

Long ssDNA Preparation Kit for 10 kb

English version



Cat. #	Product	Size
DS635	Long ssDNA Preparation Kit for 10 kb	
	pLSODN PCR Template	20 μ l
	Denaturing Gel-Loading Buffer (DS611, DS612)	1 ml
	λ /HindIII DNA for long ssDNA preparation kit (DS670)	200 μ l (25 ng/ μ l)
	Long ssDNA Gel Extraction kit for 10kb (DS650)	25 preps

保管条件

pLSODN PCR template : -80°C

Denaturing Gel-Loading Buffer: -20°C 以下

λ /HindIII DNA for long ssDNA preparation kit: -80°C

Long ssDNA Gel Extraction kit for 10 kb: $15-25^{\circ}\text{C}$ (納品後2年間)

キット概要

本キットを用いることにより簡便に3-10 kbの長鎖一本鎖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。

本法では、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つのニックング酵素、またはニック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変Denaturing Gel-Loading Bufferで変性させた後、アガロースゲル電気泳動を行い、目的のssDNAに相当するバンドを切り出し、Long ssDNA Gel Extraction Kit for 10kbで抽出し、ssDNAを得ることができます。

別途ご用意いただく試薬類

本キットのご使用にあたって下記試薬を別途ご用意ください。

- ・長鎖の増幅に適した PCR 酵素 (PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社)を推奨)
- ・ DpnI
- ・ アガロースゲルからの DNA 抽出キット (Monarch DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs Inc.) 等)
- ・ シームレス DNA クローニングキット (NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs Inc.)を推奨)
- ・ 高効率のコンピテントセル (JetGiga Competent Cell (DH5 α)) (BDL 商品コード DS230)を推奨)
- ・ Plsmid 精製キット (e.g. QIAGEN plasmid kit (QIAGEN N.V.))
- ・ Nicking Endonuclease (Nt.BspQI、Nb.BsrDI、Nb.BtsI、Nb.BsmI、Nb.BbvCI のうち1または2種類)
- ・ アガロース (Seakem GTG Agarose (Lonza Rockland, Inc.)を推奨)

pLSODN PCR Template の配列:

pLSODN PCR template の配列を下記ウェブサイトから入手いただけます。

(<https://www.biodynamics.co.jp/products/ssdna/>)

キット箱蓋内部のアクセス ID を使用してご覧ください。

キット構成

pLSODN PCR template

本 PCR Template は pUC Ori, Ampicillin 耐性遺伝子を有します。

本 PCR Template には以下の Nicking Endonuclease サイトおよび制限酵素サイトが含まれず、これらの酵素を ssDNA の切り出しに使用することができます。

ssDNA 切り出しに使用可能な nicking endonuclease
Nt.BspQI, Nb.BbvCI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nb.BsmI

ssDNA 切り出しに使用可能な制限酵素

AatII, AbsI, AflIII, AgeI, ApaI, AscI, AvrII, BamHI, BbsI, BbvCI, BglIII, BmrI, BmtI, BsaI, BsgI, BsiWI, BsmBI, BsmI, BspEI, BspQI, BsrDI, BsrGI, BssHII, BtgZI, BtsI, EagI, EcoRI, EcoRV, FseI, HindIII, Kasi, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, MreI, NcoI, NgoMIV, NotI, NsiI, PciI, PstI, PvuII, SacI, SalI, SbfI, SgrDI, SmaI, SpeI, SphI, TspMI, XbaI, XhoI

Denaturing Gel-Loading Buffer

Denaturing Gel-Loading Bufferはアガロースゲル電気泳動を使用して長鎖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と変性ゲルローディングバッファーとの混合物を電気泳動します。電気泳動中、ニックを入れたプラスミドに由来するDNAは一本鎖状態を維持します。

ニックを入れたプラスミド溶液に3倍容のDenaturing Gel-Loading Bufferを添加後、加熱、冷却して泳動します。

λ/HindIII DNA for long ssDNA preparation kit

1 本鎖DNAのおおよその泳動位置を推定するためのマーカーです。2 本鎖DNAに比べて1 本鎖DNAは配列依存的に泳動位置が変化しやすいため、バンドの位置はおおよその ssDNA のサイズとなります。20 μl を分取し、加熱・冷却してから泳動します。バンドパターンについては図 3 をご参照ください。

Long ssDNA Gel Extraction Kit for 10kb (#DM650)

キット構成: 25 preps

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	guanidine thiocyanateを含みます。	45 ml
Wash Buffer 1	Tris-base buffer ご使用前に45 ml の100 % エタノールを添加してください。	8 ml
Wash Buffer 2	Tris-base buffer ご使用前に45 ml の100 % エタノールを添加してください。	11 ml
Elution Buffer	10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0.	5 ml
Spin Column		25個

・Gel-Dissolving Bufferに沈殿物が生じた場合は、37°Cで溶解してください。

Long ssDNA Gel Extraction Kitは、アガロースゲルからの長鎖一本鎖DNA精製キットです。スピンカラム、バッファーの処方およびプロトコルは、長鎖一本鎖DNAの精製に最適化されています。本キットで精製された長鎖一本鎖DNAは、高品質で機械的分解が少なく、精製プロセス中に紫外線による損傷を受けません。

また、本カラムキットは、Long ssDNA Preparation Kit用の精製のみならず、長鎖一本鎖DNAの精製やクリーンアップ一般に用いることができます。

本カラムキットの特徴

- ・長鎖一本鎖DNAの精製に最適化されている
- ・高い回収率(通常55~75%)
- ・高純度の精製

- ・ssDNAの機械的分解が少ない
- ・紫外線によるDNAのダメージがない
- ・電気泳動中に長鎖一本鎖DNAのバンドを可視光下で目視できる
- ・グアニジンチオシアネートをカオトロピック塩として使用している。ヨウ化ナトリウムを使用していない。^{*1}
- ・精製可能なssDNAサイズ: 3,000~20,000 bases
- ・カラムのssDNA結合容量: 最大10 μ g
- ・溶出量: $\geq 15 \mu$ l

