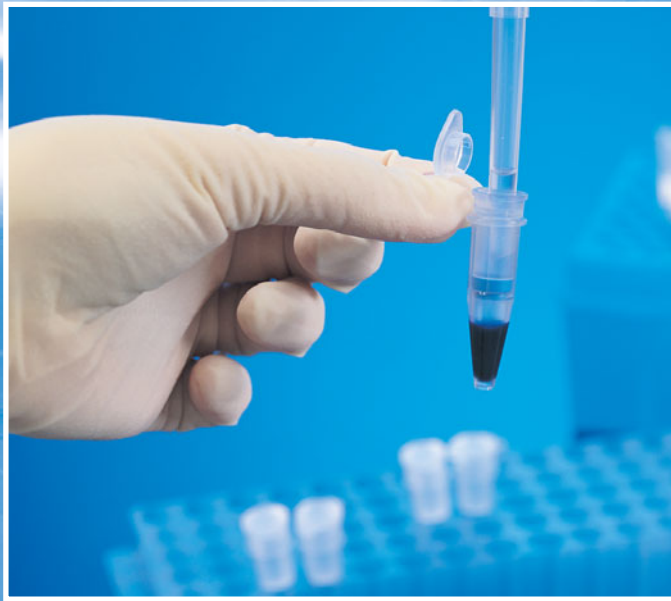




Life Sciences

# ナノセツプ遠心ろ過デバイス

## アプリケーション／プロトコール集



## 限外ろ過の基礎

1) 限外ろ過(UF)とは	3
2) 分画分子量(MWCO)の定義	3
3) 限外ろ過の用途	3
4) 適切なデバイスの選択	3
5) 正しい分画分子量(MWCO)の選択	3-5

## タンパク質での応用

タンパク質での応用における基礎情報	6
1) 低濃度タンパク質溶液の濃縮	7
2) 低濃度溶液からのタンパク質高収率回収法(ブロッキング法)	8
3) タンパク質溶液の脱塩/バッファー交換(ダイアフィルトレーション)	9
4) タンパク質混合溶液の粗分画	10
5) 培養上清中のモノクローナル抗体の濃縮/精製	11
6) 分析用途向け除タンパク質試料の調製	12
7) ポリアクリルアミドゲルからの迅速で効率的なタンパク質の溶出	13

## 核酸での応用

核酸での応用における基礎情報	14
1) 標識反応後の未反応ヌクレオチドの除去	15
2) 限外ろ過デバイスを使用したシングルチューブでのDNA精製とクローニング	16
3) 制限酵素分解用DNA試料の精製/バッファー交換	17
4) アガロースゲル中のDNA断片の回収と精製	18
5) 酵素分解アガロースゲル中のDNA断片の回収と精製	19
6) ショ糖密度勾配中の部分分解DNA断片の回収と精製	20
7) ポリアクリルアミドゲル中のオリゴヌクレオチドの回収と精製	21
8) ポリアクリルアミドゲル中のmRNA転写物の回収と精製	22

## PCR反応の前後処理

PCR反応の前後処理における基礎情報	23
1) PCR用生体試料の調製	24
2) PCR用試薬類の調製	25
3) PCR用プライマーの回収と精製	26
4) PCR産物の回収と精製	27

## 参考データ

1) 殺菌方法	28
2) 遠心ろ過時間の目安	28
3) ろ過速度に及ぼす限外ろ過膜素材の影響	28
4) ろ過速度に及ぼす遠心力の影響	29
5) ろ過速度に及ぼす試料濃度の影響	29
6) ろ過速度に及ぼす試料温度の影響	29

## ナノセップ遠心ろ過デバイス使用説明書

# 限外ろ過の基礎

## 1) 限外ろ過(UF)とは

限外ろ過(UF: Ultrafiltration)は、極微量の粒子や溶液中に溶解している分子を分離するための膜分離技術です。分離の原理は、分子の形や帯電状態などの要因に影響を受けるものの、基本的には分子の大きさ(分子量)です。異物が膜内部で捕捉される精密ろ過膜(MF 膜)とは異なり、限外ろ過膜(UF 膜)では、膜の孔よりも大きな分子が膜表面に保持され、ろ過操作中に濃縮されます。

膜を使用しないプロセス(クロマトグラフィー、透析、溶媒抽出、遠心分離など)と比較して、限外ろ過には、次のような特徴があります。

- 処理する分子へのダメージが少ない。
- タンパク質の変性を招くような操作(例えば、有機溶媒による抽出など)を必要としない。
- イオン強度やPHを保てる。
- 時間がかからず比較的安価である。
- 低温(例えば低温室)での操作が可能である。
- 非常に効率的で、分子の精製と濃縮とが同時に行える。

## 2) 分画分子量(MWCO)の定義

限外ろ過膜の保持能力は、分画分子量(MWCO: Molecular Weight Cut Off)で表わされます。

限外ろ過膜の分画分子量は、「その膜で90%以上阻止できる低濃度の球状溶質(典型的なタンパク質分子)の概略の分子量(kD: キロダルトン表示)」と定義されています。

なお、分子の形状は、膜の保持能力に直接影響を及ぼします。例えば、DNAのような直鎖状の分子は、同じ分子量の球状分子を阻止できるような膜を通り抜けることがありますのでご注意ください。

## 3) 限外ろ過の用途

限外ろ過には、以下の3つの一般的な用途があります。

### 1. 濃縮

限外ろ過は、低濃度のタンパク質やDNA/RNA 試料溶液の濃縮に大変便利な方法です。しかも穏和(100 kb のDNAを切断せず、タンパク質の酵素活性の減少を引き起こさない)で、非常に効率的(通常90%以上の回収率)です。

### 2. 脱塩とバッファー交換(ダイアフィルトレーション)

限外ろ過は、塩類の除去や交換、界面活性剤の除去、結合分子と未結合分子との分離(B/F 分離)、低分子量物質の除去、あるいはイオンやPH環境の速やかな変更などに簡便で、効果的な方法です。

### 3. 分画

限外ろ過は、タンパク質を含まないろ液の調整、DNA やタンパク質溶液中の未結合、あるいは取り込まれなかった標識物(ラベル)の除去、増幅反応後のPCR産物の精製な

どの用途に効果的です。

ただし、限外ろ過は、分子量の似かよった二つの分子を正確に分離することはできません。効果的に分離するためには、分離する分子間に少なくとも1.0倍の分子量の違いが必要です。

## 4) 適切なデバイスの選択

試料の容量に応じて以下の表(表1)から適切なデバイスを選択することができます。

試料容量	デバイス
50 $\mu$ L~500 $\mu$ L	ナノセップ
500 $\mu$ L~3.5 mL	マイクロセップ
3 mL~15 mL	マクロセップ
15 mL~60 mL	ジャンボセップ

## 5) 正しい分画分子量(MWCO)の選択

試料容量の次は、適切なMWCO(限外ろ過の場合)または孔径(精密ろ過の場合)の選択が必要です。MWCOは目的とする分子量(キロダルトン表示)の溶質の90%以上を保持する能力があるものをいいます。表2と表3は核酸とタンパク質のMWCOの保持能力の目安を示しています。タンパク質の場合、溶質として保持したい分子量の1/3~1/6の数値のものを選ぶことを推奨します。迅速な処理を重要とする場合は、1/3のMWCOを選び、保持率が重要な場合には、1/6のMWCOを選ぶことを推奨します。

限外ろ過膜の保持能力は、分子量(MW)だけでなく、さまざまな要素によって決定されます。したがって、特定の用途における正しいMWCOの選択には、分子の形状、静電荷電、試料濃度、試料組成そして操作条件などの多数の要素を考慮する必要があります。

注意: 限外ろ過膜のMWCOは、各メーカーでそれぞれ異なる分子を使用して決められています。特定の用途に対する性能を確認するために、予備実験を行うことを推奨します。

表2  
核酸用アプリケーションのためのMWCO選択

MWCO	塩基対(二本鎖)	塩基数(一本鎖)
1K	5~16 bp	9~32 bs
3K	16~32 bp	32~65 bs
10K	50~145 bp	95~285 bs
30K	145~285 bp	285~570 bs
50K	240~475 bp	475~950 bs
100K	475~1,450 bp	950~2,900 bs
300K	1,450~2,900 bp	2,900~5,700 bs
1000K	4,800~5,700 bp	>9,500 bs

表 3

タンパク質用アプリケーションのための MWCO 選択

MWCO	膜の公称孔径	分子サイズ	生物学的分子量
1K			3K~10K
3K			10K~20K
10K			30K~90K
30K			90K~180K
50K	5 nm	15~30 nm	150K~300K
100K	10 nm	30~90 nm	300K~900K
300K	35 nm	90~200 nm	900K~1800K
1000K	100 nm	300~600 nm	>3000K

※公称孔径は、走査型電子顕微鏡で測定したものです(50Kは推定値です)。

表 3a

ボール製品でのタンパク質分子に対する分画分子量の選択基準 (注意: この基準は、他社製品と異なります。)

1. 膜上にタンパク質を保持(濃縮)する場合

そのタンパク質分子量の 1/3~1/6 の MWCO を選ぶことを推奨します。迅速な処理を重要とする場合は、1/3 の MWCO を選び、保持率が重要な場合には、1/6 の MWCO を選ぶことを推奨します。

2. 膜を通してタンパク質を透過させる場合

そのタンパク質分子量の 3 倍~6 倍の MWCO を選ぶことを推奨します。濃縮液側に保持したい分子がある場合は、3 倍の MWCO を選び、迅速な処理を重要とする場合には、より大きな 6 倍の MWCO を選ぶことを推奨します。

表 3b は、異なる MWCO 及び孔径に対する溶質の保持率の例を示したものです。

表 3b

異なる分画分子量のデバイスでの溶質保持率

Solute	3K	10K	30K	100K	300K	0.2 μm
Vitamin B12 (1.3K)	●	○				
Bacitracin (1.4K)	○	○				
Cryochrome C (12.5K)			○			
Myoglobin (17.8K)				○		
α-Chymotrypsinogen (24.5K)				○		
Albumin (67K)				●	○	
Gamma Globulin (160K)					○	
Thyroglobulin (669K)						○
IgM (960K)						○
Yeast						○

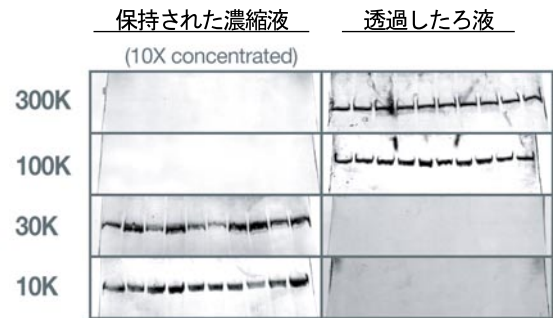
0.1%の溶質を含む溶液を濃縮して 35~50 μL とした。回収率は、ろ過前試料に対する百分率(%)で表示した。

分子の透過を促進する一般的な要因:

- 1 mg/mL 以下の試料濃度(図 1 参照)
- 球状分子より直鎖状分子
- 遠心分離機の遠心力で生じる高い膜間差圧 (これは、DNA 断片のような直鎖状分子の場合には、特に重要です。この場合、遠心力を減少することにより、膜による分子保持率を高めることができます。)
- 分子の良好な分散を促進するバッファー組成
- 分子の形状を変化させる PH やイオン強度(最適でない場合には、コンフォメーションの変化や凝集の原因となります。)

図 1

低濃度タンパク質試料溶液中での保持と透過の関係

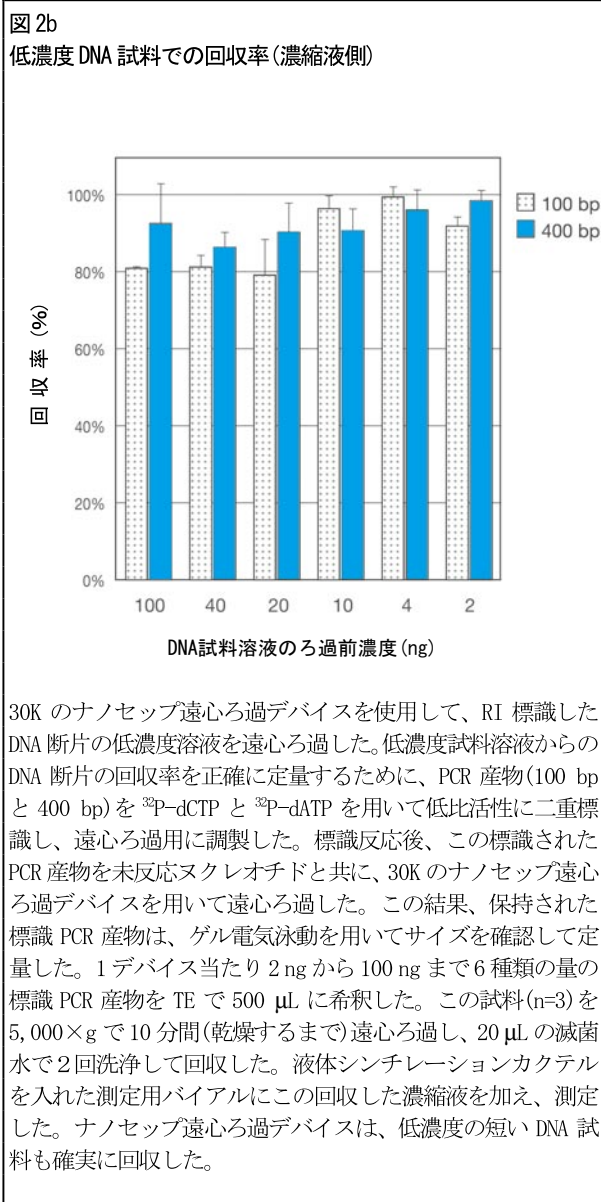
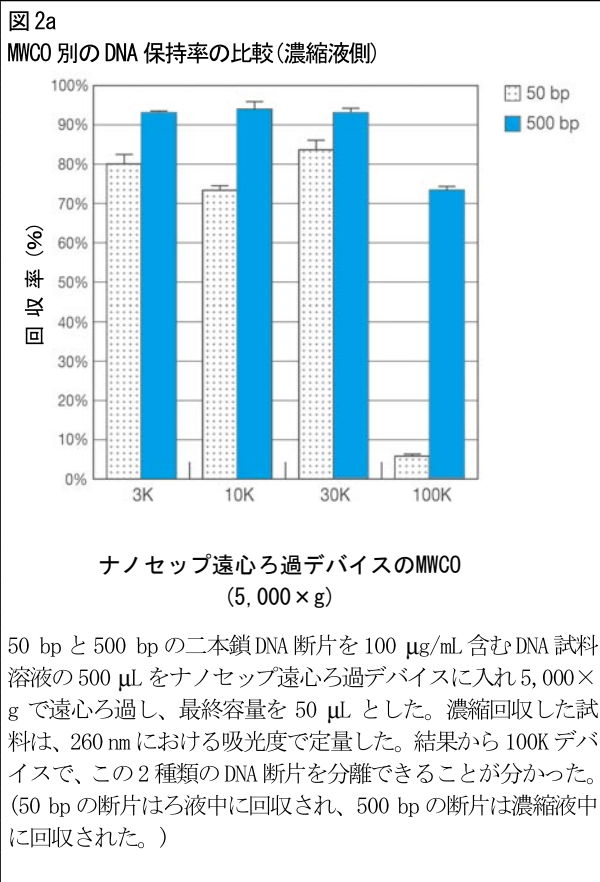


