

GenElute™
Endotoxin-free
Plasmid Maxiprep Kit

ユーザーガイド

製品番号
PLEX15

SIGMA-ALDRICH®

注文情報

製品番号	製品概要	容量
PLEX15	GenElute™ Endotoxin-free Plasmid Maxiprep Kit	15回分

関連製品

関連製品	製品番号	関連製品	製品番号
Water, Molecular Biology Reagent	W4502	Ethidium bromide, aqueous, 10 mg/mL	E1510
LB Broth, EZMix™	L7658	b-Galactosidase Reporter Gene Activity Detection Kit	GALA
LB Agar, EZMix™	L7533	b-Galactosidase Fluorescence Activity Detection Kit	GALF
Terrific Broth, EZMix™	T9179	Chloramphenicol Acetyltransferase Reporter Gene Activity Detection Kit	CATA
Precast Agarose Gels, 1.0%, 8 well	P5472	Luciferase Assay Kit	LUC1
TAE Buffer (10x)	T9650	Escort III Transfection Reagent	L3037
TBE Buffer (10x)	T4415	Excort IV Transfection Reagent	L3287
Gel Loading Solution	G2526	GenElute™ Endotoxin-free Plasmid Midiprep Kit	PLED35
DirectLoad™ Wide Range DNA Marker	D7058		

製品の再注文はお近くの弊社販売代理店にて承
っています。

GenElute Endotoxin-free Plasmid Maxiprep Kit

目次

製品概要.....	2
注意事項と免責事項	3
保存方法と安定性	3
使用前の準備	3
手順.....	4
結果.....	7
トラブルシューティングガイド	8
参考文献.....	10
経験者向けプロトコル.....	13

製品概要

エンドトキシン(Lipopolysaccharide, LPSとも呼ばれます)はプラスミドDNAの精製時に混入しやすく、エンドトキシン感受性の細胞系におけるトランスフェクションの効率を大きく低下させます。GenElute Endotoxin-free Plasmid Maxiprep Kitは、細胞へのトランスフェクション用として、最大で1.2 mgのエンドトキシンフリープラスミドDNA(<0.1 EU/ μ g DNA)を簡単、迅速かつ低コストで精製できる製品です。なお、実際の収率や培養液の最適な使用量は、使用するプラスミドや培地の種類によって異なりますのでご注意ください(手順1参照)。

オーバーナイト培養した組換え大腸菌(*E. coli*)の培養液を遠心して大腸菌を回収し、改変アルカリSDS溶解法で溶解します。簡便な抽出と相分離によって、清澄なライセートからエンドトキシンを除去します。高塩濃度下でプラスミドDNAをシリカに吸着させ、さらに純度を高めます。遠心による洗浄の後、結合させたプラスミドDNAをEndotoxin-Free Waterで溶出します。

得られたプラスミドDNAは、主としてスーパーコイル構造を取っています。アガロースゲル電気泳動では、ゲノムDNAまたはRNAのコンタミネーションを示すバンドは認められません。得られたDNAは、トランスフェクション、制限酵素による切断、クローニング、シーケンシング、PCRなど、下流の分析にそのまま使用することができます。

付属する試薬	製品番号	PLEX15 15回分
Resuspension Solution	R1149	100 mL
RNase A Solution	R6148	0.6 mL
Lysis Solution	L1912	100 mL
Neutralization Solution	N2409	60 mL
Endotoxin Removal Solution	E4274	45 mL
DNA Binding Solution	B1555	60 mL
Column Preparation Solution	C2112	225 mL
Optional Wash Solution	W4011	135 ml
Wash Solution Concentrate	W3886	50 mL
Endotoxin Free Water	2107	100 mL
GenElute Maxiprep Binding Columns in tubes	G6665	15個
Collection Tubes, 50 mL	C4353	15個

キットの他にご用意いただく試薬および機器

- ・ Ethanol (95–100%)、製品番号E7148、E7023、または459836
- ・ 遠心機 (15,000 × g)
- ・ Centrifuge tubes, Oak Ridge、製品番号T2918
- ・ Corning®もしくは同等の15 mLユニカルチューブ用のアダプターが付属する、3000 ~ 5000 × gでの遠心が可能な遠心機とスイング型バケットローター
- ・ Centrifuge bottles、製品番号Z353736
- ・ Centrifuge tubes: 15 mL conical、製品番号 CLS430052、および50 mL conical、製品番号 C4353
- ・ 37°Cのウォーターバス