^{*1} 残留ヨウ化ナトリウムは除去が困難であり、酵素反応の効率を低下させます。

本カラムキットご使用上の注意

Crystal Violet Solutionをお取り扱いの際には手袋を着用し、衣服を保護してください。

作業概要

本キットを用いると、dsDNA断片を得るとほぼ同様の手順で長鎖 ssDNA を調製することができます。

まず、pLSODN PCR Template から PCR によって直鎖状ベクターを増幅します。そこに目的の DNA 断片をシームレスクローニングによりクローニングします。その時、プライマーとインサートの間にニッキング酵素認識サイトまたは制限酵素サイトを挿入します(少なくとも 1 つのニッキング酵素認識サイトが必要となります)。

得られた DNA 断片を有するプラスミドを、ニッキング酵素 2 つ、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。このようにニッキング処理または制限酵素処理によって得られたプラスミドを変性させ、次いでアガロースゲル電気泳動にかけます。その後、長鎖 ssDNA に対応するバンドを切り出して抽出します。

下表の手順で ssDNA の調製を行います。

概要	STEP	作業	ページ
設計	1	Nicking Endonucleaseおよび制限酵素の選択	6
	2	プライマーの設計	7-8
pLSODN PCR template のPCRと調製	3	pLSODN PCR templateのPCR	9
	4	DpnI処理	9
	5	電気泳動による確認	9
	6	イソプロパノール沈殿	9
	7	電気泳動、切り出し精製	10
目的のインサートの pLSODNベクター骨格への クローニング	8	インサートの調製	11
	9	ライゲーション、トランスフォーメーション	11
	10	Colony PCR	11
	11	プラスミド精製	11
	12	制限酵素による切断確認	11
	13	インサート部分のシーケンシング	11
nicking endonucleaseによる プラスミドの切断と ssDNAの取得	14	nicking endonucleaseによるプラスミドの切断	12
	15	脱塩	12
	16	アガロース電気泳動による確認	13
	17	切り出し調製用アガロース電気泳動	14-15
	18	ssDNA の抽出	15-16

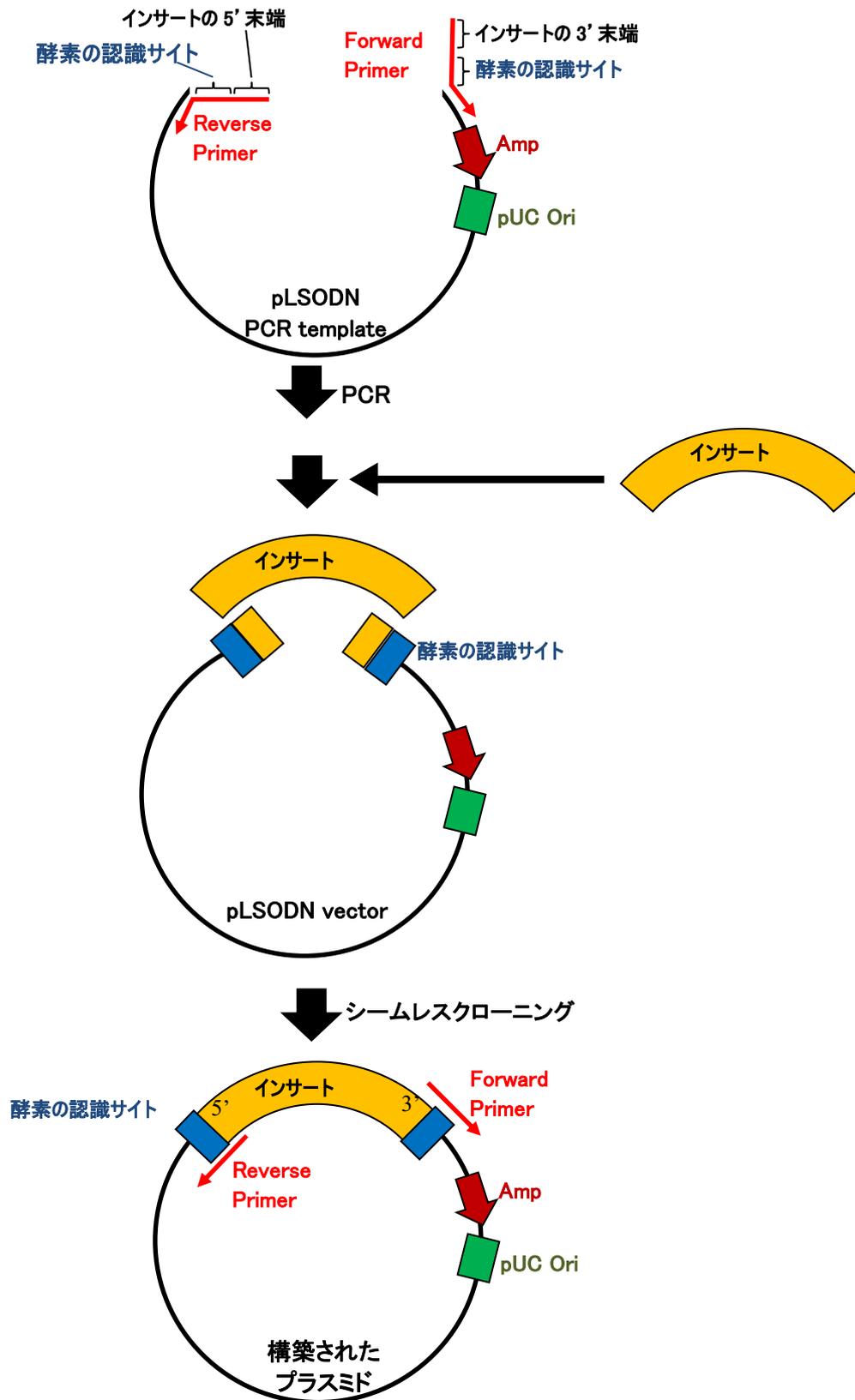
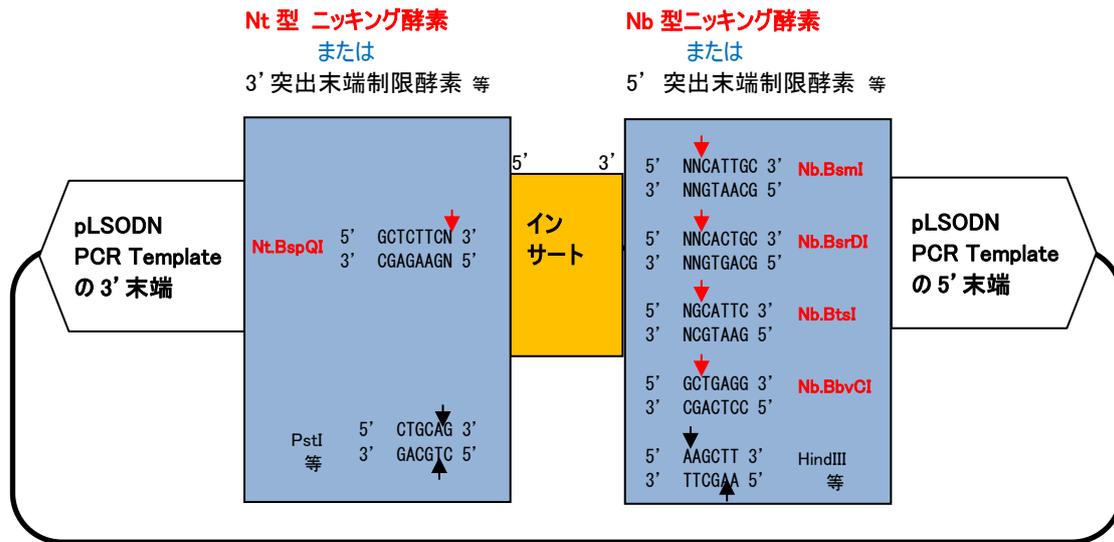