100 ng/mL の BSA(牛血清アルブミン:分子量 66 kD)を含む 400 μL の低濃度溶液を各分画分子量のナノセップ遠心ろ過デバイスについて 10 試料ずつ遠心ろ過した。濃縮液は、40 μL の PBS(Phosphate Buffered Saline)で回収した(ろ過前試料の 10 倍濃縮)。各デバイスから濃縮液とろ液をそれぞれ 20 μL 採取し、変性して 4%~20%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、クマシーブルーで染色した。BSA のろ過前濃度が高い場合には、通常 100K デバイスで保持されてしまう(データなし)が、ろ過前濃度 100ng/mL の低濃度溶液では、BSA は濃縮液中には残存していなかった。

分子の透過を減少させる一般的な要因:

- 1 mg/mL 以上の試料濃度
- 分子会合を助長するバッファー条件
- 試料濃度を増加させる他の分子の存在
- より低い膜間差圧 (遠心分離機の場合での低遠心力)
- 膜やデバイス壁面への吸着
- 低温(24°Cに対する 4°C)

注：プライマーの除去が必要な場合や、制限酵素による分解物からアダプターを回収する必要がある場合には、PCR産物の濃縮にはその大きさにかかわらず100K デバイスを使用します (図 2a 参照)。



## タンパク質での応用

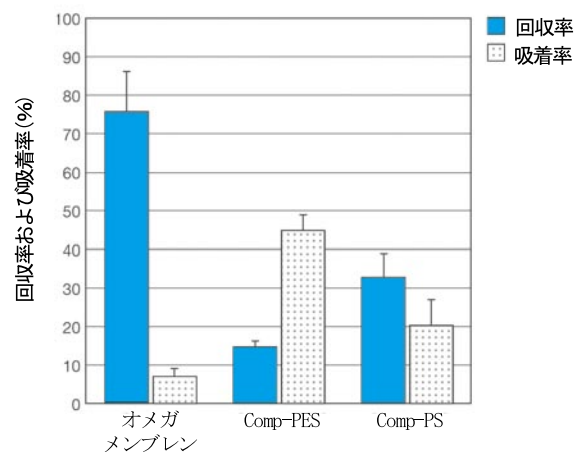
限外ろ過は、タンパク質試料の精製や濃縮に従来から使用されている穏和で優れた方法です。沈殿、エバポレーション、透析、凍結乾燥、ゲルろ過の代わりに使用し、目的タンパク質を大きく損失することなく濃縮、脱塩を行うことができます（図3参照）。

限外ろ過の利点：

- ・濃縮するタンパク質に対して最も穏和な方法である。
- ・沈殿法と比べてタンパク質の変性が最小である。
- ・イオン強度が維持できるため、塩の過度の濃縮がない。
- ・高回収率である。
- ・透析よりもはるかに速く、凍結乾燥よりもはるかに安価である。

限外ろ過は分画技術と言うより、むしろ分離技術です。限外ろ過をタンパク質の分画に使用する場合には、分離すべき二つのタンパク質の分子量に1.0倍以上の差が必要となります。

図3  
タンパク質の吸着率と回収率



放射性標識した BSA ( $^{125}\text{I}$ -BSA) 溶液をナノセップ遠心ろ過デバイス (オメガメンブレン) と他社製デバイス (Comp-PES, Comp-PS) で遠心ろ過し、その回収率を調べた。標識 BSA 試料の  $1\ \mu\text{g}$  を PBS (Phosphate Buffered Saline) で  $500\ \mu\text{L}$  に希釈し、各デバイスの使用説明書に従い、アングルローターで遠心ろ過した。濃縮液を  $40\ \mu\text{L}$  の PBS で回収し、液体シンチレーションカクテルを入れた測定バイアルに直接加えた (回収率の測定)。濃縮液を回収した後、液体シンチレーションカクテルを入れた別の測定バイアル中に、上部濃縮カップ (リザーバー) を沈めた (吸着率の測定)。上グラフは、別々に行った二つの実験で、各デバイスをそれぞれ 3 回 ( $n=3$ ) ずつ測定した結果を示している (EG&G Wallac, Gaithersburg, MD)。Comp-PES=他社製ポリエーテルスルホン、Comp-PS=他社製ポリスルホン。

## 1) 低濃度タンパク質溶液の濃縮

最も一般的で良好な結果が得られる限外ろ過の用途は、抗体、酵素、成長因子などを含む低濃度タンパク質溶液の濃縮です。細胞破砕物を含むタンパク質試料の精製は、最初の分画、2番目の分画、そして最終的な精製工程へと続きます。

これらの工程が終了した後で、その低濃度タンパク質溶液は次工程で使用する前に濃縮する必要があります。

限外ろ過は、タンパク質の生物学的な活性を有意に損失することなく、穏和な条件下で濃縮、脱塩のできる効果的な方法です(表 4 参照)。

### 操作手順

1. 試料の容量によって適切な遠心ろ過デバイスを選択する(表 1 参照)。
2. 低濃度タンパク質試料を適切な MWCO の遠心ろ過デバイスのリザーバーに入れる。

**注意：**サンプル中の溶質の濃縮は特定のタンパク質の通過を減少させるので、より大きなMWCOのデバイスが必要です。より大きな容量の試料を濃縮する場合100  $\mu$ Lの試料をまずナノセップ遠心ろ過デバイスで処理して、スケールアップした場合にどのMWCOが最適かをきめることを推奨します。

3. 推奨する遠心力でデバイスを遠心ろ過する。溶質の負荷が大きい試料の場合や、小さな MWCO デバイスでは、より長い遠心時間が必要となる。
4. 濃縮後、タンパク質試料を濃縮チャンバー(リザーバー)からピペットで回収する。オメガメンブレン表面に残存しているタンパク質試料は少量のバッファー(ナノセップ遠心ろ過デバイスでは 20  $\mu$ L)を使用することで、より高い回収率を得ることができる。

表 4  
代表的なタンパク質での分画分子量 (MWCO) と回収率との関係

溶質の種類	溶質の分子量	分画分子量 (MWCO)					
			3K	10K	30K	100K	300K
		遠心ろ過時間 (分)	15	10	8	5	3
ビタミン B12	1,335	回収率 (%)	7	—	—	—	—
アプロチニン	6,200	回収率 (%)	99	51	11	—	—
シトクロム C	12,400	回収率 (%)	100	89	77	1.8	—
キモトリプシノーゲン A	25,000	回収率 (%)	—	97	94	2.1	—
オバルブミン	45,000	回収率 (%)	—	97	92	3	—
BSA	67,000	回収率 (%)	—	—	100	26	1.5
ホスホリラーゼ B	97,400	回収率 (%)	—	—	95	91	1
IgG	156,000	回収率 (%)	—	—	—	97	1.5
サイログロブリン (1mg/mL)	677,000	回収率 (%)	—	—	—	100	91

1.0 mg/mL の試料溶液 500  $\mu$ L を 14,000 $\times$ g で遠心ろ過し、10~60  $\mu$ L に濃縮した。回収率は、ろ過前試料に対する百分率 (%) で表示した。

## 2) 低濃度溶液からのタンパク質高収率回収法(ブロッキング法)

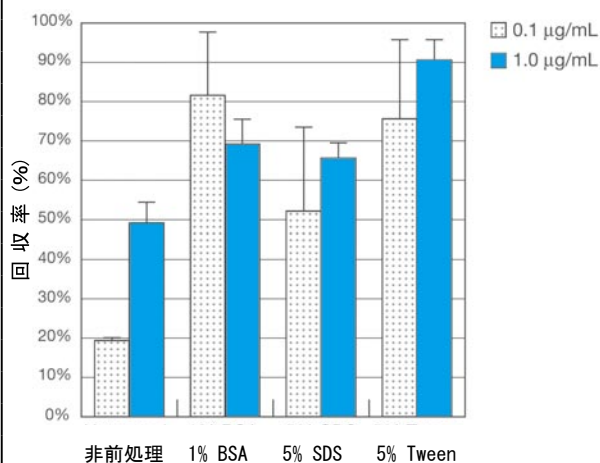
非常に低濃度のタンパク質溶液(10 µg/mL以下)に限外ろ過デバイスを用いた場合、濃縮液中のタンパク質回収率が一定でないことがしばしば起こります。PALLの遠心ろ過デバイスは、特に非特異吸着の少ない材料で構成されていますが、ある種のタンパク質で、しかもそれが特に低濃度な時には問題となる場合があります。

非特異吸着の程度は、個々のタンパク質の構造により変わります。荷電部位や疎水部位をもつタンパク質は、不可逆的な結合を引き起こすことが考えられるさまざまな膜表面に対し、高い親和性を示す傾向があります。

膜表面への吸着によるタンパク質の損失を減少させるには、膜表面に存在する結合活性部位を覆ってしまう前処理(ブロッキング)を行う方法と、タンパク質(通常は、アルブミンを使用)、界面活性剤、あるいは塩類を添加することにより溶液の組成を変えてしまう方法とがあります。

多くの場合、低濃度タンパク質溶液を濃縮する前にデバイス自身を前処理(ブロッキング)することにより回収率を改善できます(図4参照)。

図4  
タンパク質回収率を向上させるためのブロッキング



0.1 µg/mLと1.0 µg/mLのBSA(牛血清アルブミン)溶液を、前処理(ブロッキング)済みの30K ナノセップ遠心ろ過デバイスで遠心ろ過した。前処理(ブロッキング)は、デバイスをそれぞれ1% BSA、5% SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、5% Tween 20で満たし、1時間インキュベートすることで行った。デバイスは、すぐに洗浄して使用した。前処理(ブロッキング)は、濃縮液中のタンパク質の回収率を向上させた。これは、低濃度試料溶液で特に顕著であった。

### 操作手順

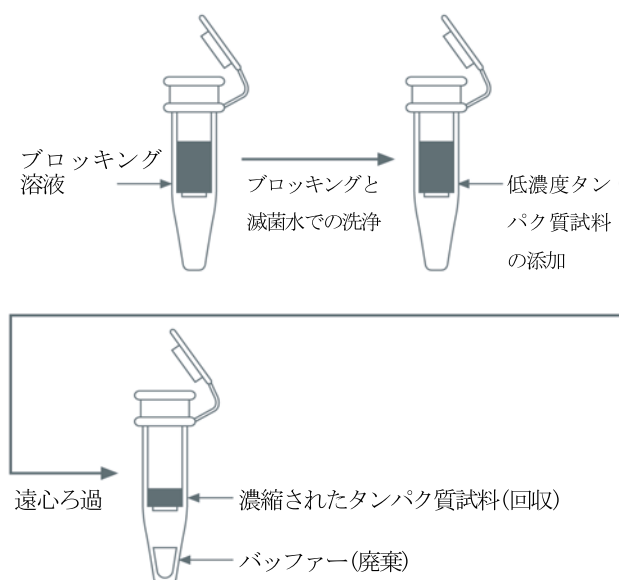
- 500 µLの滅菌済みブロッキング溶液をナノセップ遠心ろ過デバイスに加える(下図参照)。キャップを閉じて、デバイス中の溶液を室温で少なくとも1時間インキュベートする。

#### ブロッキング溶液の例:

- 1% BSAのPBS溶液
- 5% SDSの滅菌水溶液
- 5% Tween-20の滅菌水溶液
- 5% Triton-Xの滅菌水溶液
- 5% ポリエチレングリコールの滅菌水溶液
- 1% IgGのPBS溶液

- ブロッキング溶液を捨て、ナノセップ遠心ろ過デバイスを滅菌水で十分に洗浄する。
- 残存したブロッキング溶液を確実に除去するために、500 µLの滅菌水をデバイスに加え、14,000×gで5~10分間遠心ろ過する。ろ液は捨てる。
- デバイスは直ちに使用できるが、保存しておいて、後で使用することもできる。デバイスを後で使用する場合には、100 µLの滅菌水をリザーバーに加え、4°Cで保存して細菌の増殖を抑える。

重要: 一度ブロッキングしたオメガメンブレンは、乾燥させないように注意してください。





### 3) タンパク質溶液の脱塩/バッファー交換(ダイアフィルトレーション)

遠心ろ過方式の濃縮デバイスは、塩類の交換や除去に理想的です。透析による脱塩は時間がかかる上に、2液間の塩濃度差が大きい場合にしか良好に機能しません。また、透析では低濃度試料溶液の濃縮が行えず、むしろより希釈されてしまいます。

ナノセップ遠心ろ過デバイスを用いたタンパク質濃縮で、初めに濃縮され残存したバッファー成分の濃度は、本質的にろ過前溶液と同じです。脱塩やバッファー交換を行うためには、濃縮した試料溶液を滅菌水や新しいバッファーで希釈し、再度遠心ろ過する必要があります。この希釈/濃縮工程を「不連続ダイアフィルトレーション」と呼び、希望の量の塩を除去/交換するまで繰り返し行うことができます(表5参照)。

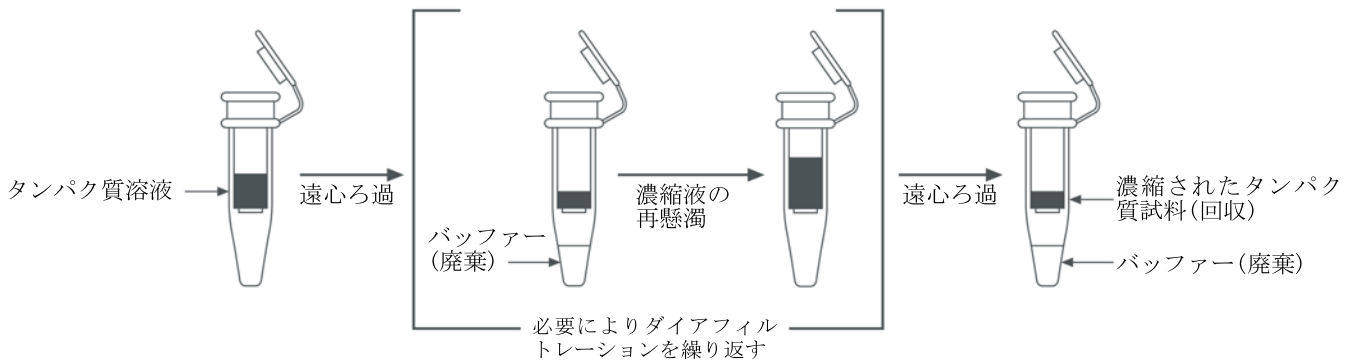
表5  
脱塩率の予測

遠心ろ過 の回数	各遠心ろ過 後の塩濃度	脱塩率 (%)
1	500 mM	95%
2	25 mM	99.75%
3	1.25 mM	99.99%
4	0.06 mM	100%

各遠心で 500  $\mu$ L を 25  $\mu$ L に濃縮する場合を想定した。

#### 操作手順

1. 保持したいタンパク質の分子量に対し、その1/3以下のMWC0のナノセップ遠心ろ過デバイスを選択する(表3a参照)。
- 2a. 塩濃度を変えることなく試料を濃縮したい場合：  
リザーバーに 500  $\mu$ L の試料を入れ、試料を濃縮するのに必要な遠心速度と時間で遠心ろ過する。遠心ろ過時間は、試料濃度とMWC0より決める。
- 2b. 脱塩やバッファー交換を行いたい場合：  
最初の濃縮を行った後、新しいバッファーあるいは滅菌水を加えて、この濃縮液を 500  $\mu$ L に希釈する。再度遠心ろ過を行う。この操作を塩濃度が低下するまで繰り返す。通常は、2回の希釈/濃縮の繰り返しで99%以上の塩と、90%以上の低分子量の混入物が除去できる。さらに高い純度を希望する場合は、希釈/濃縮操作の3回目も行う。しかし、繰り返しのダイアフィルトレーションは、トータルでの回収率を減少させる。したがって、品質と回収率の検討をしておく必要がある。
3. ピペットチップで濃縮試料溶液を回収する。回収率を最大に上げるために、濃縮カップを 10~20  $\mu$ L の新しいバッファーあるいは滅菌水で2回洗浄して、回収する。



