

# Axygen® AxyPrep MAG PCR クリンナップキットを用いた効果的な DNAフラグメントセレクション

## アプリケーションノート



Liu Jian, PhD  
Corning Incorporated  
Corning Life Sciences Asia Technology Center  
Shanghai, China

### 次世代シーケンスのサンプル調製における Axygen AxyPrep MAG PCR クリンナップキットの活用

Axygen AxyPrep MAG PCR クリンナップキットを PCR 後の不要なダイマー、Taq DNA ポリメラーゼ、金属イオン、その他不純物の除去に使用する方法はすでに確立され、使用されています。本製品は磁気ビーズと安定した結合バッファーを用いることで、効果的な DNA 精製と濃縮ができる特長があります。しかし、次世代シーケンス(NGS)を行う前のサンプル調製では、DNA 精製だけでなく目的の長さの DNA フラグメントのみを効果的かつ効率的に選択、精製できる製品が求められます。そこでその要望に応えるために新たなプロトコルを開発しました。従来プロトコルを最適化することで、100 ~ 1,000 bp に断片化された DNA サンプルから一定サイズのフラグメントを効果的に精製できます。サイズセレクションはほとんどの NGS プラットフォームやその他 DNA アプリケーションに必要な工程です。

### 改良プロトコルとサンプル調製

磁気ビーズの表面に結合する DNA フラグメントのサイズとポリエチレングリコール (PEG) 濃度との間には逆相関があることが知られています<sup>1,2</sup>。PEG の濃度が高いと、あらゆるサイズの DNA がビーズに結合し、濃度が低すぎると大きなサイズの DNA のみが結合します。MAG PCR クリンナップキットバッファーの PEG 濃度は 100 ~ 1,000 bp の DNA フラグメントからサイズセレクションができるよう最適化されています。

この効果を確認するため、Axygen AxyPrep プラスミドキットを用いて大腸菌からプラスミド DNA を抽出し、サンプルとしました。抽出した核酸は、標準的な TE バッファー (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶出し、Covaris S220 超音波破碎機を用いて、300、500、800 bp をピークとするフラグメントに断片化しました。それらのプラスミド DNA サンプルを混合し 100 ~ 1,000 bp の均一なサンプルとしました。

### Axygen AxyPrep MAG PCR クリンナップキットを用いた簡単な DNA フラグメントセレクション方法

詳細なプロトコルは製品に同封されています。まず、100 ~ 1,000 bp に断片化された DNA サンプル 50 µL を使用します。最終的に 20 µL に溶出しますので、DNA サンプルを濃縮することにもなります。目的サイズに適した分量の PCR クリンナップキット試薬をサンプルに加え (Table 1)。添加量は、初期比率に最初のサンプルボリュームを乗じて算出します<sup>3</sup>。

$$\text{添加する PCR クリンナップ試薬量} = \frac{\text{初期比率}}{\text{最終比率}} \times \text{最初のサンプル量}$$

室温で 5 分間静置し、結合が完了後、マグネットラックにサンプルを設置しビーズをマグネットに吸着させます。(目的サイズの DNA フラグメントはこの時点でまだビーズには結合せず上清に含まれています。ここでビーズと結合しているのは、目的サイズより大きな DNA フラグメントです。) 次に上清を新しいチューブへ移し、下の式で算出した量の PCR クリンナップキット試薬を加えます<sup>3</sup>。

$$\text{添加する PCR クリンナップ試薬量} = \left\{ \frac{\text{最終比率}}{\text{初期比率}} - 1 \right\} \times \text{最初のサンプル量}$$

ここで目的サイズの DNA がビーズに結合します。マグネットラックにチューブを設置し、上清を取り除きます。ラックに設置したまま、200 µL の 70% エタノールで 2 回洗浄し、残った塩と PEG を取り除きます。最後に、ビーズに結合した DNA を溶出バッファー (Tris-EDTA) もしくは分子生物学研究グレードの水に溶出します。上記の方法で調整した各サイズレンジの DNA サンプルを Agilent 2100 Bio-analyzer で分析しました (Figure 1)。

