Axygen® AxyPrep MAG PCR クリンナップキット

概要

AxyPrep MAG PCR クリンナップキットは、独自のマグネティックビーズ技術を用いた、PCR 反応産物を迅速かつハイスループットで精製するためのキットです。本キットは、最適化されたバッファーシステムにより、60 bp、またはそれ以上の PCR 反応産物を選択的にビーズに吸着させます。本手順書は、結合、洗浄、溶出ステップから構成されており、残留プライマー、dNTPs、塩、酵素などの夾雑物を効率的に除去し、PCR 産物を精製します。さらに、AxyPrep MAG PCR クリンナップ試薬の量を調整することでプライマーダイマーの除去も可能です。（補足資料参照）

製品の特長	アプリケーション
60 bp 以下の DNA 断片および夾雑物を除去	PCR
自動化に適合	シークエンシング：サンガー法、NGS
IMAG を用いた効率的なワークフロー	フラグメント解析
遠心工程およびフィルトレーション不要	ジェノタイピング、SNP 検出
処理時間：15 分	制限酵素クリンナップ
様々なアプリケーションに応じたスケールの調整が容易	プライマーウォーキング

プロセスの概要

1. 10 µL の PCR 反応溶液あたり 18 µL の AxyPrep MAG PCR クリンナップ試薬を加え（1:1.8 の割合）、よく混合し、PCR 反応産物（DNA）をマグネティックビーズに結合させる。
2. PCR 産物（DNA）が結合したビーズと夾雑物を含む上清を分離する。
3. PCR 反応産物（DNA）が結合したビーズを、70% エタノールで 2 回洗浄する。
4. PCR 反応産物（DNA）をビーズから溶出し、新しいプレートまたはチューブに回収する。

AxyPrep MAG PCR クリンナップキット

製品名	カタログ番号
AxyPrep MAG PCR クリンナップキット 1 mL	MAG-PCR-CL-1
AxyPrep MAG PCR クリンナップキット 5 mL	MAG-PCR-CL-5
AxyPrep MAG PCR クリンナップキット 50 mL	MAG-PCR-CL-50
AxyPrep MAG PCR クリンナップキット 250 mL	MAG-PCR-CL-250

AxyPrep MAG PCR クリンナップキットは使用する PCR 反応溶液量によって反応数が変わります。PCR 反応溶液量ごとの反応数は下表の通りです。96 ウェルプレートでの標準的な反応溶液量は 10-20 µL です。

キットごとの反応数のめやす

PCR 反応溶液量 (µL)	MAG-PCR-CL-1	MAG-PCR-CL-5	MAG-PCR-CL-50	MAG-PCR-CL-250
10	61	305	3,055	15,275
20	30	152	1,527	7,635
50	12	61	611	3,055

キット内容 / 保管条件

AxyPrep MAG PCR クリンナップ試薬

- キットがお手元に届きましたら 4℃で保管してください。
- 凍結は避けてください。
- 使用期限は製造より 12 ヶ月です。
- 使用前には**室温**に戻し、よく懸濁の上ご使用ください。
- 見た目上、均一に混和する必要があります。

ご用意いただく試薬及び器具（96 ウェルフォーマットの場合）

- 70% エタノール
- 10 mM Tris-HCl pH=8.0
- 試薬グレード水
- 10 mM Tris-HCl pH=8.0, 1 mM EDTA
- 96 ウェル PCR プレート
- PCR プレートシール
- IMAG マグネティックセパレーション装置
  （Axygen® カタログ番号：IMAG-12T, IMAG-96P, IMAG-150-I-G, IMAG-50-I-G）

IMAG マグネティックセパレーション装置セレクションガイド

（キットには含まれていません。お近くの Corning® / Axygen 取扱代理店へお問い合わせください）

IMAG マグネティックセパレーション装置は各種 AxyPrep MAG キットのプロトコールに適するよう設計されています。使用容量に応じて下表より最適なチューブおよびプレートを選択してください。

カタログ番号	製品名	入数	ブランド
IMAG-12T	IMG マグネティックセパレーション装置 スクリューキャップチューブ用	1 組	Axygen
IMAG-96P	IMG ユニバーサルマグネティックセパレーション装置 PCR および 96 ウェルプレート用	1 組	Axygen
IMAG-150-I-G	マグネティックセパレーション装置 1.5 mL / 2.0 mL マイクロチューブ用	1 組	Axygen
IMAG-50-I-G	マグネティックセパレーション装置 15 mL / 50 mL 遠沈管用	1 組	Axygen