#### 4) タンパク質混合溶液の粗分画

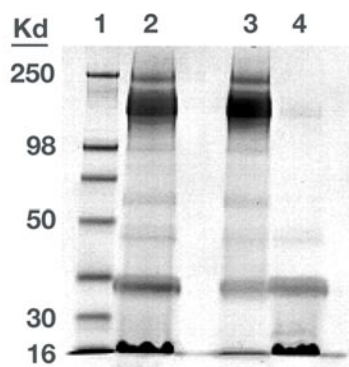
限外ろ過は基本的には分離技術ですが、以下の条件下では、分子量が大きく異なるタンパク質の粗分画（大まかな分画）に使用できます（図5参照）。特定のタンパク質を分画したり濃縮するためには、次の点に注意しなければなりません。

##### 粗分画の実施に必要な条件

1. 粗分画するタンパク質同士の分子量差：10倍以上
2. 限外ろ過膜で保持するタンパク質の分子量：MWC0の3倍以上
3. 限外ろ過膜を透過させるタンパク質の分子量：MWC0の1/3以下
4. 試料濃度：5 mg/mL以下
5. 許容遠心力：500×g～1,000×g以下

注意：本法は絶対的なものではなく、対象タンパク質を濃縮することによって、相対的に分離する方法です。

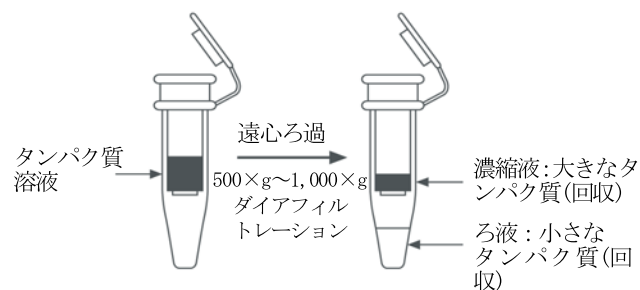
図5  
タンパク質の粗分画



IgG(MW:156 kD)とシトクロムC(MW:12.4 kD)を含む5.0 mg/mLのタンパク質試料溶液500 μLを100Kのナノセップ遠心ろ過デバイスを用いて、1,000×gで30分間遠心ろ過した。濃縮液は、500 μLに希釈して回収した。この濃縮液とろ液の15 μLずつを10%ポリアクリルアミドゲルで分析した。レーン1=分子量マーカー、レーン2=IgGとシトクロムCとの混合液、レーン3=濃縮液、レーン4=ろ液。2回の遠心ろ過で、95%以上のシトクロムCがろ液中に認められ、85%以上のIgGが膜により保持された(データなし)。

##### 操作手順

1. ナノセップ遠心ろ過デバイス(通常100Kあるいは300K)を500 μLのタンパク質混合溶液で満たす。
2. **低速(500×g～1,000×g)**で約20分間遠心ろ過する。
3. ろ液を回収し、新しいチューブに移して保存する。ろ液は、必要であればもっと小さいMWC0のデバイスで濃縮する。
4. 濃縮液をダイアフィルトレーションするために、サンプルリザーバーに500 μLの適切なバッファーを加える。簡単に混合した後、遠心ろ過して、上記と同様にろ液を回収する。
5. 濃縮液を回収(または、適切なバッファーを用いて再懸濁して回収)し、新しいチューブに移して保存する。



## 5) 培養上清中のモノクローナル抗体の濃縮/精製

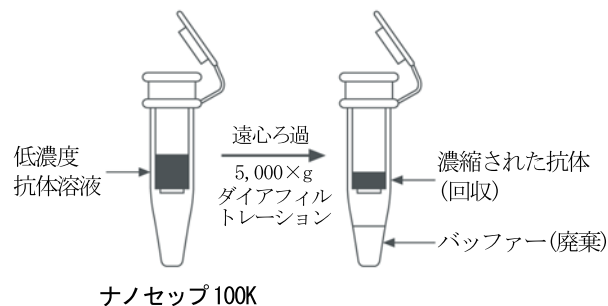
培養上清中のモノクローナル抗体濃度は、一般的に低濃度すぎ、*in vitro* および *in vivo* の免疫学的手法にそのまま使用することができません。高濃度モノクローナル抗体溶液は、ハイブリドーマ細胞内液を濃縮/精製して得ることができます。しかし、ハイブリドーマ細胞から内液を濃縮/回収する作業は、複雑で時間がかかります。また、濃縮した抗体溶液は、使用前に精製する必要があります。

限外ろ過では、細胞上清からモノクローナル抗体を手早く精製しながら、直接濃縮/回収することが可能です。MWCO 100K のオメガメンブレンで、細胞培養用の培地中に存在する血清アルブミンや低分子量タンパク質を除去すると同時に抗体の濃縮も行えます。

### 操作手順

1. 培養上清の 0.5 mL (100K のナノセップ遠心ろ過デバイス)、3 mL (100K のマイクロセップ遠心ろ過デバイス) あるいは 15 mL (100K のマクロセップ遠心ろ過デバイス) を、各遠心ろ過デバイスに入れる。
2. 5,000×g で 30 分間遠心ろ過する。
3. リザーバーから濃縮液をピペットで採取してモノクローナル抗体を回収する。

オプション：不連続のダイアフィルトレーションを行うために、濃縮液を 3 mL (マイクロセップ) か、12 mL (マクロセップ) に戻すのに十分な量のバッファーを加え、再度遠心ろ過する。通常は、2 回の希釈/濃縮の繰り返しで 99% 以上の塩と、90% 以上の低分子量の混入物が除去できる。さらに高い純度を希望する場合は、希釈/濃縮操作の 3 回目も行う。しかし、繰り返しのダイアフィルトレーションは、トータルでの回収率を減少させる。したがって、純度と回収率の検討をしておく必要がある。



## 6) 分析用途向け除タンパク質試料の調製

ペプチドや低分子量の生理活性物質は、HPLC、GC、GC/MSなどのさまざまな技術を使用して、複雑な生体試料から分析/精製されます。

限外ろ過は、低分子物質の分析を妨害するようなタンパク質を、分析前に除去するのに迅速で効果的な方法です(表 6 参照)。

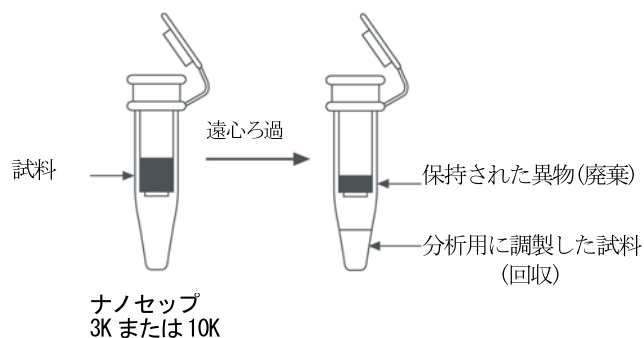
表 6  
分析用途での除タンパク質

ナノセップの 分画分子量 (MWCO)	シトクロム C (12.5 kD)		BSA (67 kD)	
	3K	10K	3K	10K
ろ液中のタン パク質濃度 (%)	< 1%	6.5%	0	0

1.0 mg/mL のタンパク質試料の PBS 溶液 500  $\mu$ L を 14,000 $\times$ g で遠心ろ過した。ろ液試料(50  $\mu$ L)を、TOSOHAAS, TSK-GEL G3000WXL, 10  $\mu$ m, 1,000 $\times$ 6.0 mm HPLC カラムを用いて、280 nm で検出して分析した。

### 操作手順

1. 除去するタンパク質の大きさに合わせて、MWCO が 3K か 10K のナノセップ遠心ろ過デバイスを選択する。
2. 可能であれば試料を 500  $\mu$ L に希釈する。(この操作で膜の目詰まりを最小限に抑えられるが、より少ない容量でも使用できる。)
3. 希釈した試料を上部のリザーバーに入れる。
4. ナノセップ遠心ろ過デバイスを 5,000~14,000 $\times$ g で最大30分間遠心ろ過する。
5. 下部のレシーバーから除タンパク質したろ液を採取する。この試料は、即分析に使用できる。
6. 必要であれば、濃縮された残存タンパク質溶液をリザーバーから回収して使用できる。



## 7) ポリアクリルアミドゲルからの迅速で効率的なタンパク質の溶出

ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)は分析用と試料調製の両方に広く使われています。タンパク質を電界中でその大きさ、形、荷電に応じて分離します。最近の二次元電気泳動における進歩はプロテオミクス及びその応用である生体臨床医学、バイオテクノロジー、製薬分野に大変革をもたらしました。複雑なタンパク質検体をまず二次元電気泳動で分離し染色してからスキャンする事によってタンパク質の表現量とマッピングの詳細な測定が可能になります。タンパク質についてさらに情報が必要な場合、ポリアクリルアミドゲルから特定のタンパク質を溶出させ質量分析やHPLC、アミノ酸配列分析、構造解析及び組み替え後分析等の分析を行うことが出来ます。

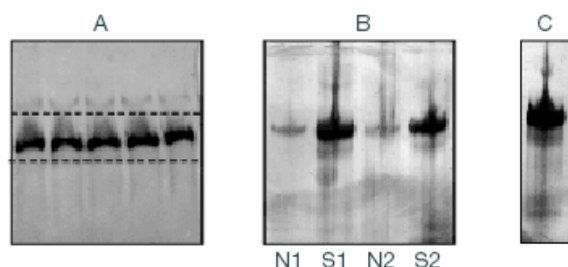
ナノセップ遠心ろ過デバイスは、ポリアクリルアミドゲルから特定のタンパク質を溶出、濃縮を行うために通常行われている方法よりも低コストで迅速な手段を提供します。ナノセップ遠心ろ過デバイスは迅速で効率的なポリアクリルアミドゲルからのタンパク質の溶出を可能にしますが、ポリアクリルアミドゲルの量が回収率に大きく影響します。ポリアクリルアミドの量を減らすことが溶出されるタンパク質の回収率を上げるだけでなく、遠心時間を短縮させることから、タンパク質を溶出させる場合、考慮すべき因子となります。

### 操作手順

1. 染色されたタンパク質のバンド又はスポットを確認する。
2. 染色された固まり又はバンドを清潔な刃物で切り取る。切り取ったゲルをさらに細かく切り分ける。
3. 切り取ったゲルをナノセップ MF 遠心ろ過デバイスに入れる。
4. 溶出バッファー (50  $\mu$ L又はそれ以下) を直接マイクロチューブに加えボルテックスミキサーで攪拌する。
5. 14000 $\times$ gで2分間遠心する。溶出タンパク質を含んだろ液を回収する。
6. タンパク質の回収率を最大にするため、残査にさらに20  $\mu$ Lの溶出バッファーを加え、ボルテックスと遠心を繰り返す。
7. 適切なMWCOのナノセップ遠心ろ過デバイスを使用してタンパク質の濃縮を行うことができる。

図 6

SDS 存在下および非存在下におけるポリアクリルアミドからの牛血清アルブミン (BSA) の溶出



BSA を SDS-PAGE にかけるマシーブルー-R-250 染色で検出した (図 A)。5つのレーンのタンパク質 (30  $\mu$ g) を 300K ナノセップ遠心ろ過デバイスを使って SDS 存在下と非存在下で溶出した。図 B は SDS の存在下 (S) および非存在下 (N) で行った 2つの連続した実験より溶出されたタンパク質 (1 および 2) で SDS-PAGE 後銀染色で検出した (表示しない)。6本のレーンに渡るゲル細片 (タンパク質 8  $\mu$ g) から SDS 存在下で限外ろ過処理を行った。

図 C は SDS-PAGE と銀染色後に溶出したタンパク質を示した。

# 核酸での応用

生化学的に見ると DNA はむしろ単純な分子で、タンパク質でのケースと異なり、化学的抽出法では似かよったサイズの DNA 分子同士を分離できません。

ゲル電気泳動法は、DNA 分子をそのサイズに基づき高分解能で分離します。分離された DNA 分子は、切断、ライゲート、塩基配列の解析、形質転換、電気泳動、標識化などが行われます。しかし、実験操作の途中で、脱塩、バッファー交換、アガロースゲルからの溶出などを行う必要があります。

アガロースゲルや合成反応溶液中の DNA 分子の精製や回収には、いくつかの方法があります。

## 1. 電気溶出

透析バッグや特殊な電気泳動装置を用いて、電気溶出法によりゲル切片から DNA を溶出させて捕集します。この方法は、通常、細心の注意が必要で、回収した DNA 試料の濃縮/脱塩操作を必要とします。

## 2. アフィニティークロマトグラフィー

DNA を吸着させるためにガラスビーズ、樹脂、グラスファイバー膜を使用し、洗浄後に溶出して回収します。この方法は、手間がかかり、DNA の切断原因となったり、ガラスビーズや、エタノール、塩類などを DNA 試料中に混入させてしまいます。

## 3. 沈殿

DNA と他のアルコール可溶性成分とを選択的に分離するために、両者の溶解特性の差を利用します。この方法は、低濃度 DNA 溶液からの回収率が低く、時間がかかる上、バッファー中に混入している不純物が共沈してしまふことがあります。また、試料ペレットを乾燥しすぎてしまうと、全く再溶解しないこともあります。

## 4. カラムクロマトグラフィー

ゲルろ過カラムを使用して、大きさによる分離を行います。この方法は、高い回収率を得るために通常キャリア tRNA の添加が必要となります。また、熟練した操作が必要な上、オリジナル試料の希釈が伴います。

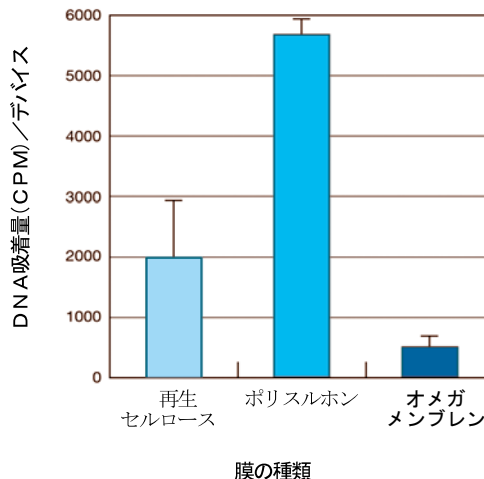
## 5. 限外ろ過/精密ろ過

ナノセップ遠心ろ過デバイスを使用して DNA の迅速な精製と濃縮が可能です。この方法は、操作が非常に簡単で、回収率が高く、DNA の吸着が少なく(図 7 参照)、DNA の損傷もありません。しかも、濃縮された DNA は混入物が少なく、次の反応に即使用できます。