注意事項と免責事項

GenElute Endotoxin-free Plasmid Maxiprep Kitは試験研究用製品です。医薬品、家庭での使用など試験研究用以外の用途には使用できません。Column Preparation Solutionは刺激物です。DNA Binding SolutionおよびOptional Wash Solutionは有害なグアニジンを含んでいます。本キットに含まれる試薬を取り扱う際には、手袋、安全眼鏡や適切な保護服を着用してください。詳しくは安全性データシート(MSDS)をご覧ください。

保存方法と安定性

本キットは室温で保存してください。本キットの保管中に試薬に沈殿が生じた場合は、「使用前の準備」をご覧ください。

使用前の準備

調製を始める前に以下の手順を行ってください。

1. 試薬を十分に混和します。 試薬に沈殿が見られないか確認してください。保管中に、キットの試薬に沈殿が生じた場合には、沈殿が溶けるまで55～65°Cで温めてください。試薬は室温まで冷却してからご使用ください。
2. **Resuspension Solution**を調製します。 RNase A Solutionのチューブを軽くスピンドウンしてください。500 μ LのRNase A SolutionをResuspension Solutionに添加してください。初めて使用するときは、十分に混和してください。
3. **Wash Solution**を調製します。 初めて使用するときは、200 mLの95～100%エタノールをWash Solution Concentrateに添加してください。エタノールの蒸発を防ぐため、希釈したWash Solutionのキャップは必ず締めてください。
4. **Endotoxin Removal Solution**を調製します。 溶液を軽く混ぜ、氷上で10分以上静置してから使用してください。
5. ウォーターバスを加熱します。 ウォーターバスを37°Cに加熱します。

手順

注意: 遠心速度はいずれも遠心力 g の単位で表されています。遠心力 g の回転数への換算については、表1をご覧ください。ご使用の遠心機・ローターで必要な遠心力が得られない場合は、遠心力を最大に設定し、それに合わせて遠心時間を延長してください。遠心は、すべての液体がカラムを通過するまで行なってください。手順5~11ではスイング型バケットローターが必要になります。

表1. 遠心力(g の単位)から、一般的なローターの回転数への換算

遠心機	ローター	種類*	半径 (cm)	3,000× g での 回転数	5,000× g での 回転数	15,000× g で の回転数
Beckman社製 Allegra 6	GH-3.8	SB	20.4	3,631	4,688	N/A
Allegra 21(R)	S4180	SB	16.1	4,081	5,268	N/A
Allegra 64	F0485	FA	9.0	N/A**	N/A	12,211
	F0685	FA	9.7	N/A	N/A	11,764
TJ-25	TS-5.1-500	SB	19.0	3,756	4,849	N/A
	TA-10-250	FA	13.7	N/A	N/A	9,901
旧式のBeckman 社製遠心機用 ローター	JA-10	FA	15.8	N/A	N/A	9,215
	JA-14	FA	13.7	N/A	N/A	9,896
	JA-20	FA	10.8	N/A	N/A	11,146
	JS-13	FA	14.0	N/A	N/A	9,790
IEC社製	215	SB	13.0	4,537	5,857	N/A
	MP4(R)	SB	35.9	2,733	3,528	N/A
PR-7000M	966	SB	24.5	3,310	4,274	N/A
B22M	877	FA	12.6	N/A	N/A	10,318
Sorvall社製	HB-4	SB	14.7	4,277	5,522	N/A
	HB-6	SB	14.6	4,284	5,531	N/A
	HS-4	SB	17.2	3,948	5,097	N/A
	SH-80	SB	10.1	5,142	6,639	N/A
	GSA	FA	14.5	N/A	N/A	9,604
	SA-300	FA	9.7	N/A	N/A	11,784
	SA-600	FA	12.9	N/A	N/A	10,179
	SE-12	FA	9.3	N/A	N/A	11,997
	SL-50T	FA	10.7	N/A	N/A	11,203
	SS-34	FA	10.7	N/A	N/A	11,203