**Table 1. 2ステップ法でのサイズセレクションにおける試薬添加量の算出係数**

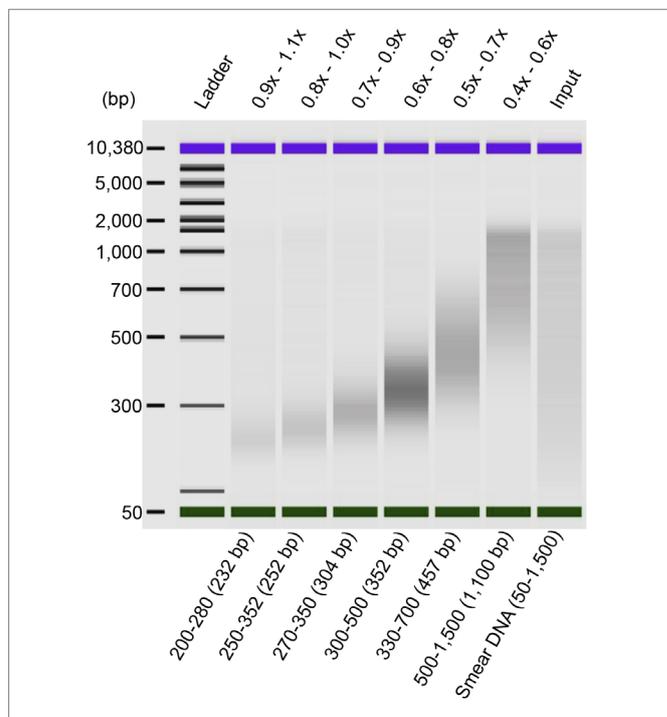
レーン	初期比率	最終比率	セレクションレンジ (bp)	ピーク (bp)
1	0.9x	1.1x	220 - 280	232
2	0.8x	1.0x	250 - 320	252
3	0.7x	0.9x	270 - 350	304
4	0.6x	0.8x	300 - 500	352
5	0.5x	0.7x	330 - 700	457
6	0.4x	0.6x	500 - 1,500	1,100

## Axygen® AxyPrep MAG PCR クリナップキットは DNA フラグメントセレクションに効果的に応用可能

2ステップ法を用いることで、Axygen AxyPrep MAG PCR クリナップキットは 100 ~ 1,000 bp に断片化された DNA フラグメントサンプルに対して、非常に高いセレクション性能を示します。短いフラグメントになるほど狭いレンジでセレクションができるうえ、600 ~ 1,000 bp の範囲についてもユーザーの目的サイズに応じてプロトコルを最適化することが可能です。その場合、試薬添加の係数を 0.55 ~ 0.66 の間で微調整することで最適化できます。一般的に、長いフラグメントほど回収率が高くなる傾向があるとされています (≥ 500 bp)。しかし、この現象は単に不均一な長さの断片化 DNA が回収されているだけかもしれません。なぜなら Covaris システムはそこまで均一な長さの DNA に断片化するわけではないからです。

本方法は自動化にも向いているので、ハイスループットのプラットフォームにも簡単に導入することができます。さらに、ビーズと結合するときのインキュベーション温度を 50 °C に設定することや、ビーズロスを極限まで防ぐよう注意すること (ピペッティングを丁寧に行うなど) で回収率が向上します。

また、試薬の初期比率を下げることで 2,000 bp までのサイズセレクションに使用することができます。ただし、1ステップ法で行う場合、試薬の初期比率は 0.4 が限度となります。試薬の初期比率が低いと DNA フラグメントの回収率も低下します。



**Figure 1. サイズセレクション後の DNA サイズレンジを Agilent 2100 Bio-analyzer で測定した。**

Table 1. に示すとおり、PCR クリナップキット試薬の添加量に応じて各レンジのフラグメントが精製されている。最左列：DNA サイズマーカー。使用した DNA サンプルは 50 ~ 1,500 bp。

## 参考文献

- Lis JT and Schleif R. (1975). Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucleic Acids Research*, 383-389.
- DeAngelis MM, Wang DG, and Hawkins TL. (1995). Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic Acids Research*, 4742-4743.
- Effective DNA Fragment Selection Using the Axygen AxyPrep MAG PCR Clean-up Kit Protocol (CLS-A-AN-433).

・価格は 2018 年 3 月現在のものです。価格は税抜き価格で記載しております  
 ・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 us at [www.corning.com/lifesciences/trademarks](http://www.corning.com/lifesciences/trademarks)  
 All other trademarks in this document 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**

**FALCON**

**AXYGEN**

**PYREX**

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](http://www.corning.com/lifesciences)  
[CLSJP@corning.com](mailto: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](mailto:ScientificSupportJP@corning.com)