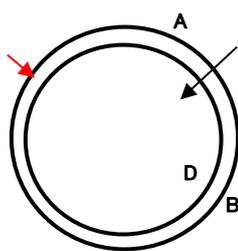
図1 プラスミド構築の概要

インサート部位の概略

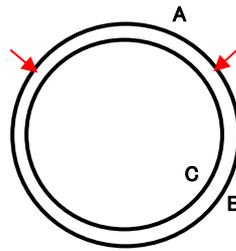


切断

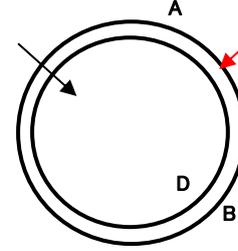
3 パターンの切断



Nt.BspQI と制限酵素



2 つのニッキング酵素



制限酵素と Nb 型ニッキング酵素

少なくとも nicking endonuclease を 1 つは使用する必要があります。

A: 目的の ssDNA

B: ベクター側の直鎖状 ssDNA,

C: 全長プラスミドの環状 ssDNA

D: 全長プラスミドの直鎖状 ssDNA

図2 ssDNA切り出しのための酵素認識サイトの配置

設計

Nicking Endonucleaseおよび制限酵素の選択、およびPCR primerの設計を行います。

STEP 1: Nicking Endonucleaseおよび制限酵素の選択

構築したプラスミドからのssDNAの切り出しは、以下の3つの条件を満たす2つのニッキング酵素あるいはニッキング酵素と制限酵素によって行うことができます。

- (1)以下の「ssDNA切り出しに使用可能なニッキング酵素および制限酵素」のリスト中にある
- (2)ssDNAの内部にはその認識サイトが存在しない
- (3)dsDNAの2本鎖のうち同じ鎖を切断する

ただ、酵素で切断した際に、ssDNAの末端に酵素の認識配列に由来する余計な塩基が残るのを最小限にする必要がある場合、図2および以下に示した設計をご検討ください。

ssDNA 切り出しに使用可能なニッキング酵素および制限酵素

インサートの5'側に付加するのに適した酵素サイト

Nt.BspQI *1

AatII, ApaI, BbsI, BmrI, BmtI, BsaI, BsgI, BsmBI, BsmI, BspQI, BsrDI, BtgZI, BtgZI, BtsI, FseI, KpnI, NsiI, PstI, SacI, SbfI, SphI, *2

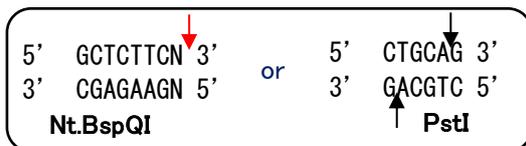
インサートの3'側に付加するのに適した酵素サイト

Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nb.BbvCI *1

AbsI, AflII, AgeI, AscI, AvrII, BamHI, BbvCI, BglII, BsiWI, BspEI, BsrGI, BssHII, EagI, EcoRI, HindIII, KasI, MauBI, MfeI, MluI, MreI, NcoI, NgoMIV, NotI, PciI, SalI, SgrDI, SpeI, TspMI, XbaI, XhoI *2

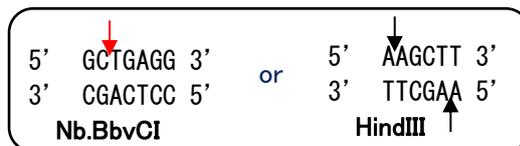
*1 nicking endonuclease を赤字で示しました。

*2 このほかに平滑末端を生成する EcoRV, PvuII, SmaI も使用することができます。



”Nt.” Nicking endonucleaseや3'突出末端の制限酵素はインサートの5'側に付加 (pLSODN PCR Template増幅時のReverse Primerに付加)するのに適しています。

例えば、N. BspQIでは矢印で示した部分の1本鎖が切断されるため、ssDNAには余計な塩基は残りません。



”Nb.” Nicking endonucleaseや5'突出末端の制限酵素はインサートの3'側に付加 (pLSODN PCR Template増幅時のForward Primerに付加)するのに適しています。

酵素によるDNAの切断後、目的のssDNA側に残る制限酵素サイト由来の塩基がインサートの末端配列と共有される場合、切り出したssDNAの末端に余計な塩基が付きません。例えば、Nb.BbvCI サイトでは矢印で示した部分のGCの後で1本鎖が切断されるため、Forward primer設計時にインサートの3'末端がGCであれば、Nb.BbvCIで処理して得られたssDNAには余計な塩基は残りません。

この性質を利用して、以下の3つの設計が推奨されます。

インサートの5'側	インサートの3'側
1) Nt 型ニッキング酵素	Nb 型ニッキング酵素
2) Nt 型ニッキング酵素	5'突出末端を生成する制限酵素 等
3) 3'突出末端を生成する制限酵素 等	Nb 型ニッキング酵素