*SB = swinging bucket (スイング型)。FA = fixed angle (アングル型)。

**N/A = 本製品には不相当

表にないローターの場合、適切な回転数は次式で計算できます。

$$RPM = \sqrt{RCF / 1.118 \times 10^{-5}} r$$

ここで、RCF = g の単位で表した、目的の重力加速度(相対遠心力)、

r = cmの単位で表したローターの半径、

RPM = 目的の遠心力 g を得るために必要な1分間の回転数。

特に記載がない限り、すべての手順は室温で行なってください。

- 1. 細胞を回収します。**

オーバーナイト培養した組換え大腸菌 (*E. coli*) 25~200 mLを遠心してペレット状にします。培養液の最適な使用量は細胞密度によって異なります。収率を最大限に高めるには、下記の注意をご覧ください。適量の組換え大腸菌培養液を遠心ボトルに移し、3000~5000 × gで5~10分間遠心してペレット状にしてください。培養液の上清は捨ててください。

注意: 最良の結果を得るには、画線播種した新鮮なプレートから採取した単一のコロニーから培養を始めてください。適切な抗生物質を加えたLuria broth (LB) 培地中で、激しく振とうしながら (250~300 RPM) 37°Cでオーバーナイト培養してください。

600 nmでオーバーナイト培養液の吸光度を測定してください。cell massは合計で約300としてください。cell massは、OD₆₀₀と培養液の容量 (mL) の積で表されます。培養液の使用量を算出するには、望ましいcell mass (300) を決め、オーバーナイト培養液の600 nmでの吸光度でcell massを割ります。たとえば、OD₆₀₀が約4.0になるまで培養した、非常に細胞密度の高い組換え大腸菌培養液では、使用量はわずかに75 mLとなります。また、OD₆₀₀が約2.0の、細胞密度が低い培養液では、使用量を150 mLとしてください。低コピー数のプラスミドでは、cell massの合計を500としてください。cell massが高すぎると、収率が低下する原因となります。栄養豊富な培地を使用した培養液では、必要となる量が少なくなることがあります。詳細については、シグマ アルドリッチのテクニカルサポートまでお問い合わせください。
- 2. 細胞を再懸濁させます。**

Resuspension Solutionを初めて使用するときは、必ず適量のRNase A Solutionと混合してください。4.8 mLのResuspension Solutionを細胞ペレットに加え、ピペッティングによって完全に再懸濁させてください。不十分な再懸濁は収率が低下する原因になります。再懸濁させたペレットを、>15,000 × gの遠心が可能な遠心チューブ (Oak Ridge型または同等品) に移し入れてください。
- 3. 細胞を溶解します。**

4.8 mLのLysis Solutionを添加して、懸濁している細胞を溶解します。時間を置かず、透明で粘性のある溶液になるまで溶解液を穏やかに転倒混和してください (6~8回)。ボルテックスは行なわないでください。激しく混和するとゲノムDNAが切断されるため、最終精製物のプラスミドDNAに染色体DNAが混入する可能性があります。溶解反応は5分以内に終了させてください。アルカリによる長時間の溶解反応はスーパーコイル状のプラスミドを変性させ、精製後の用途に使用できなくなる可能性があります。
- 4. 中和します。**

3.2 mLのNeutralization Solutionをライセートに添加して、細胞片を沈殿させてください。時間を置かず、穏やかに転倒混和し、溶液を十分に混ぜてください。ボルテックスは行なわないでください。細胞片を >15,000 × g、2~8°Cで15分間遠心してペレット状にしてください。上清に多量の細胞片が残っている場合は、再度遠心してから手順5に進んでください。清澄なライセートをCorningなどの15 mLコニカルチューブに移してください。