一般的に DNA は長い直鎖状分子のため、DNA の分子量と MWCO とは必ずしも一致しません(表 2 参照)。

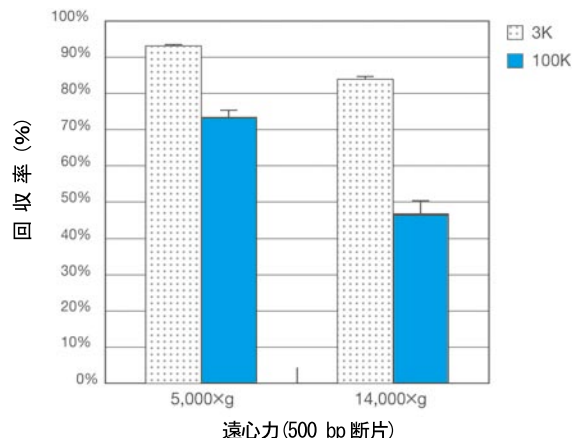
DNA 分子を限外ろ過膜で効率良く保持するには、遠心力を小さくする必要があります。さもなければ、DNA 分子は、サイズに関係なくさまざまな MWCO の膜を透過してしまいます(図 8 参照)。

図 7  
遠心ろ過デバイスへの DNA 吸着量の比較



<sup>32</sup>P で標識した PCR 産物(400 bp)を 50 ng/mL 含む 500  $\mu$ L の試料溶液を、100K のナノセップ遠心ろ過デバイスと他社製デバイスに入れ 5,000 $\times$ g で遠心ろ過した。保持された DNA は、40  $\mu$ L の TE(10 mM Tris, 1 mM EDTA, PH8)で回収した。デバイス中に吸着して残存している放射活性は、シンチレーションカウンターで計測した。1,000 CPM の測定値は、試料全体の約 1%の量に相当する。

図 8  
DNA 回収率への遠心力の影響



500 bp の二本鎖の DNA 断片を 100  $\mu$ g/mL 含む 500  $\mu$ L の試料溶液を、3K と 100K のナノセップ遠心ろ過デバイスで 5~25 分間遠心ろ過した。回収した試料濃縮液は、260 nm における吸光度で定量した。100K デバイスを高速回転(14,000 $\times$ g)した時に、500 bp 断片の損失に増加が認められた。

## 1) 標識反応後の未反応ヌクレオチドの除去

放射性標識した DNA の合成は、分子生物学の研究室で日常的に使用される操作法の一つです。この特異的な塩基配列を持つ標識 DNA 断片は、「プローブ」として使用され、膜上に固定化された相補的な DNA 配列とハイブリダイズしてオートラジオグラフィで検出されます。

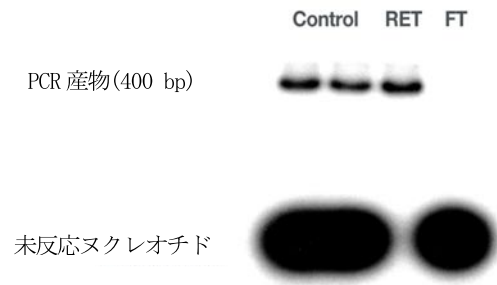
最近、生物学的なマーカーで標識して検出するさまざまな非放射性(non-RI)の検出法が開発されています。これらの方法では、酵素活性を標識に利用して、色や化学発光あるいは蛍光のシグナルを発生させます。

すべての標識法において目的分子は、反応バッファーと低分子基質との存在下で、標識分子の結合を触媒する酵素を使用して標識されます。標識効率は、通常 10%から 80%で、標識反応終了後も結合に使用されなかった標識分子が多量に残っています。

プロットのバックグラウンド・ノイズを減らすためや、次工程の反応で生じる問題を防ぐために、精製工程では一般的に、標識された DNA 溶液から反応バッファーの成分や結合に使用されずに残った標識分子を取り除く必要があります。

ナノセップ遠心ろ過デバイスは、標識された生成物をその反応系から迅速に分離/回収することができます(図 9 参照)。

図 9  
標識反応溶液中の未反応ヌクレオチドの除去



100 ng の pUC18、20 nM のプライマー、10 uCi の  $^{32}\text{P}$ -dCTP を添加した PCR Supermix (Life Technologies 社製) を用いて PCR 標識反応液を調製した。その結果、各反応で約 5% の  $^{32}\text{P}$ -dCTP が標識分子として有効に取り込まれ、400 bp の低比活性 PCR 産物が合成された。一方、95% のヌクレオチド ( $^{32}\text{P}$ -dCTP) は、未反応で残った。30K のナノセップ遠心ろ過デバイスを用いて、この PCR 標識反応液を 5,000×g で 15 分間遠心ろ過後、20  $\mu\text{L}$  の TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, PH8) で 2 回リンスして回収し、等量を 10% Tris ホウ酸ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。未反応ヌクレオチド=取り込まれなかった  $^{32}\text{P}$ -dCTP、Control=遠心ろ過前の PCR 標識反応液、RET=濃縮された PCR 標識反応液、FT=ろ液。明らかに 30K のナノセップ遠心ろ過デバイスで、貴重な 400 bp の PCR 産物を損失することなしに、多量の未反応ヌクレオチドを完全に除去することができた。

### 操作手順

1. 標識反応液を TE (10 mM Tris/1 mM EDTA, PH8) で 500  $\mu\text{L}$  に希釈する。
2. この希釈した試料を適切な MWCO (表 2 参照) のナノセップ遠心ろ過デバイスに移す。

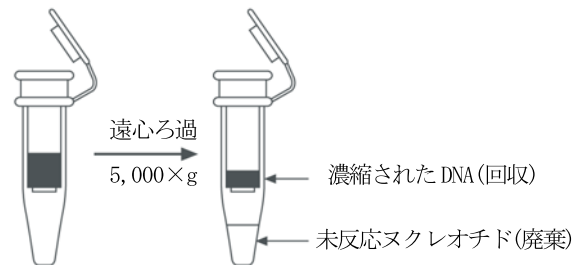
注意：一般的に、ランダムヘキサヌクレオチドプライマーで合成する標識反応(ランダムプライミング法)ではより小さく、かつ、より多くのサイズの DNA 断片が合成されるため 30K デバイスが適しています。

3. 5,000×g で 10~15 分間遠心ろ過する。遠心しすぎないように注意する。

オプション：低分子を確実に除去するために、100~400  $\mu\text{L}$  の TE で濃縮液を洗浄し、再度遠心ろ過する。

4. ピペットチップを用いて滅菌水または、TE でオメガメンブレン表面を洗浄しながらメンブレン表面に保持された DNA を回収する。20  $\mu\text{L}$  で 2 回洗浄すると最高の回収率が得られる。
5. 標識した分子の比活性は、濃縮液の放射活性を測定し、ろ液\*あるいはろ過前の試料の測定値と比較することで概算できる。

\*：別の MWCO が必要となった時のために、実験進行中はろ液を保存しておいてください。



## 2) 限外ろ過デバイスを使用したシングルチューブでの DNA 精製とクローニング

DNA フラグメントのサブクローニングやベクターとのシャトルリングのような古典的手法はクロモソーム、プラスミド、コスミド又は PCR 産物をベクター内に組み込む方法によって行われてきました。

脱塩、プライマー又はアダプターの除去、DNA フラグメントの濃縮などのために研究者はゲル電気泳動や沈殿操作を行いますが、それらは時間と手間のかかるものです。ナノセップ遠心ろ過デバイスは、PCR 生成フラグメントのサブクローニングにおいて、これまでの手法より効率化された迅速な操作を可能にします。

目的 DNA の効率的な精製のためのパラメーターの最適化後、制限酵素サイトを含むターミナルアダプターで PCR 産物が合成されます。これらのアダプターは切断され、ライゲーションのため最適な付着(粘着)末端を作ります。最終的な DNA 産物は濃縮され、脱塩されると同時にプライマー及びアダプター断片が 5 分間の遠心ステップの間に廃棄するろ液のほうに入るようにします。得られたライゲーション可能な DNA 断片は遠心ろ過デバイスの中で切断されたベクターの中に直接ライゲートされます。そして対象細胞にトランスフォームされます。ナノセップ遠心ろ過デバイスを用いることによって時間と労力及び試料の節約が図れます。

### 操作手順

#### PCR

1. PCR 反応を準備する (25  $\mu$ L)。MgCl<sub>2</sub> を添加し 0.2 mM のプライマーと 1  $\mu$ L の鋳型 DNA を使用する。
2. あらかじめ加熱したサーモサイクラーで 90°C 1 分間、PCR 反応をインキュベーションする。さらに以下の条件で 35 サイクル行う。94°C 30 秒、45°C 30 秒、72°C 60 秒、次にサイクル後の延長として 72°C 3 分間 (または各自使用の条件)
3. 各反応ごとに 5  $\mu$ L を分取し、電気泳動で生成物の大きさと純度を確認する。そしてそれに続くクローニングのための断片を定量する。

#### ナノセップ遠心ろ過デバイスによるサンプル精製

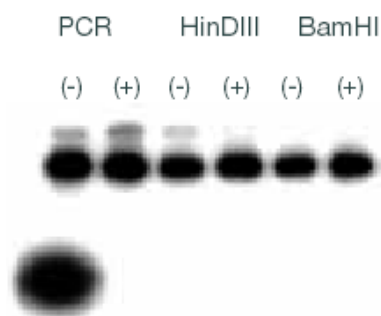
1. 0.1 から 1  $\mu$ g の PCR 産物と (一緒に試験管または別々の試験管で) 0.2  $\mu$ g のベクターを適切な制限酵素で切断する。反応は 100K のナノセップ遠心ろ過デバイス中で直接 37°C 2 時間行う。
2. 95°C 5 分間加熱で酵素を不活化する。
3. ナノセップ遠心ろ過デバイスを 1,500 $\times$ g で 5 分間遠心し、残渣を 50  $\mu$ L の滅菌水を加え 2 回洗浄する。
4. もしバッファーの適合性が合わないため連続して切断を行う場合、各酵素ごとにステップ 1 と 2 を繰り返す。
5. 8.5  $\mu$ L の滅菌水、1  $\mu$ L の 10 $\times$ ライゲーションバッファーに ATP を加えたものと 0.5  $\mu$ L リガーゼに再溶解する。ライゲーションは直接ナノセップ遠心ろ過デバイス中で 17°C 一晩かけて行う。
6. 別の試験管で切断を行っていた場合、ベクターを 8.5  $\mu$ L の滅菌水に再溶解し、ライゲーション反応のためインサ

ートの入ったチューブに移す。

#### トランスフォーメーション及び組換え解析

3  $\mu$ L のライゲーション産物を形質転換コンピテントセルに加える。標準的なトランスフォーメーション操作に従う。形質転換したものを選ぶために選択培地の入ったプレートにまく。

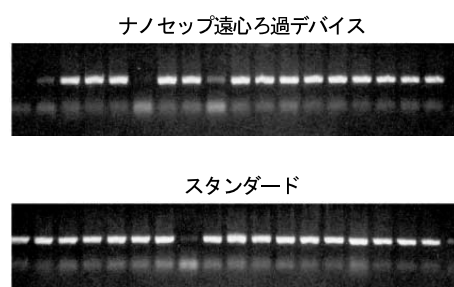
図 10  
制限酵素切断とその限外ろ過保持産物



Ceratopteris の phytochrome DNA を鋳型にしたクローン化断片から増幅された PCR 産物の放射活性のある希釈 (100 ng) を 100K のナノセップ遠心ろ過デバイスで繰り返し精製した。制限酵素切断産物は 1 番目が (Hind III) で 2 番目が (BamH I) によるもの。

(-) はナノセップによる濃縮前、(+) は濃縮ろ過後の回収物。バンドの強さは同じでほぼ 100% の回収率

図 11  
個々の組換えコロニーからの DNA 鋳型の増幅による PCR 産物



アガロースゲル上で 620 bp のバンドを可視化したもの。ベクター中に増幅した遺伝子断片を組み込むことに成功したことを示す。620 bp のバンドがかけているものは組換えが成功しなかった物を表す。従来のクローニング手順をコントロールとして使用した。



### 3) 制限酵素分解用 DNA 試料の精製/バッファー交換

効果的に酵素分解や修飾を行うためには、DNA 試料に混入したフェノール、クロロホルム、アルコール、EDTA、界面活性剤、薬剤(DNA 研究でよく使われるアクチノマイシンやディスタマイシンなど)、過剰の塩類などを除去する必要があります。これらの物質はすべて、エンドヌクレアーゼ活性を阻害し、部分的な分解の原因になったり、特異性を狂わせたりします(star activity: 偽塩基配列切断活性)。

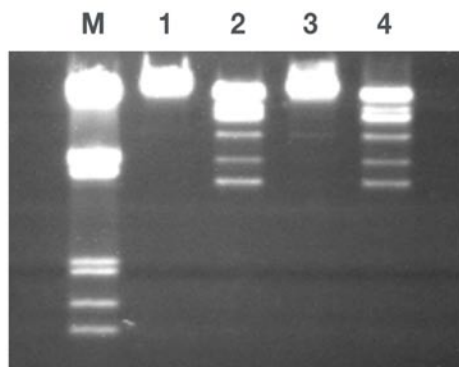
通常使われるプロトコールでは、DNA 試料の制限酵素による分解前に、透析あるいはエタノール沈殿とその後の洗浄・乾燥処置の実施を推奨しています。

2 種類以上の酵素を用いて基質である DNA の分解を行う場合に、それぞれの酵素のバッファーに対する要求性を満たすために、通常、異なるバッファーの使用が必要となります(図 12 参照)。

不連続のダイアフィルトレーション(一連の濃縮と希釈操作)で、DNA 試料から低分子量の混入物や塩類を容易、かつ効果的に除去することができます。

このプロトコールは一連の制限酵素による分解用に作成してありますが、この基本的な脱塩やバッファー交換のプロトコールは、別の用途に適合するように修正して使用することもできます。

図 12  
バッファーによる酵素活性の比較



制限酵素 Nru I は、最適活性を得るために特別なバッファーを必要とする。レーン M=サイズマーカー( $\lambda$ ファージ DNA の EcoR I と Hind III 分解物)、レーン 1= $\lambda$ ファージ DNA の NEBuffer 1 中での Nru I 分解物(ネガティブコントロール)、レーン 2= $\lambda$ ファージ DNA の NEBuffer Nru I 中での Nru I 分解物(ポジティブコントロール)、レーン 3= $\lambda$ ファージ DNA の NEBuffer 1 中での Nru I 分解物、レーン 4=レーン 3 と同じ DNA 試料のバッファーを 100K のナノセップデバイスを用いて NEBuffer Nru I に交換し、Nru I で分解。最適なバッファーに交換することで、確実に Nru I 活性を回復することができた。

#### 操作手順

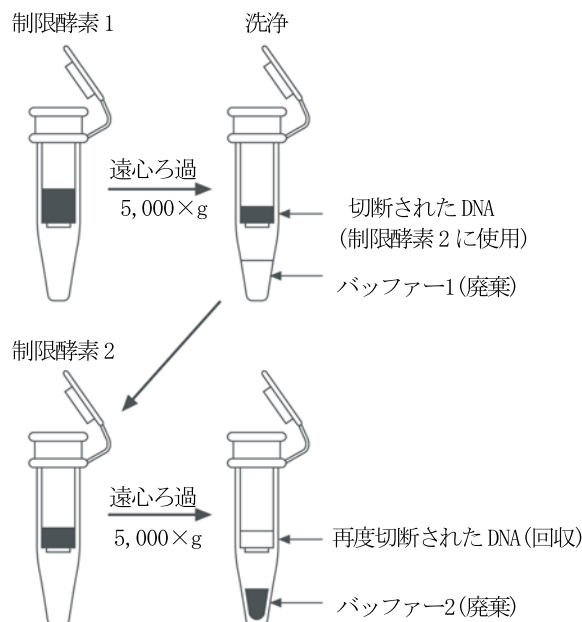
1. 適切な MWCO のナノセップ遠心ろ過デバイスを選択する(表 2 参照)。