目的のssDNAを得るために、少なくとも1つのニッキング酵素を使用する必要があります。

切断に使用できる酵素認識部位が存在しない場合、インサート中の酵素認識部位をサイレント変異で潰すなどしてください。

STEP 2: プライマーの設計

インサート長が3-6kbの場合には13kbのベクター骨格を、インサート長が6-10kbの場合には19kbのベクター骨格をpLSODN PCR Templateの PCRによって増幅し、別途調製しインサート配列とシームレスクロニングし、プラスミドを作製します。(図1, 2)

インサート長	ベクター骨格
3-6kb	13kb
6-10kb	19kb

■インサート長が3kb-6kbの場合のプライマー設計方法(13kbのベクター骨格をPCR)

13kbベクター骨格増幅用Reverse primer:

[5' - GTTCGGAGCACTAGGTAAGATGGTTATGC -3'

(pLSODN PCR Templateの3' 末端)]

+ [ニックング酵素 または 制限酵素サイト]

+ [インサートの5'末端20 mer]

の相補鎖を **Reverse primer**とする。

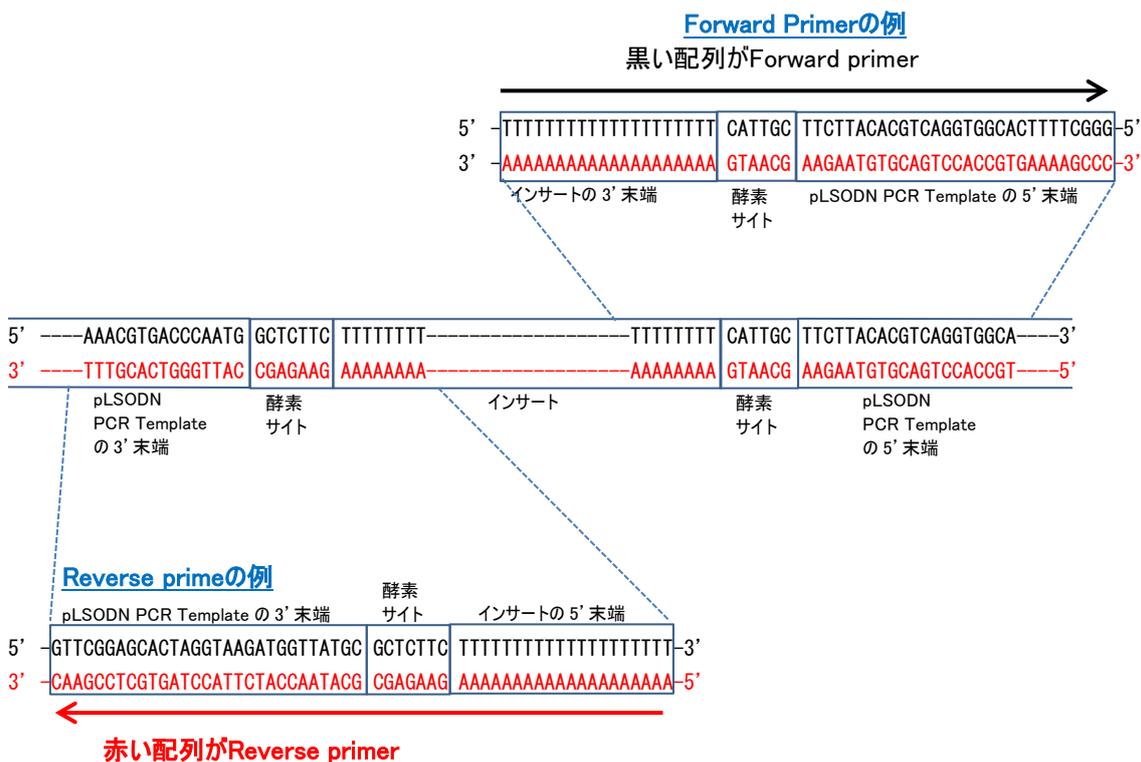
13kbベクター骨格増幅用Forward primer:

[インサートの3'末端20mer]

+ [ニックング酵素 または 制限酵素サイト]

+ [5' -TTCCTACACGTCAGGTGGCAGCTTTTCGGG-3'

(pLSODN PCR Templateの5' 末端)]



■ インサート長が6kb-10kbの場合のプライマー設計方法 (19kbのベクター骨格をPCR)

19kbベクター骨格増幅用Reverse primer:

[5' -AATCGAATCCTCACAACGTGACCCAATG-3'
(pLSODN PCR Templateの3' 末端)]
+ [ニックング酵素 または 制限酵素サイト]
+ [インサートの5'末端20 mer]

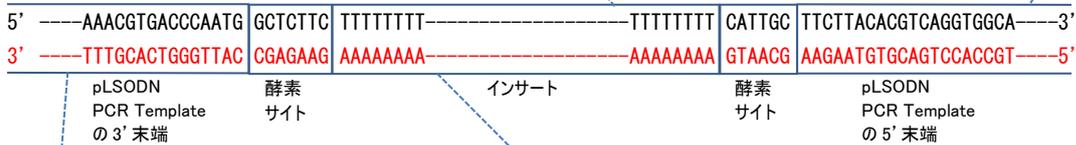
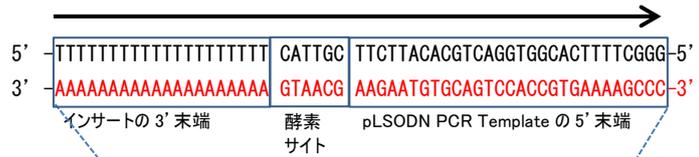
の相補鎖を **Reverse primer**とする。

19kbベクター骨格増幅用Forward primer:

[インサートの3'末端20mer]
+ [ニックング酵素 または 制限酵素サイト]
+ [5' -TTCTTACAGTCAGGTGGCACTTTTCGGG-3'
(pLSODN PCR Templateの5' 末端)]

Forward Primerの例

黒い配列がForward primer



Reverse primeの例



赤い配列がReverse primer

pLSODN PCR TemplateのPCRと調製例

pLSODN PCR TemplateのPCR → DpnI処理 → 電気泳動による確認 → イソプロパノール沈殿 → 泳動 → ゲルからの切り出し精製を行います。
調製例を以下に記載します。

