

PCR 産物(DNA 基質)の分離、精製はこれで決まり!

TSKgel DNA-STAT®を用いた DNA 基質の分離、高純度精製
(オープンアクセス論文より)



High-yield purification of exceptional-quality, single molecule DNA substrates

Y. Lu and P. Bianco, J. Biological Methods, 2021, Vol. 8(1), e415, DOI:10.1440/jbm.2021.350

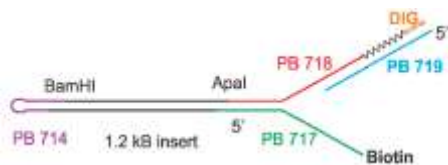
CC BY NC SA, <https://www.jbmethods.org/jbm/article/view/350>

核酸 (DNA/RNA)・たんぱく質・酵素の反応や生体分子のダイナミクスに関する一分子レベルの動的情報を得るための重要な手法として、一分子解析技術や磁気ピンセット技術など用いられますが、これらは、純度が高く均質な核酸基質を必要とします。最近、非多孔性陰イオン交換カラムを用いたクロマトグラフィーにより、高品質な DNA 基質を得た例が報告されましたので紹介します。著者らは、従来の分離精製法に比較して、再現性、収率、迅速性に優れていたと述べています。

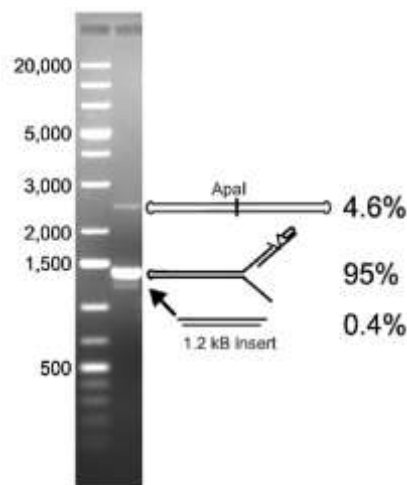
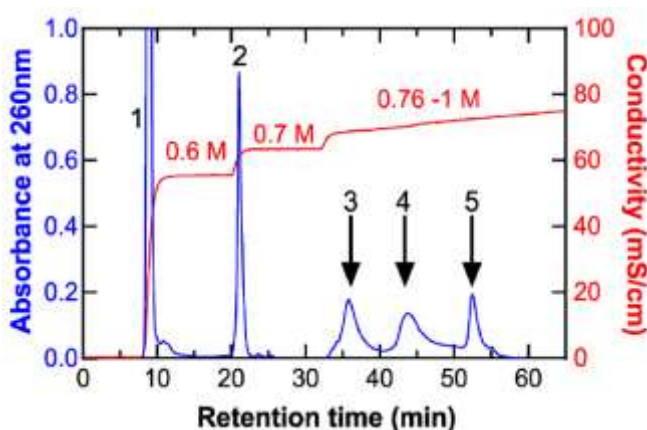
●非多孔性イオン交換カラム TSKgel DNA-STAT を用いた DNA の分離、精製のポイント

- ・ PCR 産物やライゲーション産物などからの目的 DNA 基質の分離、精製
- ・ 増幅された PCR 産物や DNA 基質の分離、精製を分析時間 60~90 分で完了
- ・ DNA の試料負荷量は最大 100 µg。負荷量 20~50 µg で精製純度は 95~100 %、回収率は 70~90 %

●TSKgel DNA-STAT による DNA 基質 (1.2 kb PCR 産物とヘアピン、複製フォーク DNA 結合体) の分離例



図：ヘアピンおよび複製フォークを持つ 1.2 kb のインサート DNA の構造



図：ピーク 5 フラクシンの電気泳動図

カラム： TSKgel DNA-STAT (4.6 mm I.D. x 10 cm)
溶離液： Buffer A: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)
Buffer B: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0) + 2 mol/L NaCl
Step gradient of Buffer A (1 CV), 30 % Buffer B (3 CV), 35 % Buffer B (3 CV),
38 % B (1 CV), 10 CV linear gradient of NaCl in Buffer B from 38 % to 50 %
流速： 0.5 mL/min 検出： UV (260 nm)
試料： 1.2 kb insert DNA (ligated fork and hairpin oligonucleotide)
Peak 1: ATP, Peak 2: hairpin and fork oligonucleotide complex,
Peak 3, 4 : ligation complex to hairpin and fork oligonucleotide (300 - 500 bp)
Peak 5: Final product (recovered 23 µg, yield, 77 %)