注意: 溶液中の溶質濃度の増加により、DNA の透過が減少します。この場合には、より大きな MWCO のデバイスが必要となります。

2. 最初の制限酵素で分解した DNA 試料(2 番目の制限酵素による分解に使用)を適切な濃度(1×)のバッファーで 500  $\mu$ L に希釈する。
3. 5,000×g で 5 分間(100K の場合)から 30 分間(3K の場合)遠心ろ過する。

オプション: 不連続のダイアフィルトレーションを行うために、濃縮液を 500  $\mu$ L に戻すのに十分な量のバッファーを加え、再度遠心ろ過する。通常は、2 回の希釈/濃縮の繰り返しで 99%以上の塩と、90%以上の低分子量の混入物が除去できる。さらに高い純度を希望する場合は、希釈/濃縮操作の 3 回目も行う。しかし、繰り返しのダイアフィルトレーションは、トータルでの回収率を減少させる。したがって、純度と回収率の検討をしておく必要がある。

4. 適切な濃度の制限酵素用バッファーに再懸濁し、2 番目の制限酵素を加え、各制限酵素メーカーの指示に従って分解を行う。(手順 3 を繰り返し)、少なくとも 20  $\mu$ L の滅菌水あるいはバッファーで「2 度切断された DNA 断片」を回収する。



バッファー交換

#### 4) アガロースゲル中の DNA 断片の回収と精製

電気泳動で分離した DNA 断片を、アガロースゲルのマトリックス中から回収して精製する多くの方法が開発されています。これらの方法を用い、電気泳動で特異的に分離した目的 DNA 断片を回収して分析やクローニング操作に使用できます。

ゲル切片中の目的 DNA 断片の回収と精製は、次の 2 ステップの簡単な操作で行えます。

1. 目的 DNA 断片をアガロースゲルの混濁液から溶出して回収します。アガロースゲルのマトリックスは、ナノセップ MF 遠心ろ過デバイス (0.2  $\mu\text{m}$  か 0.45  $\mu\text{m}$  のバイオイナートメンブレンを内蔵) で保持され、目的 DNA 断片を含むゲルバッファは、自由に透過します。
2. 目的 DNA 断片は保持して、混入物は透過する MWCO を内蔵したナノセップ遠心ろ過デバイス (表 2 参照) を使用して、目的 DNA 断片を濃縮精製します。この方法は、基本的な沈殿法や透析法よりも迅速で信頼性も良好です (図 13 参照)。

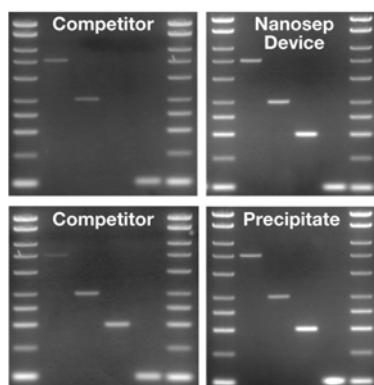
図 13  
アガロースゲル中の DNA 断片の回収

ゲル切片

↓  
柔軟化

↓  
MF での溶出

↓  
UF での濃縮/回収



0.8%アガロース TAE (Tris-acetate, EDTA) 分離ゲルに総 DNA 量で 4  $\mu\text{g}$  の市販 1 Kb ラダー (Life Technologies 社) をのせ、電気泳動を行った (データなし)。分子量の異なる 4 つのバンドのゲル切片を切り出し、冷凍後バッファに浸して柔らかくし、0.2  $\mu\text{m}$  のバイオイナートメンブレンデバイスを使用して遠心ろ過した。DNA を含むろ液を希釈して 4 等分 (400  $\mu\text{L}$   $\times$  4 の画分) した。この画分の一つを、1/10 容量の酢酸ナトリウムと 2 倍量のエタノールを使用して沈殿させ、 $-20^{\circ}\text{C}$  で 2 時間インキュベートし、高速で 30 分間遠心分離して、乾燥後 20  $\mu\text{L}$  の TE で再溶解した。他の画分は、100K のナノセップ遠心ろ過デバイス (10 分間) と他社製 100K デバイス (20 分間) で遠心ろ過し、20  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{L}$  で 2 回リンス) の TE で回収した。各試料を 0.8%アガロース TAE ゲルで、1  $\mu\text{g}$  の 1 Kb ラダーのマーカーレーンと共に電気泳動した。バンドのシグナル強度が同一であれば、約 100% の回収率を示す。

ポール社の検討では、100K のナノセップ遠心ろ過デバイスでの DNA 回収率は、バンドの強度から算出すると 90% 以上でした (4 つの異なる分子量のバンドは、別々の実験を表しています)。

沈殿法による DNA のバンドもまた高い回収率でしたが、限外ろ過処理した試料では見られないゲルバッファが混入してしまいました。

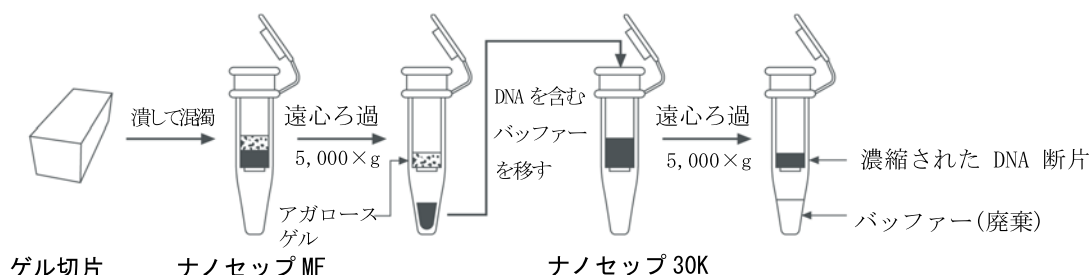
他社製デバイスで回収された DNA は、信頼性に欠け、回収率も 0~80% と劣っていました。

#### 操作手順

1. トランスイルミネーターからの UV 焼けを防ぐために、手袋、実験着、UV 用防護マスクを着用する。
2. 試料中の DNA の損傷を防ぐために、トランスイルミネーター上のゲルへの UV 照射を最小にする。
3. 目的 DNA 断片のバンドを切り出した後、余分なアガロースゲルを取り除く。 $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結 (最高の回収率を得るためのオプション) し、ピペットチップ (ゲルが中に入らないように、予めチップの先端を加熱して溶解しておく) を使用してアガロースゲル切片を潰して混濁する。
4. このアガロースゲル混濁液をナノセップ MF 遠心ろ過デバイス (0.45  $\mu\text{m}$  または、0.2  $\mu\text{m}$ ) に最大 400  $\mu\text{L}$  まで入れ、5,000  $\times$  g で 5 分間遠心ろ過する。
5. ろ液をチューブの底から回収し、 $65^{\circ}\text{C}$  で 5 分間加熱して、電気泳動中あるいはゲルの取り扱い中に混入した DNase を失活させる。
6. 上記のろ液を適切な MWCO (表 2 参照) のデバイスに移し、5,000  $\times$  g で 10~15 分間遠心ろ過する。遠心速度が高いと DNA の回収率を悪化させる。

**オプション: 確実に低分子物質を除去するために、濃縮液を 100~400  $\mu\text{L}$  の TE (10 mM Tris/1 mM EDTA, PH8) で洗浄し、再度遠心ろ過する。**

7. ピペットチップで濃縮試料溶液を回収する。回収率を最大に上げるために、濃縮カップを 10~20  $\mu\text{L}$  の TE あるいは滅菌水で 2 回洗浄する。5 kb 以上の大きな DNA 断片が切断されるのを防ぐために、大きな穴のピペットチップを使用する。

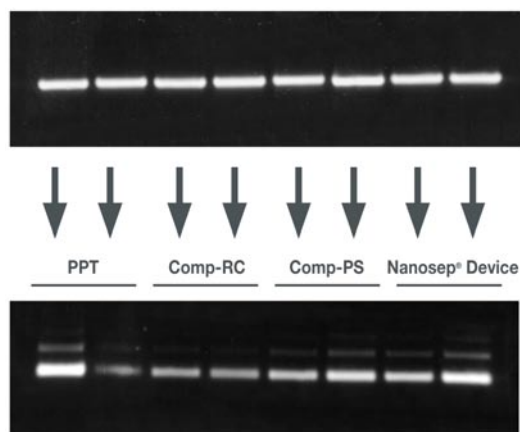


## 5) 酵素分解アガロースゲル中の DNA 断片の回収と精製

最近、アガロースゲル切片から DNA を取り出す際に、アガロースを分解できる酵素が利用されています。しかし、DNA を溶液中に遊離できても、その溶液中には多くの可溶性不純物が残り、次工程の操作を妨害し、修飾過程も阻害します。

アガロース分解酵素で処理したアガロースは液状のため、限外ろ過膜を用いて低分子物質として透過させることができます。このため1回の遠心ろ過操作で、DNA を精製し、濃縮することができます(図 14 参照)。

図 14  
アガラーゼで処理したゲルからの DNA 断片の回収

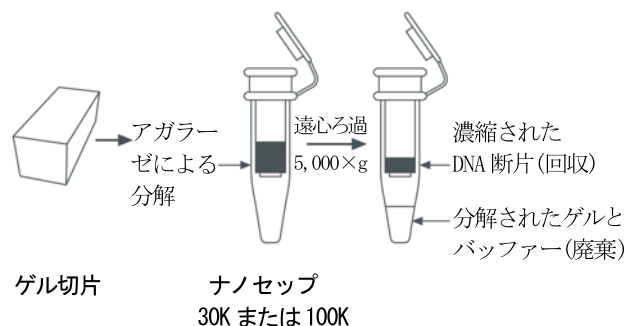


400 bp の PCR 産物を 8 等分し、それらを 1% 低融点アガロース TAE ゲルで電気泳動した。8 つの別々のバンドを切り出した後、メーカー (Life Technologies 社) の指示に従ってアガラーゼで処理した。アガラーゼ処理後、二つの試料についてはアガラーゼメーカーの指示どおり酢酸ナトリウムとエタノールで沈殿させた。他の 6 試料は、30K のナノセップ遠心ろ過デバイス (15 分間) と他社製遠心ろ過用 UF デバイス (30 分間) で遠心ろ過した。濃縮液は、30  $\mu\text{L}$  の TE で回収した。PPT=沈殿法、Comp-RC=他社製再生セルロース、Comp-PS=他社製ポリスルホン、Nanosep Device=高流束ポリエーテルスルホン。ナノセップ遠心ろ過デバイスは、沈殿法や他社製デバイスより優れた再現性と回収率を示した。

### 操作手順

1. トランスイルミネーターからの UV 焼けを防ぐために、手袋、実験着、UV 用防護マスクを着用する。
2. 試料中の DNA の損傷を防ぐために、トランスイルミネーター上のゲルへの UV 照射を最小にする。
3. DNA 試料を低融点アガロースゲルで電気泳動する。
4. 目的 DNA 断片のバンドを切り出した後、余分なアガロースゲルを取り除く。低融点アガロースゲルの取り扱いには、通常のアガロースゲルよりも柔らかいので注意する。
5. アガラーゼ酵素の使用に当たっては各メーカーの指示に従い、分解が完了した後、TE (10 mM Tris/1 mM EDTA, pH8) あるいは滅菌水で 500  $\mu\text{L}$  に希釈する。
6. 酵素分解し希釈した DNA 試料を 30K あるいは 100K (表 2 参照) のナノセップ遠心ろ過デバイスに入れ、5,000  $\times g$  で 10~15 分間遠心ろ過する。
7. ピペットチップで濃縮された DNA 試料を回収する。回収率を最大に上げるために、濃縮カップを 10~20  $\mu\text{L}$  の TE あるいは滅菌水で 2 回洗浄する。オメガメンブレンに付着して残存している不溶性のゲルをピペットチップで吸い込まないように注意する。

オプション：低分子物質を確実に除去するためには、濃縮液を 100~400  $\mu\text{L}$  の TE で洗浄し、再度遠心ろ過して回収する。



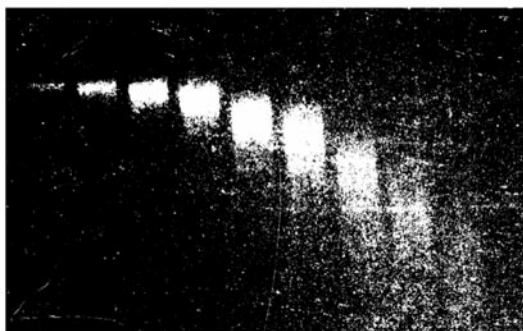
## 6) ショ糖密度勾配中の部分分解 DNA 断片の回収と精製

遺伝子ライブラリーの構築に使われる大きな DNA 断片の単離には、現在でもショ糖密度勾配を使用した DNA 断片混合液からの分離法が最良の方法と考えられています。適当な画分を分離後、ショ糖とバッファの混合液から DNA を精製します。

ライゲーションの前にショ糖を完全に除去するためには、ダイアフィルトレーションが必要になります。部分分解断片は、通常 1 kb 以上のため、100K のナノセップ遠心ろ過デバイス(500  $\mu$ L)に小分けする。量が多い場合には、より容量の大きい遠心ろ過デバイス(マイクロセップやマクロセップ)を使用する。

図 15  
ショ糖密度勾配分画からの DNA 断片の回収

ショ糖密度勾配分画



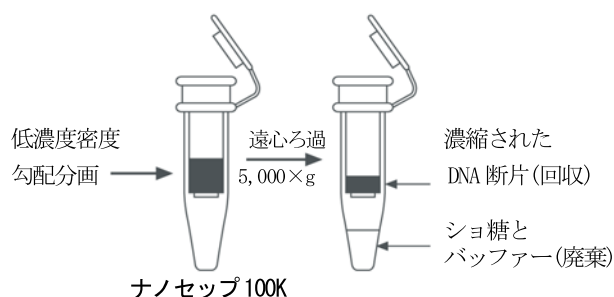
酵母ゲノム DNA の *Sau*BA による部分分解物を、ショ糖密度勾配で 56,000 rpm、18 時間遠心ろ過した。一連の 2 mL 画分を採取し、その 40  $\mu$ L を品質と分画サイズの範囲をチェックするために電気泳動した。画分 4 (矢印) は、100K デバイスを用いて 2 回ダイアフィルトレーションを実施した。この画分をコスミドベクターに組み込ませた結果、クロモソームウオーキング法により遺伝子を複製するために効果的に使用できる 10,000 クローンのサブゲノミック・ライブラリーが作成できた。

### 操作手順

1. 適当な画分を少なくとも同量の TE (10 mM Tris/1 mM EDTA, pH8) あるいは滅菌水で希釈する。
2. 希釈したそれぞれの画分を別々の 100K のナノセップ遠心ろ過デバイス (500  $\mu$ L) に小分けする。量が多い場合には、より容量の大きい遠心ろ過デバイス (マイクロセップやマクロセップ) を使用する。
3. 5,000  $\times$ g で 10 分間遠心ろ過する。ろ液は捨てる。

オプション: 不連続のダイアフィルトレーションを行うために、濃縮液を 500  $\mu$ L に戻すのに十分な量のバッファを加え、再度遠心ろ過する。通常は、2 回の希釈/濃縮の繰り返しで 99% 以上の塩と、90% 以上の低分子量の混入物が除去できる。さらに高い純度を希望する場合は、希釈/濃縮操作の 3 回目を行う。しかし、繰り返しのダイアフィルトレーションは、トータルでの回収率を減少させる。したがって、純度と回収率の検討をしておく必要がある。