IMAG-12T マグネティックセパレーション装置用スクリューキャップチューブ

カタログ番号	製品名	入数	ブランド
SCT-050-SS-C	0.5 mL 自立型スクリューキャップチューブ O リング付きキャップ 透明	500 本 / 包 4000 本 / ケース	Axygen®
SCT-150-SS-C	1.5 mL 自立型スクリューキャップチューブ O リング付きキャップ 透明	500 本 / 包 4000 本 / ケース	Axygen
SCT-200-SS-C	2.0 mL 自立型スクリューキャップチューブ O リング付きキャップ 透明	500 本 / 包 4000 本 / ケース	Axygen

IMAG-96P マグネティックセパレーション装置用 96 ウェルプレート

カタログ番号	製品名	入数	ブランド
PCR-96-FS-C	0.2 mL 96 ウェル PCR プレートフルスカート	10 枚 / 包 50 枚 / ケース	Axygen
PCR-96M2-HS-C	0.2 mL 96 ウェル PCR プレートハーフスカート	10 枚 / 包 50 枚 / ケース	Axygen
3365	360 µL 96 ウェル丸底プレート	25 枚 / 包 100 枚 / ケース	Corning®
3797	330 µL 96 ウェル丸底プレート	25 枚 / 包 100 枚 / ケース	Corning
3957	0.5 mL 96 ウェル V 底プレート	10 枚 / 包 100 枚 / ケース	Corning
3359	1 mL 96 ウェル丸底プレート	5 枚 / 包 100 枚 / ケース	Corning
3961	2 mL 96 ウェル丸底プレート	5 枚 / 包 100 枚 / ケース	Corning

IMAG-150-I-G マグネティックセパレーション装置用マイクロチューブ

カタログ番号	製品名	入数	ブランド
MCT-150-C	1.5 mL スナップロックマイクロチューブ 透明	500 本 / パック 5,000 本 / ケース	Axygen
MCT-150-L-C	1.5 mL スナップロックマイクロチューブ マキシマムリカバリー 透明	250 本 / パック 2,500 本 / ケース	Axygen
MCT-200-C	2.0 mL スナップロックマイクロチューブ 透明	500 本 / パック 5,000 本 / ケース	Axygen
MCT-200-L-C	2.0 mL スナップロックマイクロチューブ マキシマムリカバリー 透明	250 本 / パック 2,500 本 / ケース	Axygen

IMAG-50-I-G マグネティックセパレーション装置用遠沈管

カタログ番号	製品名	入数	ブランド
430791	遠沈管 15 mL ポリプロピレン製 セントリスターキャップ バルク包装	50 本 / パック 500 本 / ケース	Corning
352096	コニカルチューブ 15 mL ポリプロピレン スクリューキャップ付き	50 本 / パック 500 本 / ケース	Falcon®
430829	遠沈管 50 mL ポリプロピレン製 セントリスターキャップ バルク包装	25 本 / パック 500 本 / ケース	Corning
352070	コニカルチューブ 50 mL ポリプロピレン スクリューキャップ付き	25 本 / パック 500 本 / ケース	Falcon

操作法（96 ウェルフォーマットの場合）

1. 前処理ステップ

a. **PCR 反応溶液を、新たな 96 ウェルプレートに移し替えるべきか否かを確認する。**

PCR 反応溶液の 2.8 倍量が PCR プレートのウェル容量を超える場合は、300 µL の容量の 96 ウェル丸底プレートに移し替える。

b. **ビーズ試薬を室温へ戻し、十分に懸濁するようにやさしく転倒混和する。**

2. 結合ステップ

a. **AxyPrep MAG PCR クリンナップ試薬を下表に従って PCR 反応溶液に加える。**

PCR 反応溶液量（µL）	添加する AxyPrep MAG PCR クリンナップ試薬量（µL）
10	18
20	36
50	90

注：（添加する AxyPrep MAG PCR クリンナップ試薬量）=1.8 x（精製する PCR 反応溶液量）

b. **ピペッティングを 5 回繰り返し、PCR 反応溶液と AxyPrep MAG PCR クリンナップ試薬を十分混和する。その後、室温で 5 分間静置する。**

このステップで、125 bp 以上の PCR 反応産物が試薬中のマグネティックビーズに結合する。60 bp ～ 125 bp の PCR 反応産物を回収する場合は、補足資料を参照する。

混和後、溶液の色は均一になる。

c. **マグネティック装置（IMAG-96P）に設置し、溶液が透明になるまで 3 分静置する。**

必ず溶液が透明になったことを確認し、ビーズを完全にマグネットに集積させる。

d. **プレートをマグネティック装置に設置したまま、透明な上澄み液を取り除く。**

集積したビーズに触れないように注意する。もしマグネットに引き寄せられたビーズが混和してしまった場合は、できる限りビーズを吸い取らないように、数 µL の溶液を残したままにする。