5. エンドトキシンを除去します。
- a. 1.2 mLの氷冷したEndotoxin Removal Solutionをライセートに添加してください。1分間転倒混和して十分に混ぜてください。
氷上で ≥ 10 分間、チューブを冷却してください。氷上でのインキュベーション中、混合液を2~3回混和してください。溶液は透明で明るい青色になります。
37°Cのウォーターバスで10分間、チューブを加温してください。
溶液は濁った状態になります。溶液を相分離させるため、スイング型バケットローターを用いて3000~5000 $\times g$ 、室温で5分間、チューブを遠心してください。清澄な上相にはプラスミドDNAが含まれています。青い下相にはエンドトキシンが含まれています。
- c. 清澄な上相を、新しい15 mLコニカルチューブに注意深く移し入れてください。青い下相は捨ててください。
手順a~cをもう一度繰り返した後、手順6に進んでください。
注意: 以降の手順では、サンプルにエンドトキシンが持ち込まれるのを避けるため、エンドキシンフリーとされているプラスチック製品の新品を使用してください。
清澄な上相を、新しい50 mLチューブにゆっくりと移し入れてください。
6. DNA Binding Solutionを添加します。
- 3.2 mLのDNA Binding Solutionを、エンドトキシンを含まないライセートに添加してください。転倒混和かボルテックスによって、ライセートを十分に混ぜてください。
7. カラムを準備します。
- GenElute Maxiprep Binding ColumnをCollection Tubeに挿入してください。12 mLのColumn Preparation Solutionを各カラムに添加し、スイング型バケットローターを用いて3000~5000 $\times g$ で1~2分間遠心します。カラムを通過した液体は捨ててください。
注意: Column Preparation Solutionをご使用になることで、フィルターへのDNA結合量が最大化し、収量が安定します。
8. DNAを結合させます。
- Collection Tubeに挿入されている準備済みのGenElute Maxiprep Binding Columnにライセートを加えます。スイング型バケットローターを用いて3000~5000 $\times g$ で1~2分間遠心してください。
カラムを通過した液体は捨ててください。
9. 洗浄を行いません(オプション)。
- カラムに8.0 mLのOptional Wash Solutionを添加します。スイング型バケットローターを用いて3000~5000 $\times g$ で2分間遠心してください。カラムを通過した液体は捨ててください。
注意: この洗浄工程は、HB101、JM101、NMおよびPRシリーズのような野生型endA⁺遺伝子を持つ菌株を使用する場合に、精製したプラスミドにヌクレアーゼが混入することを避けるために必要となります。この洗浄工程では、前の工程から持ち込まれた残留エンドトキシンを除去することもできます。

10. カラムを洗浄します。初めて使用する際には、必ずWash Solution Concentrateをエタノールで希釈したことを確認してください。カラムに15 mLの希釈したWash Solutionを添加します。スイング型バケットローターを用いて3000～5000×gで5分間遠心してください。Wash Solutionをカラムから完全に除去した後、手順11に進んでください。
11. DNAを溶出させます。カラムを新しいCollection Tubelに移し変えてください。3～5 mlのEndotoxin-Free Waterをカラムに添加してください。スイング型バケットローターを用いて3000～5000×gで3～5分間遠心してください。カラムを通過した溶液にはプラスミドDNAが含まれています。この溶液はすぐに使用するか、-20℃で保存してください。
- 注意: より濃度の高いプラスミドDNA溶液が必要な場合は、溶出量を1 mLまで減らすことができます。溶出量が1 mLの場合に収率を最大限に高めるには、予め65℃に加熱したEndotoxin-Free Waterをカラムに直接添加してください。予め加熱したEndotoxin-Free Waterでカラムを10分間浸してから遠心してください。加熱したEndotoxin-Free Waterに浸して放置することで収率が増大します。ただし、プラスミドDNAの総収量は、5 mL中に溶出した場合よりも少なくなる傾向があります。

結果

プラスミドDNAの収率と純度は光学的分析により測定できます。280 nmでの吸光度に対する260 nmでの吸光度の比(A_{260}/A_{280})は1.7～1.9となります。DNAのサイズと純度は、アガロースゲル電気泳動またはパルスフィールド電気泳動で測定できます。