4. ピペットチップで濃縮試料容器を回収する。回収率を最大に上げるために、濃縮カップを 10~20  $\mu$ L の TE あるいは滅菌水で 2 回洗浄する。大きな DNA 切片が切断されるのを防ぐために大きな穴のピペットチップを使用する。



## 7) ポリアクリルアミドゲル中のオリゴヌクレオチドの回収と精製

合成不十分な短い配列のオリゴヌクレオチドを合成完了したオリゴヌクレオチドから分離するためには、通常、ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動による精製が必要とされています。このため、ゲルから希望のバンドを切り出した後、ゲルマトリックスからオリゴヌクレオチドを回収して精製する必要があります。

「ゲルを潰して混濁 (Crush & Soak) する方法」は、安価で容易な上、モニタリングを必要としないことから、ポリアクリルアミドゲル中のオリゴヌクレオチドの溶出に有益な方法です。

ナノセップ MF 遠心ろ過デバイスでこのゲル残渣を除去した後、3K のナノセップ遠心ろ過デバイスを用いた限外ろ過で、オリゴヌクレオチドの効果的で高効率な回収、精製、濃縮、脱塩が行えます。

### 操作手順

1. ポリアクリルアミドゲルでオリゴヌクレオチドを電気泳動する。25 塩基以下のオリゴヌクレオチド用には 20% アクリルアミド/8M 尿素ゲルを、25~60 塩基のオリゴヌクレオチド用には 15% アクリルアミド/8 M 尿素ゲルを、60~100 塩基のオリゴヌクレオチド用には 12% アクリルアミド/8 M 尿素ゲルを使用する。
2. オリゴヌクレオチドのバンドをオートラジオグラフィー (RI 標識をしている場合) で視覚化して確認する。RI 標識していない場合は、ゲルを蛍光用 TLC プレートの上に載せ、短波長の UV を照射し、バンドが UV を遮ることによる蛍光の消失 (クエンチング) を観察する方法で確認する。
3. オリゴヌクレオチドのそれぞれのバンドを新しいカミソリの刃で切り出す。
4. ゲル切片を微量遠心チューブに入れ、専用の乳棒で細かくすり潰す。0.5 mL の抽出用バッファーを入れ、ボレテックスミキサーで攪拌する。このゲル混濁液を 37°C で 2 時間または、室温で一晩インキュベートする。

### 抽出用バッファーの組成：

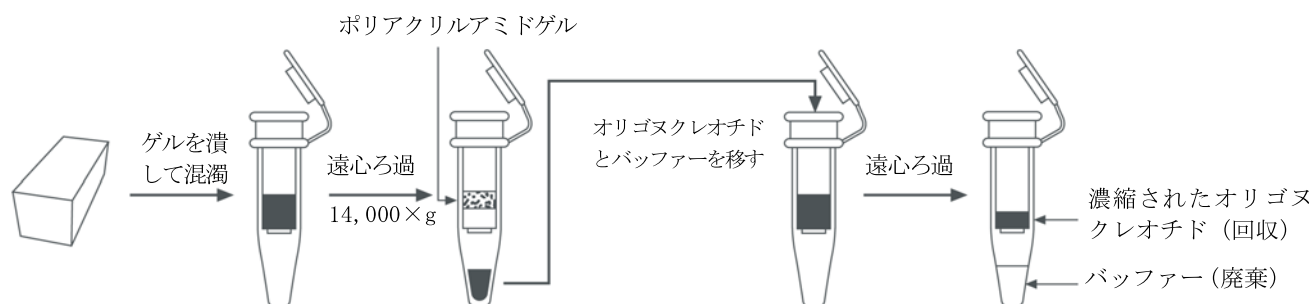
- 滅菌水
- 0.5 M NaCl, 2 M トリエチルアンモニウムアセテート
- 50 mM トリエチルアンモニウムアセテート
- 0.5 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (PH7.0), 1 mM EDTA

5. アクリルアミドのかげらを除去するために、このゲル混濁液をナノセップ MF 遠心ろ過デバイスに移し、14,000×g で 10 分間遠心ろ過する。上部チャンバー (リザーバー) を 50 μL の TE (10 mM Tris/1 mM EDTA, PH8) で洗浄し、再度遠心ろ過する。
6. オリゴヌクレオチドを濃縮すると同時に、溶解した尿素や塩類を除去するために、ろ液を 3K のナノセップ遠心ろ過デバイスに移し、5,000×g で遠心ろ過する。

注意：30 bp より大きいオリゴヌクレオチドの場合には、14,000×g で遠心ろ過できます。

オプション：不連続のダイアフィルトレーションを行うために、濃縮液を 500 μL に戻すのに十分な量のバッファーを加え、再度遠心ろ過する。通常は、2 回の希釈/濃縮の繰り返しで 99% 以上の塩と、90% 以上の低分子量の混入物が除去できる。さらに高い純度を希望する場合は、希釈/濃縮操作の 3 回目も行う。しかし、繰り返しのダイアフィルトレーションは、トータルでの回収率を減少させる。したがって、純度と回収率の検討をしておく必要がある。

7. ピペットチップで濃縮試料溶液を回収する。回収率を最大に上げるために、濃縮カップを 10~20 μL の TE あるいは滅菌水で 2 回洗浄する。



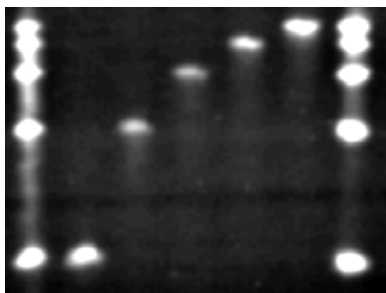
## 8) ポリアクリルアミドゲル中の mRNA 転写物の回収と精製

電気泳動したポリアクリルアミドゲル中の合成 mRNA 転写物の精製が、多くのアプリケーションで必要とされます。これは、次工程の用途で干渉する可能性のある短い、または不完全な転写物を除去するために一般的に行われます。

合成 mRNA 転写物のバンドを同定し、そのバンドのゲル切片を切り出した後、そのゲルマトリックスから mRNA 転写物を回収します。

この際、「ゲルを潰して混濁(Crush & Soak)する方法」が、安価で簡単な上、高価なモニターを必要としないことから、mRNA の回収に広く使用されています。ナノセップ MF 遠心ろ過デバイスでこのゲル残渣を除去した後、10K のナノセップ遠心ろ過デバイスを用いた限外ろ過で、mRNA 転写物の効果的に高収率な回収、精製、濃縮、脱塩が行えます(図 16 参照)。

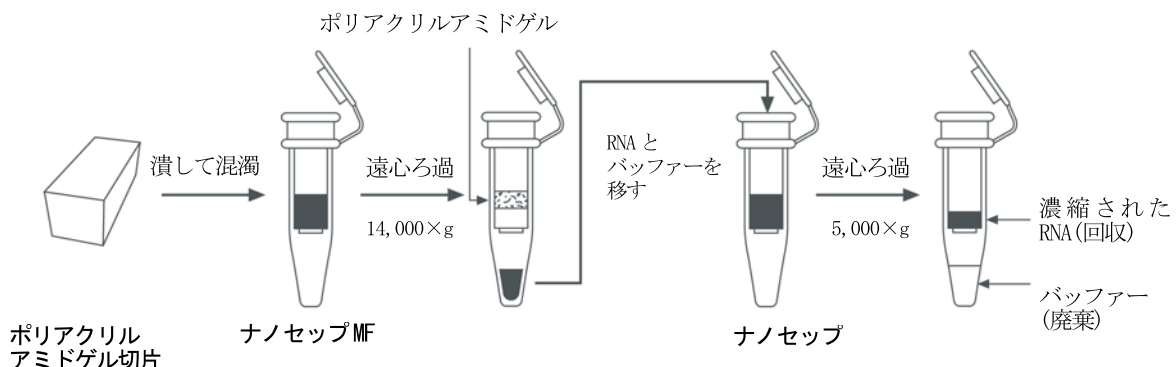
図 16  
ポリアクリルアミドゲルからの RNA の回収



Century Markers Templates (Ambion 社) のインビトロ・トランスクリプションで調製した RNA Century Marker を、6% TBE (Tris-borate, EDTA)-尿素ゲルで電気泳動した。100~500 塩基の RNA 断片を含むゲルバンドを切り出し、微量遠心チューブ用乳棒で潰して柔軟化して抽出用バッファーに混濁した。37°C で 2 時間インキュベート後、各混濁液を 0.2 μm のナノセップ MF 遠心ろ過デバイスに移し、14,000×g で遠心ろ過した。各ろ液を 10K のナノセップ遠心ろ過デバイスに移し、5,000×g で 15 分間遠心して、TE バッファーでダイアフィルトレーションを行った。脱塩した濃縮液を 20 μL の TE バッファーに回収し、6% TBE-尿素ゲルでそれぞれの RNA マーカーと共に電気泳動した。同等のバンド強度は、ほぼ 100% の回収率を示すが、結果は 50~90% の範囲であった。RNase 活性によるスメアーは、検出されなかった。

### 操作手順

1. 合成 mRNA 転写物を 5% ポリアクリルアミド/8 M 尿素ポリアクリルアミドゲルで電気泳動する。
2. エチジウムブロマイドでゲルを染色して mRNA のバンドを確認する。RI 標識した mRNA の場合は、X 線フィルムにゲルを短時間露光して確認する。(オートラジオグラムは、露光しすぎないように注意する。バンドの幅が細ければ、目的 mRNA をより正確に切り取ることができる。)
3. RNA のバンドを切り出したゲル切片を、通常の 1.5 mL の微量遠心チューブに入れる。
4. 専用の微量遠心チューブ用乳棒で切り出したゲル切片を崩し、500 μL の抽出バッファー (0.5 M 酢酸アンモニウム、2 mM EDTA、0.1% SDS) を加える。
5. 攪拌し、転写物の大きさにより 2 時間から一晩、37°C でインキュベートする。小さな転写物 (200 ヌクレオチド以下) の場合には、約 2 時間で溶出する。より大きな転写物であれば、それだけ長いインキュベート時間を要する。
6. このゲル混濁液をナノセップ MF 遠心ろ過デバイスに移す。ポリアクリルアミドゲルのマトリックスを除去するために 14,000×g で 10 分間遠心ろ過する。mRNA を含むろ液を採取する。
7. 適切な分画分子量のナノセップ 遠心ろ過デバイスを用いてこのろ液を 5,000×g で遠心ろ過することで、mRNA の濃縮が行える。50 塩基よりも小さな分子は 3K ナノセップ 遠心ろ過デバイスを、50~500 塩基では 10K ナノセップ 遠心ろ過デバイスを、500~1,000 塩基では 30K ナノセップ 遠心ろ過デバイスを、1,000 塩基以上の場合は 100K ナノセップ 遠心ろ過デバイスを使用する。
8. 脱塩を行うために、500 μL の滅菌水あるいはバッファーを上部のリザーバーに加え、再度遠心ろ過する (ダイアフィルトレーション)。必要であればこの希釈/濃縮操作を繰り返す。



# PCR 反応の前後処理

現在、DNA 塩基配列の解析に使用されている最も強力な革新的な手法の一つは、DNA の複製と言うユニークな生化学反応に基づいており、PCR (Polymerase Chain Reaction) と呼ばれています。

この強力な技術により、相補的な塩基配列を持つプライマーを用いて、ごくわずかの DNA 分子しか含まれていない試料から、特定の DNA 塩基配列を「増幅」させることが可能となりました。

しかし、PCR 法にも問題がないわけではありません。PCR 法の極端に高い感度は、誤ったプライマーの使用や別の DNA の汚染により、間違っただ分子の増幅をもたらす可能性を増大させてしまいます。

不純物から発生する目的以外の生成物の増幅を防止する方法の一つは、厳重に管理された環境下で作業を行い、反応前に試薬やプライマーを精製することです。しかし、たとえ管理された環境であっても、試料自体に PCR 反応を妨害したり誤ったプライミングの原因となるような成分を含む可能性があります。

**PCR を行う前にナノセツプ遠心ろ過デバイスを使用して、それらの成分を取り除くことで、確実に正しい結果を得ることができます。**

PCR 反応終了後、新たに増幅された DNA 断片 (PCR 断片) を次工程で使用できるように、バッファー (プライマーと未反応ヌクレオチドとの混合液) とその DNA 断片とを分離する必要があります。

## 1) PCR 用生体試料の調製

テンプレート DNA (鋳型 DNA) を含む生体試料は、さまざまな供給源から入手されます。それらの供給源の多くに、PCR による増幅反応の正確さを欠いたり、機能を阻害する低分子物質が含まれています。

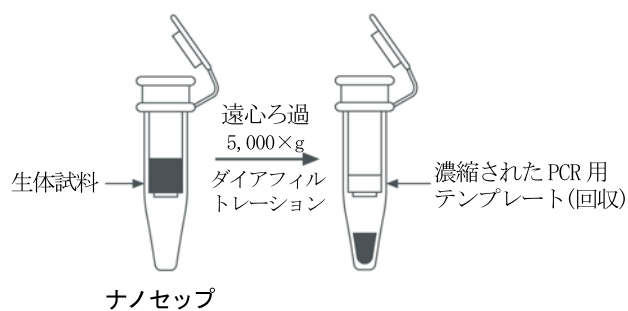
例えば、ヘパリンや EDTA (血液試料の保存に通常使用) は、PCR 反応を妨害します。限外ろ過によるテンプレート DNA の濃縮操作で、これらの低分子物質も除去できます。

### 操作手順

1. テンプレート DNA を含む試料を滅菌水または、TE (10mM Tris/1 mM EDTA, PH8) で 500  $\mu$ L に希釈し、適切なナノセツプ遠心ろ過デバイス (表 2 参照) に移す。
2. 5,000 $\times$ g で 10~30 分間遠心ろ過する。

オプション：不連続のダイアフィルトレーションを行うために、濃縮液を 500  $\mu$ L に戻すのに十分な量のバッファーを加え、再度遠心ろ過する。通常は、2 回の希釈/濃縮の繰り返しで 99% 以上の塩と、90% 以上の低分子量の混入物が除去できる。さらに高い純度を希望する場合は、希釈/濃縮操作ダイアフィルトレーションは、トータルでの回収率を減少させる。したがって、純度と回収率の検討をしておく必要がある。

3. ピペットチップで濃縮試料溶液を回収する。回収率を最大に上げるために、濃縮カップを 10~20  $\mu$ L の TE あるいは滅菌水で 2 回洗浄する。





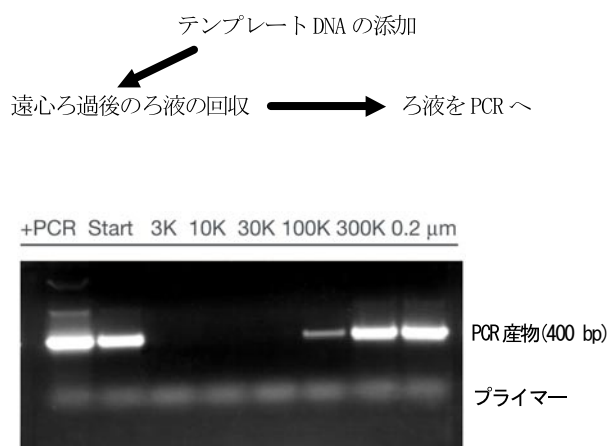
## 2) PCR 用試薬類の調製

PCR 法は極めて感度が高いために、ごくわずかな混入 DNA も増幅してしまいます。これは、古代の DNA 試料(考古学)や法廷でのヒトの DNA 試料(法医学)で特に問題となります。なぜならば、技術者の皮膚や毛髪細胞から汚染した一つの DNA 分子が、結果を無効にしてしまうからです。