●核酸分析用のイオン交換クロマトグラフィー用カラム（非多孔性充填剤）

核酸分析用カラムには **TSKgel DNA-STAT**（強陰イオン交換体）および **TSKgel DNA-NPR[®]**（弱陰イオン交換体）があり、充填剤の粒子径、イオン交換基やカラムサイズに若干の違いがあります（製品一覧表を参照ください）。プラスミド DNA の分離については、TSKgel DNA-NPR が、super-coiled (sc)/closed circular (cc)、open circular (oc) および linear プラスミドの分離に優れています。一方、核酸の試料負荷量では TSKgel DNA-STAT が優れており、ラボレベルでの分離精製を考慮すると、操作圧力の低い TSKgel DNA-STAT が使いやすいと思われます。

- ・核酸試料の分画範囲 ; 10 bp～約 20 kbp
- ・核酸試料の負荷量 ; 20 µg～50 µg、最大 100 µg（試料の性質、分離能に依存）
- ・回収率 ; 70～90 %

●DNA やプラスミドの陰イオン交換クロマトグラフィーにおける関連文献、技術資料

- 1) Y. Wang et al., Bio-protocol 11(05): e3940, 2021, DOI:10.21769/BioProtoc.3940, Characterize the Interaction of the DNA Helicase PriA with the Stalled DNA Replication Fork Using Atomic Force Microscopy
- 2) S.G.L. Qaak et al., AAPS PharmSciTech, 11 (2010) 344-350, DOI:10.1208/s12249-010-9391-2, Naked Plasmid Formulation: Effect of Different Disaccharides on Stability after Lyophilisation
- 2) C.R. Smith et al., J. Chromatography B, 854 (2007) 121-127, Separation of topological forms of plasmid DNA by anion-exchange HPLC: Shifts in elution order of linear DNA
- 3) M.J. Molloy et al., Nucleic Acids Research, 32 (2004) e129, DOI:10.1093/nar/gnh124, Effective and robust topology analysis of plasmid and subsequent characterization of plasmid DNA of isoforms thereby observed
- 4) Tosoh Bioscience, Application Note 121, Rapid Analysis of Plasmid Topoisomers by Anion-Exchange Chromatography
- 5) 東ソー;セパレーションレポート No. 109 「高性能イオン交換クロマトグラフィー用カラム TSKgel STAT シリーズについて」
- 6) 東ソー;セパレーションレポート No. 58 「超高性能イオン交換クロマトグラフィー用充填カラム TSKgel DEAE-NPR による核酸の分離 (II)」
- 7) 東ソー;セパレーションレポート No. 57 「超高性能イオン交換クロマトグラフィー用充填カラム TSKgel DEAE-NPR による核酸の分離 (I)」
- 8) 東ソー;テクニカルノート TSKgel No. 16 「プラスミド DNA の分析、分離はこれで決まり！」
- 9) 東ソー;テクニカルノート TSKgel No. 5 「核酸医薬品の分析・分析はこれで決まり！」

● TSKgel DNA-STAT, TSKgel DNA-NPR 製品一覧表

品番	品名	粒子径 (µm)	カラムサイズ	備考
0021962	TSKgel DNA-STAT	5	4.6 mm I.D. x 10 cm	オリゴ核酸からDNA断片、プラスミドの分析、分離
0018249	TSKgel DNA-NPR	2.5	4.6 mm I.D. x 7.5 cm	オリゴ核酸からDNA断片、プラスミドの分析、分離
0018014	ラインフィルタキット(PEEK)	-	-	TSKgel DNA-STAT、TSKgel DNA-NPR用
0018021	ラインフィルタエレメント(PEEK)	-	-	ラインフィルタキット (P E E K) 補充用メンブラン



※“TSKgel”, “TSKgel STAT”, “NPR”は日本等における東ソー株式会社の登録商標です

※掲載のデータ等はその数値を保証するものではありません。お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認ください

東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部 ☎(03) 5427-5180 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2
大阪支店 バイオサイエンスG ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオサイエンスG ☎(052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店 ☎(092) 781-0481 〒810-0001 福岡市中央区天神1-13-2
仙台支店 ☎(022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1
カスタマーサポートセンター ☎(0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川12743-1

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>
HPLC Applications Database <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/applications-database-jp>
お問い合わせE-mail hlc@tosoh.co.jp