STEP 3: pLSODN PCR templateのPCR

1.2 μ lのpLSODN PCR Templateを300 μ lのPCR系に用います。酵素はPrimeSTAR GXL DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社)など長鎖のPCRに適したものをご使用ください。長鎖のPCRであるため、酵素によってはPCRがうまくかからない場合もあります。

STEP 4: DpnI処理

1. 300 μ lのPCR産物にDpnI を60 units加える。
2. 37 °Cで1時間インキュベーション。
3. 80 °Cで20分間インキュベーション。
4. 氷上に移す。

STEP 5: 電気泳動による確認

0.8 % アガロースゲルおよび1 × TAEを用いて、100V、40分間の電気泳動を行い、バンドを確認します。*1, *2, *3

- *1 通常、1 μ l程度を泳動すればバンドが確認できます。
- *2 DNA量が多すぎるとウェルにDNAが残ってしまうことやバンドがブロードになることがあります。この現象は泳動時にDNAを希釈し、濃度を下げることによって改善することがあります。
- *3 1 × TAE bufferの組成は40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTAとなります(参考文献2)。

STEP 6: イソプロパノール沈殿

1. 1/10倍量の3M Sodium acetate (pH 5.2)、1/50倍量の5 mg/mlグリコーゲン、0.7倍量のイソプロパノールを加え、混和する。
2. 20,000 × g、4°Cで30分間遠心する。
3. 上清を除く。
4. 1 mlの70%エタノールを加え、ボルテックスで混和する。
5. 20,000 × g、4°Cで15分間遠心する。
6. 上清を除く。
7. 1 mlの70%エタノールを加え、ボルテックスで混和する。
8. 20,000 × g、4°Cで15分間遠心する。
9. 上清を除く。
10. 沈殿を乾燥させる。
11. 10 μ lのTEで溶解する。*1

- *1 サイズが大きいDNAでは沈殿にTEを加えてから、溶解するまでに時間がかかることがあります。沈殿の様子を見ながら、30分程度室温でインキュベーションしてください。また、管壁に薄く沈殿が広がっていることがあります。

STEP 7: 切り出し用電気泳動 とゲルからの切り出し精製

1. 1 × TAE中で加熱溶解したアガロースにCrystal Violet Solutionを40 μ l/100 mlの割合で加え、0.8%アガロースゲルを作製する。^{*1}
2. 10 μ lの上記精製PCR産物(STEP 6)に30 μ lのDenaturing Gel-Loading Bufferを加える。^{*2}
3. Crystal violetを添加した0.8% アガロースゲルおよびCrystal violetを添加した1 × TAE (Crystal Violet Solutionを40 μ l/100 mlの割合で添加)を用いて、100V、40分間の電気泳動を行う。^{*3, *4}
4. ゲルから目的のバンドを切り出し、市販のキットを用いて精製する(Monarch DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs Inc.)等)。

^{*1} Crystal violetを含むゲル中のDNAのバンドは、電気泳動中に可視光下でリアルタイムに観察することができません。

^{*2} 20kbと分子量の大きいDNAを大量に泳動するため、通常のLoading Dyeを使用するとDNAがウェルに残る場合があります。そのため、Denaturing Gel-Loading Bufferを用います。ssDNAを分離する場合(STEP 16,17)と異なり、ここでは泳動前にサンプルの加熱は行いません。

^{*3} Crystal violetを含むゲルを用いた電気泳動ではDNAの移動度はDNA量に大きく影響を受けます。そのため、分子量マーカーを指標とした場合、必ずしも推定される位置に泳動されません。ただし、バンドが電気泳動中にリアルタイムで目視することができるため、確認用泳動(STEP 5)の結果と比較することにより目的のバンドを同定することができます。

^{*4} ランニングバッファーおよびゲル中のCrystal violetが徐々に減少します。電気泳動の間、バッファーおよびゲルの色を確認し、必要に応じて陽極側のランニングバッファーにCrystal violetを添加してください。

目的のインサートのpLSODNベクター骨格へのクローニング

インサートの断片の調製 → ライゲーション・トランスフォーメーション → Colony PCR → プラスミド精製
→ 制限酵素による切断確認 → インサート部分のシーケンシングを行います。

STEP 8: インサートの調製

インサートの断片を適宜調製します。

STEP 9: ライゲーション、トランスフォーメーション

1. 市販のキットを用いてインサート(STEP 8)をベクター骨格(STEP 7)にシームレスクローニングする。(NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs Inc.) 推奨)
2. 反応産物を用いてトランスフォーメーションを行う。*1

*1 大きいプラスミドではライゲーション効率やトランスフォーメーション効率が下がることがあるため、高コンピテンシーのコmpetentセルを推奨します。(JetGiga Competent Cell (DH5 α) (株式会社バイオダイナミクス研究所 商品コード DS230))

STEP 10: Colony PCR

インサートの両サイドにあたる、pLSODN PCR Template 内の Colony PCR プライマーとしては以下を使用することができます。ただし、内部配列によっては PCR がかからないこともあります。

19kb の骨格を使用した場合

19 kb Forward Primer: TTTGTATGGCAAGACATCATGGGCGTTAAC

19 kb Reverse Primer: TGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAA

このプライマーの組み合わせではインサート + 約 350 bp のバンドが得られます。

13kb の骨格を使用した場合

13 kb Forward Primer: AACAGGTAAGACTACCCGTTGGGAGAAAGA

13 kb Reverse Primer: TTCGATGTAACCCACTCGGGCACCCAACTG

このプライマーの組み合わせではインサート + 約 500 bp のバンドが得られます。

STEP 11: プラスミド精製

1. LB 培地、SOB 培地等(100 μ g/ml Ampicillin)を用いてオーバーナイト培養を行う。*1
2. 市販の精製キット等でプラスミドを精製する (QIAGEN Plasmid Kit (QIAGEN N.V.) 等)。

*1 本工程のプラスミドは 16-29kb と大きいものになります。サイズが大きいプラスミドには変異が導入されやすい傾向がありますので、複数回の継代はできるだけ避けてください。

STEP 12: 制限酵素による切断確認

Nicking Endonuclease と認識サイトが共通な制限酵素(2 本鎖切断)が存在します。これらの名称は nicking endonuclease の "Nt." または "Nb" を除いたものとなっています (例 Nicking Endonuclease: Nt.BspQI, 制限酵素: BspQI)。これらの制限酵素を利用して、候補クローンのインサート長を確認することができます。