トラブルシューティングガイド

プラスミドDNAの収率が低い。	原因——カラムの遠心をアングル型ローターで行なった、または遠心力gが十分でなかった。 対策——手順7～11では、溶液が効率的にカラムを通過できるよう、必ずスイング型バケットローターを用いて3000～5000×gで遠心を行なってください。実際の遠心速度(rpm)はローターのサイズによって異なります(「手順」の冒頭にある注意を参照してください)。
	原因——Wash Solutionの濃度が濃すぎる。 対策——Wash Solution Concentrateが規定量のエタノールで希釈されているか確認してください。使用するとき以外は、揮発を防ぐため、フタをしっかりと閉めてください。
	原因——培養液が古すぎる。 対策——冷凍保存しておいたストックから、新鮮なプレートに播種してください。単一のコロニーを採取し、新たに培養を始めてください。
	原因——使用した細胞が多すぎる、または少なすぎる。 対策——OD ₆₀₀ を測定して細胞密度を確認してください。培養液の使用量を算出するには、望ましいcell mass(高コピーのプラスミドは300、低コピーのプラスミドは500)を決め、オーバーナイト培養液の600 nmでの吸光度でcell massを割ります。
	原因——プラスミドの複製が十分でない。 対策——培養の条件が最適であったか、培養液の選択が適切であったかを確認してください。
	原因——抗生物質の活性が不十分である。 対策——オーバーナイト培養には新鮮な抗生物質をご使用ください。多くの抗生物質は光感受性であるため、2～8℃で長期間保存すると失活します。
	原因——アルカリ溶解の時間が長い。 対策——手順3で溶解時間を3分間に短縮するか、細胞懸濁液が透明な粘性のある液体になった時点で溶解反応を終了させてください。
	原因——細胞片の沈殿が不十分である。 対策——少ない培養液量から精製を始めてください。
	原因——溶解反応が不完全である。 対策——少ない培養液量から精製を始めるか、目視で確認しながら溶解時間(手順3)を延長してください。最良の結果を得るには、cell massの合計が高コピーのプラスミドでは300、低コピーのプラスミドでは500となるようにしてください。

吸光度から求めた精製DNAの量が実際の量と一致しない (A_{260}/A_{280} 比が高すぎる、または低すぎる)

原因——Wash Solutionを希釈したエタノールに不純物が含まれている。

対策——エタノールの250～300 nmでの吸光度を確認してください。吸光度が高い場合、そのエタノールは使用しないでください。洗浄後に、微量の不純物がカラムに残る場合があります。不純物は、溶出液中に混入し、最終精製物の吸光度に影響を及ぼす恐れがあります。

原因——プラスミドDNAにRNAが混入している。RNase A処理が不十分である。

対策——初めて使用する際には、RNase A SolutionにResuspension Solutionに加えたか確認してください。RNase A Solutionは、65℃以上の高温で、または室温での6ヶ月以上の長期保存により失活します。

原因——プラスミドDNAに染色体DNAが混入している。

対策——24時間以上培養した細胞や死細胞は使用しないでください。溶解反応(手順3)や中和(手順4)の最中には、ボルテックスや激しい振とうを行なうことは避けてください。

原因——シリカの微粉末の混入により、バックグラウンドが高くなっている。

対策——DNAサンプルを最高速度で1分間遠心し、その上清を用いて吸光度を再測定してください。

原因——カラムに入れたサンプルの量が多すぎたため、精製が不十分である。

対策——少ない培養液量から精製を始めてください。

残留エンドキシンの濃度が0.1 EU/ μ g DNAを超えている。

原因——細胞が増殖しすぎたか、使用した細胞数が多すぎる。

対策——培養中は激しい振とうを行ない、培養時間は12～16時間としてください。最大培養液量やcell massの推奨値を超えないようにご注意ください。

原因——エンドキシンが含まれている下相(青色)が持ち込まれた。

対策——手順5で清澄な上相を取り出す際には、青い下相の一部が取り込まれないよう、ピペッティング以外の方法で行なってください。洗浄工程(オプション)で、前の工程から持ち込まれた残留エンドキシンを除去してください。