3. 洗浄ステップ

a. **プレートをマグネティック装置に設置したまま、200 µL の 70% エタノールを添加し、30 秒間静置する。その後、エタノールを取り除く。続いてこのステップをもう一度繰り返す。**

マグネットに集積したビーズを乱すことは、PCR 産物の回収率が低下する原因になる。また、エタノールはできる限り取り除く。残留したエタノールは、下流アプリケーション（PCR、電気泳動など）に影響を与える。

注：5 分程度の風乾により余分なエタノールを蒸発させてもよい。ただし、過度に風乾した場合（集積したビーズにひび割れが生じる）、溶出効率が著しく低下する。

4. 溶出ステップ

a. **プレートをマグネティック装置から外し、40 µL の溶出バッファー（試薬グレード水、Tris-HCl pH8.0、あるいは 10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA）を加え、ピペッティングを 5 回繰り返す。**

DNA はすぐにビーズから離れ、バッファーへ溶出する。40 µL 以上の溶出バッファーを用いることも可能だが、最終濃度は希釈される。また、40 µL 以下のバッファーに溶出する場合は、ビーズと十分混和するように留意する。（それでも溶出効率が低下する場合がある）

b. **再びプレートをマグネティック装置に設置し、溶液が透明になるまで、1 分静置する。**

上清には溶出した DNA が含まれる。ビーズは廃棄してよい。

c. **溶出液を新しい保存あるいは解析用のプレートに回収する。**

補足資料

125 bp 以下の DNA の回収

125 bp 以下の DNA 断片を回収するためには、

i）使用前にイソプロパノールを AxyPrep MAG PCR **クリンナップ**試薬に添加する。

あるいは、

ii）結合ステップでマグネティック装置に設置する前にイソプロパノールをサンプルへ添加する。

1. キット使用前にイソプロパノールをビーズ試薬に添加する。

70 µL の 100% イソプロパノールを 180 µL の AxyPrep MAG PCR **クリンナップ**試薬へ加え、最終イソプロパノール濃度を 28% とする。

PCR 反応溶液 10 µL につき、25 µL のビーズ - イソプロパノール溶液を加える（PCR 反応溶液：ビーズ =1：2.5）。

注：自動化システムで行う場合、PCR サンプル量の設定を通常の 1.4 倍にするとよい。たとえば、実際の PCR 反応溶液量が 10 µL の場合、装置には 14 µL で設定する。するとビーズ - イソプロパノール溶液 25 µL が自動的に分注される。

2. 100% イソプロパノールを、最終濃度が 20% となるように、サンプル - ビーズ溶液へ加える。たとえば、7 µL の 100% イソプロパノールを、28 µL のサンプル - ビーズ溶液（18 µL ビーズ、10 µL サンプル）へ加える。

200 bp 以下の DNA、あるいはプライマーダイマーの除去

長いプライマーセットを使用した場合、あるいは、プライマーダイマーのコンタミネーションがある場合、希釈した AxyPrep MAG PCR **クリンナップ**試薬を用いることでプライマーダイマーの除去が可能です。

1. 連続滴定法により最適な希釈率を確認する。

a. 水 2 µL、4 µL、8 µL をそれぞれ 18 µL の AxyPrep MAG PCR **クリンナップ**試薬へ加え、それぞれのプライマーダイマー除去効率を確認する。

b. 最適な希釈率を用いて精製を行う。

製品についてのご質問は、ScientificSupportJP@corning.com までご連絡ください。

・商品の外観・仕様は予告無しに変更することがあります。予めご了承ください。
・For a listing of trademarks, visit www.corning.com/lifesciences/trademarks.
All other trademarks are the property of their respective owners.
・保証・免責事項：特に記載がない限り、記載中の製品は研究用機材および試薬です。診断、または治療用途には使用しないでください。また人体には使用しないでください。
コーニングライフサイエンスは本製品の臨床または診断用途でのいかなるパフォーマンスについても保証しません。

CORNING

総販売元
コーニングインターナショナル株式会社
ライフサイエンス事業部
〒107-0052　東京都港区赤坂 1-11-44　赤坂インターシティ 7 階
Tel：03-3586-1996　　Fax：03-3586-1291
www.corning.com/lifesciences
CLSJP@corning.com

技術サポートへのお問い合わせは
Tel：03-3586-1268
ScientificSupportJP@corning.com

© 2021 Corning Incorporated
CLS-096-02
R0-2110-000-B