STEP 13: インサート部分のシーケンシング

ssDNA 調製の前にインサート部分のシーケンシングを行い、目的のインサートが挿入されていることを確認してください。

Nicking endonuclease によるプラスミドの切断と ssDNA の取得

上記のように作製したプラスミドを、2 つの nicking endonuclease または nicking endonuclease と制限酵素で切断します。切断後、ニックを入れたプラスミドはエタノール沈殿で脱塩する必要があります。本工程の**脱塩は、ssDNA のアガロースゲル電気泳動を行うにあたって非常に重要です**。これは過剰の塩および Mg^{2+} は dsDNA を安定化し、ニックを入れたプラスミドの完全な変性を防ぐためです。手順の一例を以下に記載します。

STEP 14: nicking endonuclease によるプラスミドの切断

作製したプラスミドを、2 つの nicking endonuclease または nicking endonuclease と制限酵素で切断します。
*1, *2

- *1 100 μ g のプラスミドを出発試料にした場合、最終的に得られる ssDNA は 2-6 μ g 程度の場合が多くなります。
- *2 バッファー、酵素量、反応時間等の反応条件は各酵素のプロトコルに従ってください

(例)

プラスミド (100 μ g)	適宜
10x 3.1 NEBuffer	10 μ l
Nb.BbvCI (10 unit/ μ l)	5 μ l
Nt.BspQI (10 unit/ μ l)	5 μ l
dH ₂ O	適宜
計	100 μ l

37°Cで3時間インキュベーション。

STEP 15: 脱塩

1. 1/10倍量の3M sodium acetate (pH 5.2)、1/50倍量の5 mg/ml グリコーゲン、2.5倍量のエタノールを加え、混和する。
2. 20,000 \times g、4°Cで30分間遠心する。
3. 上清を除く。
4. さらに一分間遠心して、残存する液を集めマイクロピペットでしっかり除く。*1
5. 1 mlの70%エタノールを加え、ボルテックスで混和する。*2
6. 20,000 \times g、4°Cで15分間遠心する。
7. 上清を除く。
8. さらに一分間遠心して、残存する液を集めマイクロピペットでしっかり除く。
9. 再度70%エタノールを加えて洗浄する(5-8を繰り返す)。*3, *4
10. 沈殿を乾燥させる。
11. 100 μ lのTEで溶解させる(ニックが入ったプラスミドの終濃度は1 μ g/ μ l程度となる)。*5

- *1 塩を除くには、残液をできるだけ取り除く必要があります。
- *2 ボルテックスによって、沈殿が剥離し70%エタノール中を激しく浮遊しますが、再溶解を心配する必要はありません。脱塩操作としては好ましい状態です。また脱塩が進むと沈殿が粘稠になります。
- *3 十分に脱塩するために70%エタノールでの洗浄は2回行います。
- *4 ニッキング酵素処理済みプラスミド溶液に過剰の塩と Mg^{+2} が含まれていると、Denaturing Gel-Loading Bufferと混合しても完全には変性されません。次のステップのために、ニックを入れたプラスミドを脱塩する必要があります。
- *5 サイズが大きいDNAでは沈殿にTEを加えてから、溶解するまでに時間がかかることがあります。沈殿の様子を見ながら、30分程度室温でインキュベーションしてください。また、管壁に薄く沈殿が広がっていることがあります。

STEP 16: アガロースゲル電気泳動による確認

上記の手順(STEP 15)で得られたニックの入ったプラスミドの ssDNA への分離を、アガロースゲル電気泳動で確認します。

アガロースゲルはインサート長に応じて以下の濃度で調製します。

インサート長	アガロースゲル濃度
3-6 kb	1.0%
6-10 kb	0.8%

1. ニッキング酵素処理済みプラスミド(STEP 15) (300 ng)と3倍量のDenaturing Gel-Loading Bufferを混合する。^{*1, *2}
2. 70°Cで5分間インキュベーションする。^{*3, *4}
3. 氷上で1分間急冷する。
4. アガロースゲルおよび1 x TAEを用いて、100V、40分間の電気泳動を行う。^{*5, *6}
5. 0.5 μg/ml のエチジウムブロマイドで 20 分間染色する。
6. UV 下で観察を行う(図 3)。

- *1 ニッキング酵素処理済みプラスミド溶液に過剰の塩とMg²⁺が含まれていると、Denaturing Gel-Loading Bufferと混合しても完全には変性されません。ニックを入れたプラスミドを予め脱塩する必要があります。
- *2 DNA濃度はDenaturing Gel-Loading Buffer を加えた後の時点で0.25 μg/μlを超えないようにしてください。
- *3 サンプルの加熱・冷却は、泳動直前に行ってください。加熱冷却によって変性されたDNAは、Denaturing Gel-Loading Buffer中でも徐々に再アニールされます。さらに、サンプルがゲルにアプライされると、サンプル溶液中のDenaturing Gel-Loading Bufferの拡散により変性効果が徐々に弱まります。
- *4 添付のλ/HindIII DNA for long ssDNA preparation kit をサンプル同様に70°Cで5分間インキュベーションおよび氷上で1分間急冷した後に泳動することにより、1本鎖DNAのおおよその泳動位置を推定することが出来ます。ただし、2本鎖DNAに比べて1本鎖DNAは配列依存的に泳動位置が変化しやすいため、バンドの位置はおおよそのssDNAのサイズとなります。
- *5 λ/HindIII DNA for long ssDNA preparation kit の23130 base および6557 baseの断片は近接する2本のバンドに見ることがあります。
- *6 市販のDNA分子量マーカーはDenaturing Gel-Loading Bufferと混合して電気泳動しても、明確な1本鎖DNAに相当するバンドを与えない場合があります。原因としては二次構造や不完全な変性に起因する相補鎖同士の移動度の違い等が考えられます。

