96 UF PCR Purification Plate がシェーカー上でしっかりと固定されていることを確認します。
- 9a. あるいは精製したDNAをピペットで20回アップダウンして溶解させることも可能。
10. 各ウェルの精製PCR産物を含む溶出液をピペットで回収する。

プレートをわずかに傾けると、溶出液はさらに容易に回収される。

BioRobot® 3000 を用いた MinElute 96 UF PCR 精製 プロトコール

次のプロトコールは BioRobot® 3000 を用いた MinElute 96 UF PCR 精製用プロトコールです。BioRobot 3000 を用いた MinElute 96 UF PCR 精製に推奨される最低溶出容量は 30 µl です。精製を始める前に BioRobot が正しく調整されていることを確認します。

MinElute 96 UF PCR 精製の際に BioRobot 3000 ワークステーションで必要な物：

- 高速ピペティングシステム
- ロボットハンドリングシステム、T-grip
- Vacuum Manifold Unit
- シェーカーシステム、4 プレート
- シェーカーアダプター（マイクロプレート、LHS タイプ）
- ピペティング・プローブ（0.9 mm）
- ロボット用シリンジ（0.5 ml）

操作手順

1. BioRobot 3000 のスイッチが入っていることを確認する。
2. コンピューターとモニターのスイッチを入れる。
3. 必要な場合には QIAsoft 4.1 を起動する。
4. プロトコール・フィールドから “MinElute 96 UF PCR Purification” を選択し、ツールバーの “RUN” をクリックする。
5. “Layout Configuration” ダイアログボックスが現れる。“OK” をクリックする。
6. “Select Samples” ダイアログボックスが現れる。サンプル数を選んで、“OK” をクリックする。
7. QIAsoft Wizard により現れる説明に従う。
Wizard は、各ステップパラメーター入力およびワークテーブル上に設置する項目について指示を与えます。

自動化システムを行う際の推薦事項

- MinElute 96 UF PCR Purification Plate を使用する際には、-800 mbar で吸引が可能な適切な吸引装置が必要です。
- マニュアル操作で推薦する時間とパラメーターをセットします。
- MinElute 96 UF PCR Purification Plate から DNA を溶出する際には、マイクロプレート・シェーカーの使用をお勧めします。あるいは精製した DNA をピペットで 20 回アップダウンして溶解させることも可能です。
- 自動化システムでは、30 µl の溶出液を用いたプロトコールで始めることをお勧めします。

トラブルシューティングガイド

コメントと提案

DNA回収率が低い	溶出条件を改良する。例えば、溶出量を増加する、あるいはオプションのシェーキングスピードをチェックする。
プライマー除去が不完全	吸引が-800 mbarで行われていることを確認する。吸引力が弱いと、プライマーの除去が不完全になる。 オプションの洗浄ステップで、プライマーの除去がより効果的に行われる。
PCRが界面活性剤を含んでいる	Triton® X-100のような界面活性剤は限外ろ過により完全に除去されない。できればPCRステップでの界面活性剤の使用を省略する。

— Memo —

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

www.qiagen.co.jp