ストック試薬溶液あるいはマスターミックス中の混入 DNA は、限外ろ過で除去できます。DNA の混入を確実に防止するために、最終的な合成用バッファーを PCR チューブに分注する前に、3K あるいは 10K のナノセップ遠心ろ過デバイスで遠心ろ過します(図 17 参照)。

注意：増幅した試料は、試薬の調製や PCR 反応を行う場所に持ち込まないでください。また、ピペットを使用する時には、必ず PCR 用のエアロゾル対応チップを使用してください。

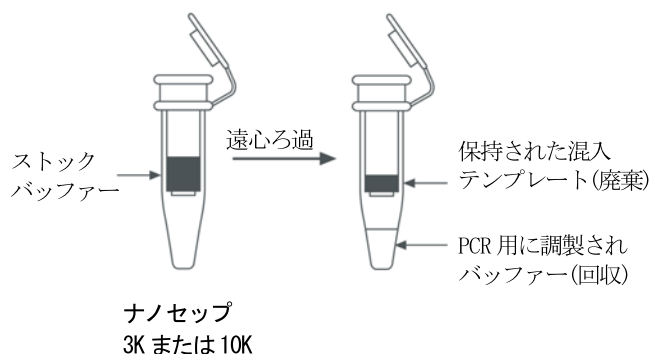
図 17  
PCR 向けストック溶液中のテンプレート DNA の除去



500 ng の pUC18 プラスミド(テンプレート DNA 試料)を溶解した TE 溶液を 200  $\mu\text{L}$  ずつ 7 等分に小分けした。一つをコントロール(Start, 33 ng/ $\mu\text{L}$ )とし、他の画分はそれぞれの MWCO のナノセップ遠心ろ過デバイスで遠心ろ過した。遠心ろ過後、各ろ液の 3  $\mu\text{L}$  を、PCR mix(Life Technologies 社)の 45  $\mu\text{L}$  と 20 nM の pUC18 に相補的なプライマー溶液の 2  $\mu\text{L}$  とを含む PCR 反応液に加えた。標準条件下で 25 サイクルの PCR 反応を行った。各反応液の 25  $\mu\text{L}$  を電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。3K、10K、30K のナノセップ遠心ろ過デバイスのろ液中には、PCR 産物(400 bp)が全く検出されず、添加したテンプレート DNA を効果的に除去できることが示された。100K デバイスでのろ液は、弱い PCR 産物(400 bp)のバンドを示し、テンプレート DNA の一部がこのデバイスを透過してしまうことが示された。このテンプレート DNA は、0.2  $\mu\text{m}$  や 300K デバイスを自由に透過した。

## 操作手順

- 常に、新品が保管してある化学薬品を用いてストック用 PCR 試薬を調製する。調製中に新たな汚染物を入れないように注意する。
- PCR を行う場所から離れた場所で試薬を調製する。
- ストック試薬あるいはマスターミックス(プライマー、テンプレート、酵素を含まない)を、3K あるいは 10K のナノセップ遠心ろ過デバイス(表 2 参照)に入れ、遠心ろ過する。
- ろ液を滅菌済みのサンプリングチューブに移す。ストック試薬全量の汚染を避けるために、小分けしておくことを推奨する。
- 精度を高めるためには、PCR を開始する直前にマスターミックスあるいは市販のバッファー混合液を限外ろ過する



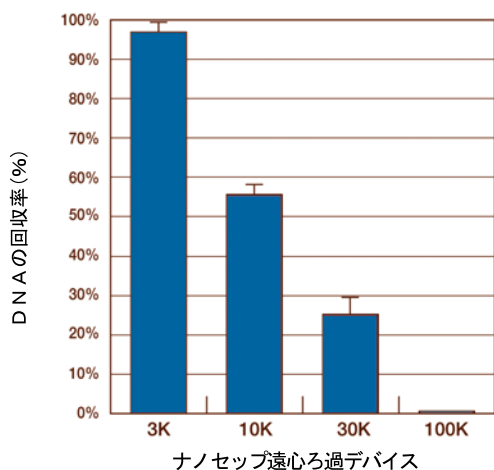
### 3) PCR 用プライマーの回収と精製

合成オリゴヌクレオチドは、DNA 配列の特異的な開始点から DNA 合成を開始するための「プライマー」として使用され、PCR 反応における重要な成分となります。

合成オリゴヌクレオチドは、化学的な方法で合成されます。したがって、合成後に、合成用の混合物溶液からフルサイズに合成されたオリゴヌクレオチドを単離するための回収と精製工程が必要となります。また、PCR に先立ち、合成、開裂、デプロテクション(脱保護)操作中に生じる残存副産物の除去にも脱塩操作が必要となります。

ナノセップ遠心ろ過デバイスを用いた限外ろ過で、合成オリゴヌクレオチドの効果的で高収率な回収、精製、濃縮、脱塩が行えます(図 18 参照)。

図 18  
25 bp のオリゴヌクレオチドの回収と精製



末端を RI 標識(エンドラベル)した 25 bp のオリゴヌクレオチド(プライマー)を 50 ng 含む 400  $\mu$ L の溶液を、MWCO の異なるデバイスを用いて遠心ろ過した(N=2)。各デバイスは、5,000 $\times$ g で 10 分間(100K, 30K, 10K)から 30 分間(3K)遠心ろ過した。濃縮液は 40  $\mu$ L の TE に再懸濁し、400  $\mu$ L に希釈して回収した。この RI 標識オリゴヌクレオチドを、シンチレーションカウンターで定量した。3K のナノセップ遠心ろ過デバイスは、RI 標識オリゴヌクレオチドの 90%以上を保持した。大きな分画分子量のデバイスを選択すると遠心ろ過時間を短縮できるが、回収率も低下した。また、すべてのプライマーを透過させたい場合には、100K デバイスが最適であることが示された。

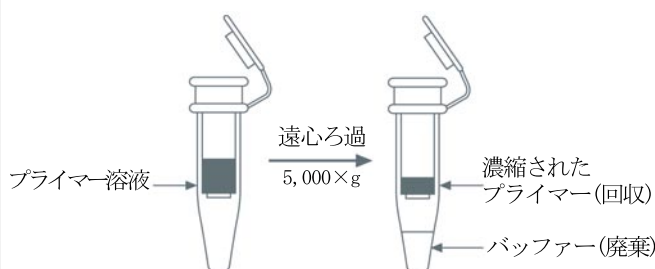
#### 操作手順

1. 50 塩基までのオリゴヌクレオチドに対しては、3K のナノセップ遠心ろ過デバイスを使用する。それ以上長いオリゴヌクレオチドに対しては、10K のナノセップ遠心ろ過デバイスを使用する。

2. オリゴヌクレオチド溶液をナノセップ遠心ろ過デバイスの濃縮カップに入れる。TE(10 mM Tris/1 mM EDTA, PH8)あるいは滅菌水で試料を 500  $\mu$ L に希釈する。

オプション：不連続のダイアフィルトレーションを行うために、濃縮液を 500  $\mu$ L に戻すのに十分な量のバッファーを加え、再度遠心ろ過する。通常は、2 回の希釈/濃縮の繰り返しで 99%以上の塩と、90%以上の低分子量の混入物が除去できる。さらに高い純度を希望する場合は、希釈/濃縮操作の 3 回目も行う。しかし、繰り返しのダイアフィルトレーションは、トータルでの回収率を減少させる。したがって、品質と回収率の検討をしておく必要がある。

3. ピペットチップで濃縮試料溶液を回収する。回収率を最大に上げるために、濃縮カップを 10~20  $\mu$ L の TE あるいは滅菌水で 2 回洗浄する。



ナノセップ  
3K または 10K

#### 4) PCR 産物の回収と精製

最終的な PCR 反応液には、さまざまな分子生物学的用途に使用できる  $\mu\text{g}$  レベルの増幅 DNA が含まれています。それらの用途には、PCR 反応液の残りの成分に対して、感受性が高い場合もあれば、低い場合もあります。ある制限酵素や、特に DNA リガーゼは、DNA 試料中の混入物の存在に非常に敏感です。PCR 反応液には、種々の塩類、未反応ヌクレオチド、グリセリン、タンパク質、プライマー等が含まれているため、多くの次工程の用途では、PCR 産物に数種類の精製を実施する必要があります。

バッファー成分、未反応ヌクレオチド、プライマー等からの PCR 産物の回収と精製には、さまざまな方法が実施できます。

##### 1. 沈殿法

化学的な溶解特性を利用して選択的に DNA を分離します。PCR 産物の精製に、この方法を用いる際の根本的な欠点として、時間がかかることと、バッファー成分と混入物とがいつしよに沈殿(共沈)してしまうことによる不完全な除去が挙げられます。

##### 2. クロマトグラフィー

分子ふるいゲルやガラスへのアフィニティーを利用して、PCR 混合溶液中の各成分から DNA を精製します。この技術は高価であり、一般的に特別な操作が必要である上、試料をカラム溶出の後に濃縮する必要があります。

##### 3. 限外ろ過

サイズで分ける遠心ろ過デバイスを使用して PCR 産物の単離や濃縮が行えます(図 19 参照)。迅速で、手間がかからない上、回収率も高く、DNA の損傷もないため、濃縮された DNA はその後の反応を阻害する不純物を含みません(図 20 参照)。

図 19  
PCR 産物の回収と精製



末端を  $^{32}\text{P}$  標識(エンドラベル)したプライマーを含む PCR reaction mix (Life Technologies 社)に、 $^{32}\text{P}$  標識した少量の dCTP を加えた。PCR 反応は、標準的な条件下で 30 サイクル行った。10 試料の反応液を混合し、100  $\mu\text{L}$  に小分けした後 500  $\mu\text{L}$  に希釈し、各 MWCO のデバイ스로遠心ろ過した。濃縮液を 20  $\mu\text{L}$  の TE で回収し、10% ポリアクリルアミド/トリス-ホウ酸ゲルで電気泳動後、オートラジオグラフィーで分析した。PCR 産物(400 bp)の保持とプライマーおよび未反応ヌクレオチド除去の完全性に関し、100K のナノセップ遠心ろ過デバイスが最良の組み合わせを示した。目的がプライマーの除去ではなく、確実にバッファー成分と未反応ヌクレオチドを除去することである場合には、30K あるいは 10K のナノセップ遠心ろ過デバイスで PCR 産物を保持しながら、それらを除去できる。また、PCR 産物が 200 bp 以下で、プライマーの存在がその後の用途を阻害しない場合には、3K か 10K のナノセップ遠心ろ過デバイス(表 2 参照)をその PCR 産物の精製に使用できる。

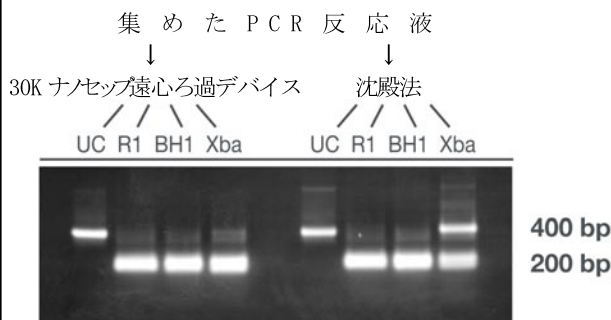
#### 操作手順

1. 次工程で支障をきたさないように、オイルやワックスはピペットで吸い取らないように注意する。(試料を  $-70^{\circ}\text{C}$  で凍らせた後、表面の液層を取り除いてオイルを除去する。あるいは、穴の小さなピペットチップを用いて、オイルの下から注意して試料を吸い取ることも採取できる。)
2. この PCR 反応液を滅菌水または TE (10 mM Tris/1 mM EDTA, PH8) で 500  $\mu\text{L}$  に希釈し、30K あるいは 100K のナノセップ遠心ろ過デバイス(表 2 参照)に移す。
3. 5,000  $\times g$  で 10 分間遠心ろ過を行う。(回転速度が高いと PCR 産物の損失が増加する。)

オプション：不連続のダイアフィルトレーションを行うために、濃縮液を 500  $\mu\text{L}$  に戻すのに十分な量のバッファーを加え、再度遠心ろ過する。通常は、2 回の希釈/濃縮の繰り返しで 99% 以上の塩と、90% 以上の低分子量の混入物が除去できる。さらに高い純度を希望する場合は、希釈/濃縮操作の 3 回目も行う。しかし、繰り返しのダイアフィルトレーションは、トータルでの回収率を減少させる。したがって、品質と回収率の検討をしておく必要がある。

4. ピペットチップで濃縮試料溶液を回収する。回収率を最大に上げるために、濃縮カップを 10~20  $\mu\text{L}$  の TE あるいは滅菌水で 2 回洗浄する。

図 20  
精製した PCR 産物の生物学的な活性



集めた PCR 反応液を半分に分け、一つの画分は 1/10 容量の酢酸ナトリウムと 2 倍量のエタノールで沈殿させ、 $-20^{\circ}\text{C}$  で 2 時間凍らせた後、高速で 30 分間遠心分離した。70% エタノールでリンスしてから風乾し、40  $\mu\text{L}$  の滅菌水に再懸濁させた。二つ目の画分は 500  $\mu\text{L}$  に希釈し、30K ナノセップ遠心ろ過デバイスで 15 分間遠心ろ過した。濃縮液を 40  $\mu\text{L}$  の滅菌水に再懸濁して回収し、分析用に 10  $\mu\text{L}$  に小分けした。この一つを未切断のコントロール(UC)として電気泳動し、残りをメーカーの指示に従って 20  $\mu\text{L}$  の制限酵素による分解反応液(EcoRI=R1, BamHI=BH1, XbaI=Xba)に入れた。それらを  $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間分解し、1.5% アガロースゲルで電気泳動後、DNA バンドをエチジウムブロマイドで染色して視覚化した。データより、沈殿法で得た 400 bp の PCR 断片は、XbaI 制限酵素で完全には分解できないことが明確に示された。一方、30K のナノセップ遠心ろ過デバイスで迅速に精製された試料は、XbaI で完全に分解された。このことは、このデバイスで XbaI の分解を妨害する混入物を除去できることを示唆している。

# 参考データ

## 1) 殺菌方法

ナノセップ遠心ろ過デバイスは、滅菌処理をしていませんが、70%エタノール溶液で殺菌することができます。殺菌する場合は、リザーバーを70%エタノール溶液で満たし、エタノール溶液がすべてオメガメンブレンを透過するまで14,000×gで遠心ろ過してください。リザーバーに移ったエタノール溶液を捨てます。次にリザーバーを滅菌水で満たし、同様に遠心ろ過して、残ったエタノールを除去してください。

注意：前処理後はオメガメンブレンを乾燥させないようにして、直ち（20分以内）に遠心ろ過操作を行ってください。脱水により、オメガメンブレンが損傷を受ける可能性があります。

## 2) 遠心ろ過時間の目安

遠心ろ過デバイスでの「ろ過に要する時間」は、「膜の分画分子量（UF 膜での場合）/孔径（MF 膜での場合）」、「膜の素材と構造」、「遠心力」、「試料の濃度と粘度」、「操作温度」などの多くの操作因子に影響されます（表 7 参照）。