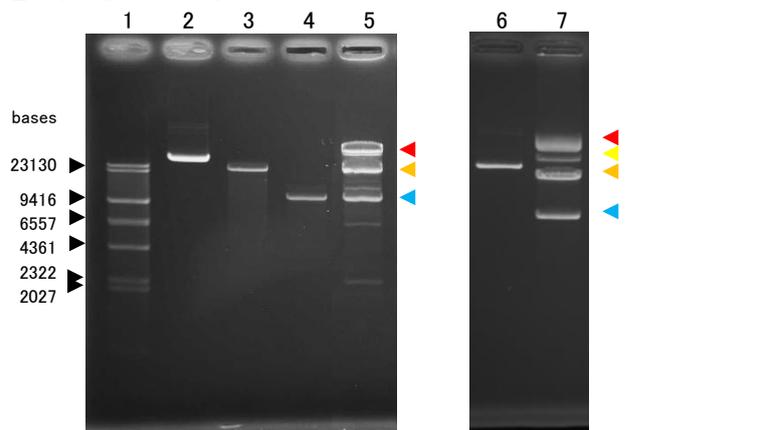


図 3. アガロースゲル電気泳動によるニックを入れたプラスミドの分離の確認。

レーン1: λ/HindIII DNA for long ssDNA preparation kit (20 μl を分取し、加熱冷却後泳動)

レーン2: 未切断プラスミド

レーン3: シームレスクローニング用に調製したpLSODN PCR Templateの PCR産物精製物(STEP 7)

レーン4: シームレスクローニング用に調製したインサート (STEP 8)

レーン5: ニックを入れたプラスミド (ニッキング酵素および制限酵素で切断)

レーン6: 未切断プラスミド

レーン7: ニックを入れたプラスミド (ニッキング酵素2つで切断)

レーン2-7については、いずれも3倍量のDenaturing Gel-Loading Bufferを加え、70°Cで5分間インキュベーションおよび氷上で1分間急冷した後に泳動。

青、橙、赤の矢印は、それぞれ目的のssDNA、ベクター側の直鎖状ssDNA、全長プラスミドの環状ssDNAを示しています。黄色の矢印は全長プラスミドの環状ssDNAがランダムに切断された直鎖状ssDNAを示しています。

STEP 17: 切り出し調製用アガロース電気泳動

ニックを入れたプラスミドを ssDNA 切り出し用のアガロースゲル電気泳動に供します。

アガロースゲルはインサート長に応じて以下の濃度で調製します。

インサート長	アガロースゲル濃度
3-6 kb	1.0%
6-10 kb	0.8%

- 泳動に使用する1×TAEをあらかじめ氷上または冷蔵庫で冷却しておく。
- 1×TAE中で加熱溶解したアガロースにCrystal Violet Solutionを40 μl/100 mlの割合で加え、アガロースゲルを作製する。^{*1}
- ニック酵素処理済みプラスミド(STEP 15)と3倍量のDenaturing Gel-Loading Bufferを混和する。^{*2, *3}
- 70℃で5分間インキュベーションする。^{*4}
- 氷上で1分間急冷する。
- 泳動装置をドラフト内に設置する。泳動槽はバケツに敷いた氷の上に置く。Crystal violetを添加したアガロースゲルおよびCrystal violetを添加した1×TAE(Crystal Violet Solutionを40 μl/100 mlの割合で添加)(あらかじめ氷上または冷蔵庫で冷やしておく)を泳動槽に適量注ぐ。^{*5, *6, *7, *8}
- 100Vで電気泳動を行う(泳動中、TAEの温度が20℃よりも上がらないようにする)
- ssDNAの青色のバンドの移動を確認しながら泳動を行い、十分にバンドが分離できた時点で泳動を止める(図4)。^{*9, *10, *11}
- ssDNAのバンドをゲルから切り取る。^{*12}

^{*1} Crystal violetを含むゲル中でのssDNAのバンドは、電気泳動中に可視光下で観察することができます。

^{*2} ニック酵素処理済みプラスミドを脱塩しておくことが重要です。

^{*3} 高い精製度のssDNAを得るために、目的のssDNAのバンドのDNA量は0.5 μg/band以上になるようにしてください。同時に、ニック酵素処理済みのサンプルのDNA濃度はDenaturing Gel-Loading Buffer を加えた後の時点で0.25 μg/μlを超えないようにしてください。

^{*4} サンプルの加熱・冷却は、泳動直前に行ってください。

^{*5} ウェルの上端までサンプルを満たすのは避けてください。ウェルから溢れたサンプルがコンタミネーションの原因となります。厚めのゲルを作製し、深いウェルを形成することをおすすめします。

^{*6} 安全のために、Crystal Violetによる電気泳動はドラフトチャンバー内で行ってください。Crystal Violetやエチジウムブロマイドを使って密閉した場所で電気泳動を行うことは避けてください。これらの色素は、電気泳動中に水蒸気または気泡と共に空気中に拡散します。

^{*7} 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り、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、ssDNAの染色が弱くなります。バンドが確認できないほど染色が薄くなった場合は、電気泳動後0.5から1時間、クリスタルバイオレット溶液(40 μlのCrystal Violet solution / 100mlの水)中で穏やかに振盪することによってゲルを再び染色することができます。

^{*8} ドラフトチャンバー内での電気泳動中にゲルの温度を低く保つために、アイスバケツに敷いた氷上に電気泳動層を置くことをお勧めします。少なくとも、低温を保つために氷上で冷却した1×TAE泳動バッファーを使用してください。

^{*9} Crystal violetを用いた泳動ではssDNAは100 ng程度から検出が可能です。

^{*10} Crystal violetを含むゲルを用いた電気泳動の場合、ssDNAの移動度はDNA量に大きく影響を受けます。そのため、分子量マーカーを指標としても必ずしも推定される位置に泳動されません。ただし、バンドを電気泳動中にリアルタイムで目視することができるため、確認用泳動(STEP 16)の結果と比較することにより目的のバンドを同定することができます(図3、4)。

^{*11} ランニングバッファーおよびゲル中のCrystal violetが徐々に減少します。電気泳動の間、バッファーおよびゲルの色を確認し、必要に応じて陽極側のランニングバッファーにCrystal violetを追加で添加してください。

^{*12} 余分なゲルをできるだけ切り取ってください。

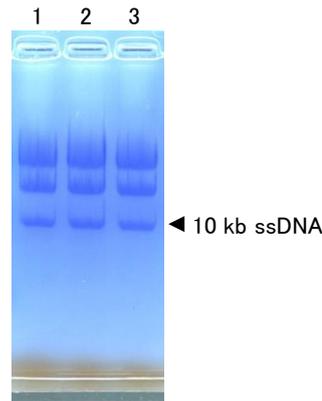


図4 切り出し用アガロースゲル電気泳動.