Endotoxin Removal Solutionが二相に分離している。

原因——保存温度が25℃よりも高い。

対策——溶液を軽く混ぜ、氷上で10分以上静置してから使用してください。青く、透明で、相分離のない均一な溶液が得られます。

電気泳動で、スーパーコイル状プラスミドの前にバンドが現れる	<p>原因——プラスミドDNAの一部が変性している。</p> <p>対策——手順3の溶解反応は5分以内に終了させてください。ニックが入った(開環状の)二本鎖プラスミドDNAは、スーパーコイル状プラスミドDNAよりも泳動速度が遅くなります。</p>
精製後の酵素反応がうまくいかない	<p>原因——精製が不完全である。</p> <p>対策——いずれかの試薬に塩の沈殿が生じている可能性があります。試薬を65°Cに加熱して、沈殿を溶解してください。加熱した試薬は、室温まで冷却してからご使用ください。</p> <p>原因——DNA濃度が低すぎる。</p> <p>対策——DNAのエタノール沈殿を行ない、少量のEndotoxin-Free WaterにDNAを再懸濁させてください。</p> <p>または、シリカに結合したDNAを溶出する際に使用するEndotoxin-Free Waterの量を減らしてください。溶出量を少なくすると、総収量も低下しますのでご注意ください。</p> <p>原因——endA⁺株からDNAを精製した。</p> <p>endA⁺株からDNAを精製する場合には、必ず洗浄(手順9)を行なってください。</p> <p>原因——精製したDNA溶出液の塩濃度が高すぎる。</p> <p>対策——エタノール沈殿を行なってDNAを回収してください。ペレットを乾燥させてください。乾燥させたペレットを、Endotoxin-Free Waterにもう一度溶解してください。</p> <p>原因——Wash Solution中のエタノールがカラムに残っている。</p> <p>対策——洗浄後(手順10)にカラムを再度、1分間遠心して、残っているWash Solutionを取り除いてください。</p>

参考文献

1. Birnboim, H.C.; Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA *Nucleic Acids Res.* 1979, 7, 1513-1522.
2. Vogelstein, B.; Gillespie, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, 76, 615-619.

経験者向けプロトコル

1 ライセートを清澄化します。

- 細胞をベレット状にし、再懸濁し、アルカリ溶解し、中和します。

2 エンドキシンを除去します。

- 相分離と遠心を2回行なってください。

3 DNAを結合させます。

- 結合と遠心を行なってください。

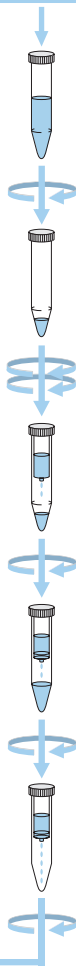
4 カラムを洗浄します。

- 洗浄と遠心を行なってください。

5 DNAを溶出させます。

- 溶出と遠心を行なってください。

Bacterial Culture



Pure Endotoxin-free Plasmid DNA

国際本部

3050 Spruce St., St. Louis, MO 63103

(314) 771-5765

sigma-aldrich.com

ご注文／お近くの代理店にお問い合わせください。

弊社カスタマーサービス (03) 5796-7320 ・ Fax (03) 5796-7325

テクニカルサポート (03) 5796-7330 ・ sigma-aldrich.com/techservice

開発／大量製造に関するお問い合わせ **SAFC** (800) 244-1173

シグマ アルドリッチグループ

 SIGMA

 ALDRICH

 Fluka


 Riedel-de Haen

 SAFC

 SUPELCO

 ISOTEC

©2006 Sigma-Aldrich Co. All rights reserved.

SIGMA、、SAFC、**SAFC**、SIGMA-ALDRICH、、ISOTEC、ALDRICH、、FLUKA、、SUPELCOは、Sigma-Aldrich Co.とその関連会社であるSigma-Aldrich Biotechnology LPの商標です。

Riedel-de Haen®は、Riedel-de Haen GmbHからのライセンスに基づく商標です。SIGMA製品の販売は、Sigma-Aldrich, Inc.を通じて行なわれます。Sigma-Aldrich, Inc.は、同社製品が本ガイドや他のSigma-Aldrich発行物に記載されている情報に適合することを保証します。購入者は自身の責任において、目的とする用途に同社製品が適しているかを判断してください。場合により、他の条項も適用されます。納品書または内容明細票の表面をご覧ください。GenElute™、EZMix™、DirectLoad™、SAFC™、Sigma Advanced Technology™ はSigma-Aldrich Co.とその関連会社であるSigma-Aldrich Biotechnology LPの商標です。

特許出願中。

TPCR法は、Hoffman-LaRoche社が所有する特許によって保護されています。

CorningはCorning社の登録商標です。

SIGMA-ALDRICH™

ライフサイエンス、

先端技術、サービスを主導し、皆様の研究を成功に導くお手伝いをしています。

FC/MAM
01528-502620
0096