表 7  
ナノセップ遠心ろ過デバイスでの遠心ろ過時間の目安

ナノセップの MWC0	カラーコード	遠心力	遠心ろ過時間 (25°C)
3K	グレー	14,000×g	20 分間
10K	ブルー	14,000×g	15 分間
30K	レッド	14,000×g	8 分間
100K	透明	14,000×g	5 分間
300K	オレンジ	14,000×g	3 分間

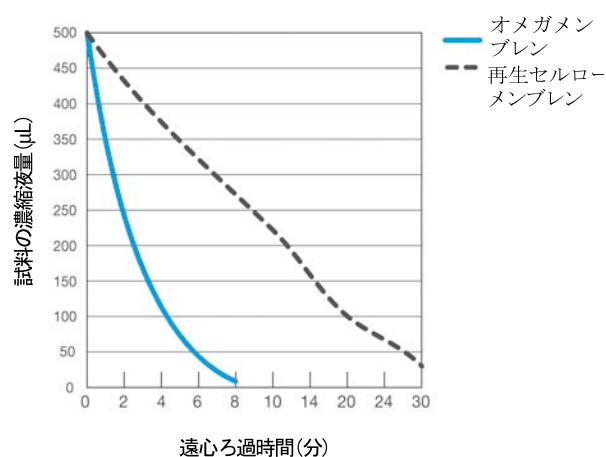
6 kD から 200 kD の範囲で 5 種類の分子量のタンパク質（アプロチニン：6 kD、トリプシンインヒビター：20 kD、牛血清アルブミン：66 kD、アルコールデヒドロゲナーゼ：150 kD、β-アミラーゼ：200 kD）を含む 1.0 mg/mL 溶液 500 μL を 20~25 μL に濃縮した。

## 3) ろ過速度に及ぼす限外ろ過膜素材の影響

オメガメンブレン（低タンパク質吸着性の修飾ポリエーテルスルホン）は、再生セルロース製の限外ろ過膜と比べて、ろ過速度が非常に速い特徴を持っています。

図 21 は、10K オメガメンブレンのナノセップ遠心ろ過デバイスと、10K 再生セルロースメンブレンの他社製デバイスとで、0.1 mg/mL BSA 試料溶液の 500 μL を濃縮するのに要した遠心ろ過時間を比較したものです。両デバイス共に 5,000×g で遠心ろ過しました。

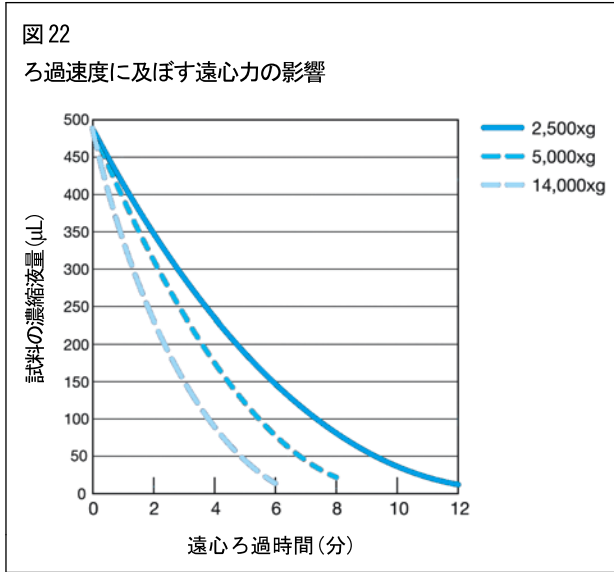
図 21  
膜素材の異なるデバイスでのろ過速度の比較



#### 4) ろ過速度に及ぼす遠心力の影響

「遠心力」は、「ろ過に要する時間」と同様に、「膜による分子の選択透過性」にも直接影響を与えます。遠心力を増加すると、ろ過速度が速まりますが、それに伴って分子の透過も増加します。

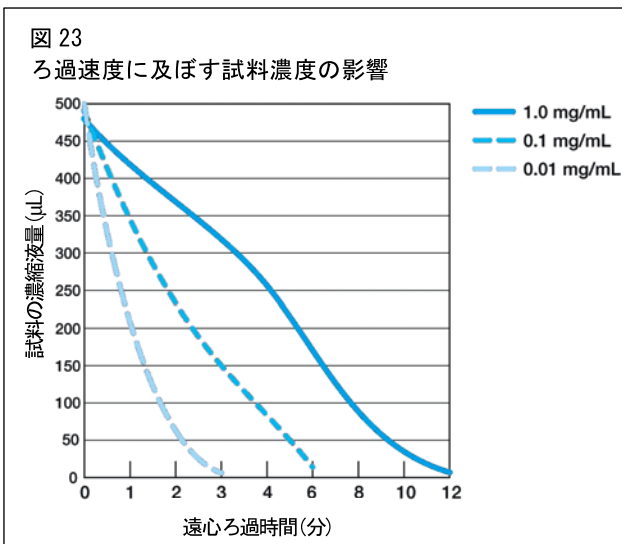
0.1 mg/mL の IgG 試料溶液 500  $\mu$ L を、100K のナノセップ遠心ろ過デバイスを用いて異なる遠心力で濃縮しました(図 22 参照)。



#### 5) ろ過速度に及ぼす試料濃度の影響

「試料濃度」は、「ろ過に要する時間」と同様に、「膜による分子の選択透過性」にも直接影響を与えます。タンパク質試料濃度を増加すると、ろ過速度は減少し、それに伴って分子の透過も減少します。

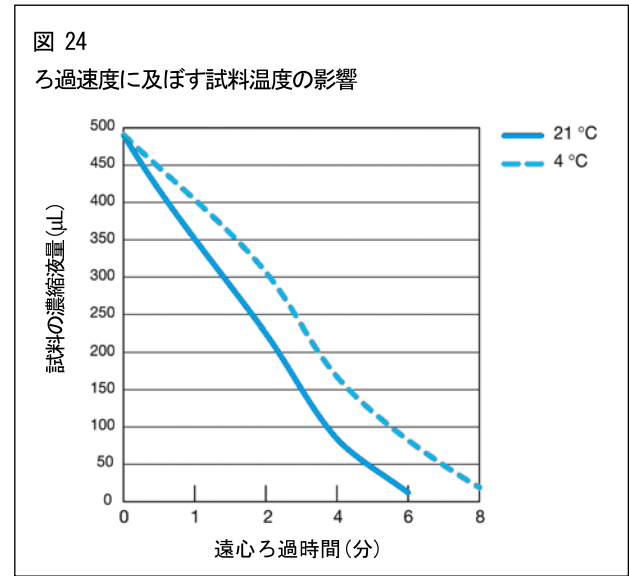
0.01 mg/mL、0.1 mg/mL、1.0 mg/mL の IgG 試料溶液 500  $\mu$ L を、100K のナノセップ遠心ろ過デバイスを用いて 14,000  $\times$ g で遠心ろ過しました(図 23 参照)。タンパク質濃度濃度が高い試料は、長い遠心ろ過時間を必要とすることが分かります。



#### 6) ろ過速度に及ぼす試料温度の影響

「試料温度」は、「ろ過に要する時間」に直接影響を与えます。試料温度を低下させると、それに伴い、ろ過に要する時間が増加します。

0.1 mg/mL の IgG 試料溶液 500  $\mu$ L を、100K のナノセップ遠心ろ過デバイスを用いて 4 $^{\circ}$ C および 21 $^{\circ}$ C の条件で遠心ろ過しました(図 24 参照)。



# ナノセップ遠心ろ過デバイス使用説明書

## 【使用上の注意】

本書に記載している操作の条件等は、目安としてご使用ください。試料の種類や量、濃度によって、条件が異なります。本書を目安に、それぞれのサンプルに応じた最適条件を設定してください。

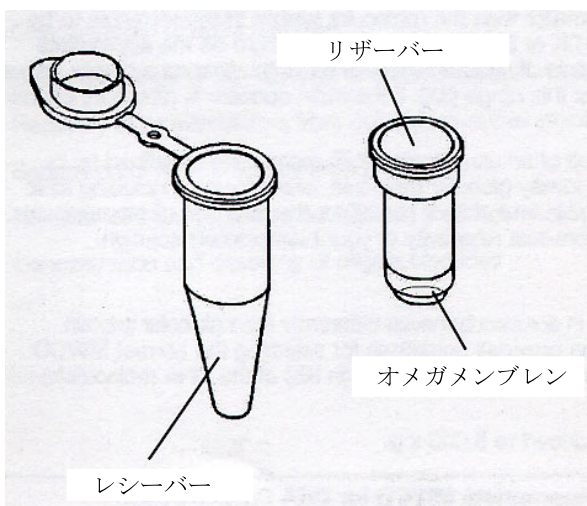
試料へのコンタミネーションを避けるため、オメガメンブレンに直接手で触れないようにしてください。また、ピペットチップの先端等がオメガメンブレンに触れないようご注意ください。破損の原因となる恐れがあります。

本製品の目的以外の使用や本書に記載している注意事項に従わない場合、製品性能、著作権及び安全性に影響を及ぼすことがありますので、ご注意ください。

## 【仕様】

- 構成素材  
膜材質：オメガ（ポリエチレンサポート付き低タンパク吸着性の修飾ポリエーテルスルホン）  
リザーバー、レシーバー：ポリプロピレン
- 有効ろ過面積 0.28 cm<sup>2</sup>
- 寸法 全長 4.5 cm（キャップを取り付けた状態）
- 容量 最大試料容量：500  $\mu$ L  
最終濃縮液量：5  $\mu$ L  
レシーバー容量：500  $\mu$ L  
残液量（膜/サポート）：<5  $\mu$ L
- 許容温度範囲 0~40 $^{\circ}$ C
- 許容PH範囲 1~14
- 許容遠心力 14,000 $\times$ g
- 遠心分離機 1.5 mLのチューブが入るアングルローターが必要
- 殺菌方法 未滅菌で提供。必要に応じて、使用前に70%エタノールで殺菌可能。

## 【構成部品】



## 【用途】

- ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、DNA/RNAの濃縮、精製、脱塩
- 標識化反応やPCR反応後の精製
- アガロースゲル切片からのDNAの回収
- ポリアクリルアミドからのタンパク質、オリゴヌクレオチド、RNAの回収
- HPLC分析用試料の除粒子、等

## 【使用方法】

- 前処理  
オメガメンブレンは、微量のグリセリン（1装置につき約0.5 mg）及びアジ化ナトリウム（1装置につき約5.0  $\mu$ g）を含んでいます。除去する必要がある場合は、脱イオン水もしくはバッファーで除去することができます。除去する場合は、脱イオン水もしくはバッファーを500  $\mu$ Lリザーバーに入れ、オメガメンブレンを通してください。この操作を2回行ってください。さらに洗浄が必要な場合は、0.05M NaOHを500  $\mu$ Lリザーバーに入れ、オメガメンブレンを通した後、上記操作を行ってください。

### ※ 注意

前処理後はオメガメンブレンを乾燥させないようにして、直ち（20分以内）に遠心ろ過操作を行ってください。脱水により、オメガメンブレンが損傷を受ける可能性があります。

### 2. 遠心ろ過

- リザーバーがレシーバーにしっかりとはめこまれていることを確認してください。
- 試料をマイクロピペットで50~500  $\mu$ L採り、リザーバーに入れます。試料中のタンパク質濃度は、1 mg/mL以下にしてください。
- 遠心分離機にナノセップ遠心ろ過デバイスをセットします。この時、ローターのバランスが崩れないように注意してください。
- タンパク質の場合は最大14,000 $\times$ g、核酸の場合は最大5,000 $\times$ gで遠心ろ過を行ってください。
- 希望する濃縮量に達するまで遠心したら、遠心ろ過を中止し、ナノセップ遠心ろ過デバイスを取り外してください。必要に応じて、リザーバー側の濃縮液もしくは、レシーバー側のろ過液を回収してください。

### ※ 注意

時折、試料がリザーバーの中で蒸発しているように見えることがあります。水分はオメガメンブレン面に常に残っているので消えていません。このような場合、最大20  $\mu$ Lのバッファーをオメガメンブレンに乗せ、回収してください。

【薬品適合性】

薬品	薬品適合性	薬品	薬品適合性
酢酸 (10%)	●	アセトン (20%)	●
ギ酸 (1N)	●	メチルエチルケトン (10%)	●
塩酸 (1N)	●	アセトニトリル (20%)	●
リン酸 (1N)	●	塩化アンモニウム	●
硫酸 (1N)	●	ジメチルホルムアミド (20%)	●
ブタノール (70%)	●	ジメチルホルムアミド (100%)	—
ブチルセロソルブ (10%)	●	ジメチルスルホキシド (20%)	●
エタノール (70%)	●	ジメチルスルホキシド (100%)	—
メタノール (70%)	●	ホルムアルデヒド (5%)	●
プロパノール (70%)	●	塩酸グアニジン (6M)	●
水酸化アンモニウム (1N)	●	過酸化水素 (10%)	●
水酸化ナトリウム (1N)	●	リン酸バッファー	●
酢酸エチル (10%)	—	ドデシル硫酸ナトリウム (0.01M)	●
酢酸エチル (100%)	×	次亜塩素酸ナトリウム (0.05%)	●
グリセロール	●	次亜塩素酸ナトリウム (0.1%)	—
ポリエチレングリコール (0.1%)	●	Terg-a-zyme (1%)	●
クロロホルム (0.8%)	●	トリスバッファー (1M)	●
クロロホルム (100%)	—	Ultrasil 11 (2%)	●
アセトン (10%)	●	尿素 (6M)	●

薬品適合性は薬品に2時間暴露させて確認した。

- : オメガメンブレンの流速などに著しい変化が見られず、化学的侵襲も観測されなかった
- × : オメガメンブレンは基本的に不安定で使用に適さない
- : 情報不十分につき、予備実験を行うことが推奨される

【トラブルシューティング】

現象	原因	対策
濃縮 (もしくはろ過) に要する時間が長すぎる	遠心分離速度の不足	・重力を増大してください。 ・遠心分離機を再度、設定してください。
	ゲル層の蓄積	・アングルローターを検査してください。
	試料が最大濃縮に到達	・これ以上の濃縮はできません。
試料の活性低下	オメガメンブレンが含んでいる微量のグリセリンまたはアジ化ナトリウムの影響	・前処理を行ってください (使用方法参照)。
	対象物質と溶液の不適合	・PH を調整してください。 ・バッファーの種類を変更してください。
	過剰濃縮によるタンパク質間相互作用	・最終濃縮係数を下げてください。 (濃縮されすぎないようにしてください)。
大きい分子のろ液中への混入	MWCO が適していない	・より低分子量の MWCO を選択してください。
	サブユニットの通過	
小さい分子の濃縮液中の保持	MWCO が適していない	・より高分子量の MWCO を選択してください。
回収率が低い	MWCO が適していない	・ろ液中の分子量を調べてください。分子量が許容範囲を超えるほど高い場合は、より低分子量の MWCO を選択してください。
	重力が大きすぎる	・重力を 5,000×g 以下に落としてください。



・本カタログに掲載している価格は、2008年3月現在の希望小売価格です。また、価格に消費税は含まれておりません。  
・製品の仕様・包装・価格等につきましては予告なく変更される場合がありますのでご了承ください。



**日本ポール株式会社**

ポール ライフサイエンス カンパニー  
ラボ製品グループ

〒141-0031 東京都品川区西五反田1-5-1  
TEL : 03-3495-8319 FAX : 03-3495-8301

取扱販売店