レーン1,2,3: 切断したプラスミド
可視光下で撮影

STEP 18: ssDNA の抽出

開始前に:

- ・8 ml の Wash Buffer 1 と 11 ml の Wash Buffer 2 にそれぞれ 45 ml の 100%エタノールを加えます。
- ・イソプロパノールが必要となります。
- ・すべての遠心は、室温(20°C~25°C)で 16,000 × g(通常の遠心機では約 13,000 rpm 程度)で行ないます。低温での遠心は ssDNA の収量に影響を与える可能性があります。

1. STEP17 で切り取ったゲル片を 1.5 ml のマイクロチューブに移し、重量を測定する。
2. 3 倍量の Gel Dissolving Buffer を加える。
3. ゲル片が完全に溶解するまで、時々ボルテックスで混和しながら 50°C でインキュベートする(通常 10~15 分間)。*1
4. 溶解したことを確認した後、ゲル片の 1 倍量のイソプロパノールを加えてよく混ぜる。
5. スピнкаラムをコレクションチューブにセットする。
6. スピнкаラムにサンプルを加えて 1 分間遠心した後、1 ml ピペットを使用してコレクションチューブのろ液を除去する。*2, *3, *4
7. スピнкаラムを再度 1 分間遠心した後、10 μl または 100 μl ピペットを使用して残っている混合液を完全に除去する。*5
8. 500 μl の Wash Buffer 1 をスピнкаラムに加え、1 分間遠心した後、1 ml ピペットを使用してコレクションチューブ内のろ液を除去する(1 回目の洗浄)。
9. Wash Buffer 1 で項目 10 の洗浄を繰り返す(2 回目の洗浄)。
10. 500 μl の Wash Buffer 1 をスピнкаラムに加え、キャップをしっかり閉めた後 5 秒間ボルテックスしてスピнкаラムの内壁全体を洗浄する(3rd Wash)。
11. 1 分間遠心した後、コレクションチューブ内ろ液を残したまま 5 秒間ボルテックスしてスピнкаラムの外壁とコレクションチューブの内壁の両方を洗浄する。
12. さらに 1 分間遠心した後、1 ml ピペットを使用してコレクションチューブ内のろ液を除去する。
13. 500 μl の Wash Buffer 2 をスピнкаラムに加え、1 分間遠心した後、1 ml ピペットを使用して、コレクションチューブのろ液を除去する(4 回目の洗浄)。
14. スピнкаラムを再度 1 分間遠心して Wash Buffer 2 を完全に除去する。
15. スピнкаラムを新しい 1.5ml マイクロチューブに移す。
16. スピнкаラムに 15-40 μl の Elution Buffer を加え、70°C で 5 分間インキュベートする。*6
17. インキュベート後すぐに、スピнкаラムを 1 分間遠心して ssDNA を溶出する。*7

*1 ゲル片を完全に溶解します。完全にゲル片が溶解されないと、ssDNA の回収率が低下したり、アガロースやバッファがコンタミネーションしたりする可能性があります。

*2 サンプル量が 500 μl 以上の場合は、スピнкаラムにアプライする液量が 500 μl を超えないようにカラムへのアプライを複数回に分けて行ってください。

*3 コレクションチューブからデカンテーションでろ液を捨てないでください。コレクションチューブの縁と内壁上部が汚染されます。ろ液の除去には 1 ml ピペットを使用してください。

*4 スピнкаラム先端がろ液に接触しないように注意してください。可能であれば、コンタミネーションを防ぐために、いくつかの洗浄ステップで新しいコレクションチューブを使用することをお勧めします。予備のコレクションチューブはキットに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 やその希釈物で別途カラムの洗浄を行わないでください。
- *6 一般的な溶出量は 15 -40 μ l です。超純水を使用しての ssDNA の溶出も可能です。平均溶出量は、40 μ l の Elution Buffer から 36.5 μ l、15 μ l の Elution Buffer から 12 μ l 程度となります。
- *7 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含まれています。必要に応じて、スピンドウン(例えば 20,000 \times 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 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。

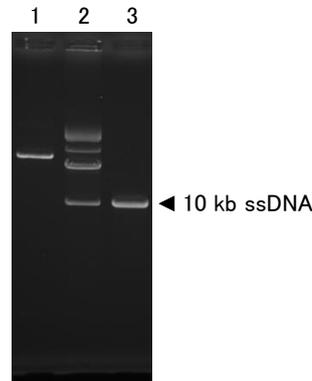


図 5 抽出後 ssDNA のアガロースゲル電気泳動

レーン1: 未切断のプラスミド
 レーン2: 切断後のプラスミド
 レーン3: 抽出後のssDNA (10 kb断片)

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
ssDNA のバンドがきれいに分離しない	塩の残存	エタノール沈殿において 70%エタノールによる洗浄を充分に行ってください。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。具体的には 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。
ssDNA の収量が低い	塩の残存	エタノール沈殿において 70%エタノールによる洗浄を充分に行ってください。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。具体的には 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。
	ニックング酵素処理後のエタノール沈殿での回収率が低い	エタノール沈殿の際にグリコーゲンを加えると回収率が増加することがあります。
3 kb より小さな ssDNA の調製も本キットを用いて行えるか	原理上、本品で 3 kb 以下の ssDNA を調製することも可能です。ただ、3 kb 以下の ssDNA を調整する場合、『Long ssDNA Preparation Kit for 1.5kb (製品番号 DS615)』または『Long ssDNA Preparation Kit for 3.0kb (製品番号 DS625)』をご利用ください。本品で製品番号 DS615・DS625 と同量の 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 0.25 μ g/ μ l)、バンドの中の 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. 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.
2. 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 x 5
DS612	Denaturing Gel-Loading Buffer	1 ml x 2
DS650	Long ssDNA Gel Extraction Kit for 10kb	
DS670	λ /HindIII DNA for long ssDNA preparation kit	
DS230	JetGiga Competent Cell (DH5 α)	
DS615	Long ssDNA Preparation Kit for 1.5kb	
DS625	Long ssDNA Preparation Kit for 3.0kb	

本品のご利用について

本製品は研究目的用にのみ販売しております。

本製品は特許第 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。