

## Product Information

## GenElute™ Plasmid Maxiprep Kit

製品番号 PLX15、PLX50

## TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

## 製品概要

GenElute™ Plasmid Maxiprep Kitは、組換え*E. coli* 培養液からプラスミドDNAを簡単かつ迅速に抽出できる低コストのキットです。シリカ結合法と簡便なスピナラム法を組み合わせた方法により、25~200 mLのLuria Broth (LB) 培地で培養した菌体から最大1.2 mgのプラスミドDNAを約45分で回収することができます。ただし、実際の収量および最適な培養液使用量はプラスミドや培地の種類によって異なります(「手順」のステップ1を参照)。

一晚培養した組換え*E. coli* 培養液を遠心して菌体を回収し、改変アルカリSDS法で溶解した後、高濃度の塩の存在下でDNAをシリカに吸着させます<sup>1,2</sup>。次いで遠心-洗浄ステップで夾雑物を除去します。最後に、カラムに結合しているDNAを水またはTris-EDTAバッファーで溶出します。

回収されるプラスミドDNAは主としてスーパーコイル状です。アガロースゲル電気泳動においてゲノムDNAやRNAの混入は見られません。抽出したDNAは制限酵素処理やライゲーション、シーケンシング、PCR<sup>†</sup>、トランスフェクションといった用途にそのまま使用できます。

キットに含まれている試薬	製品番号	PLX15 15回分	PLX50 50回分
Resuspension Solution	R1149	100 mL	350 mL
RNase A Solution	R6148	0.6 mL	2.0 mL
Lysis Buffer	L1912	100 mL	350 mL
Neutralization/Binding Solution	N5158	140 mL	480 mL
Column Preparation Solution	C2112	225 mL	3 x 225 mL
Optional Wash Solution	W4011	135 mL	480 mL
Wash Solution Concentrate	W3886	50 mL	2 x 80 mL
Elution Solution (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)	E5650	90 mL	300 mL
GenElute Maxiprep Binding Columns in Tubes	G6665	15個	5 x 10個
Collection Tubes, 50 mL capacity	C4353	15個	5 x 10個

## キット以外にご用意いただく試薬および器具

- エタノール(95~100%) (製品番号 E7148、E7023、Z45,983-6)
- スイングバケットローター付き遠心分離機、3,000~5,000 x gで使用できるもの
- 遠心分離機、12,000~15,000 x gで使用できるもの
- 遠心ボトル(250 mL) (製品番号 Z353736)
- オークリッジ遠心チューブ(製品番号 T2918)

## 注意事項と免責事項

GenElute Plasmid Maxiprep Kitは試験研究用のみを目的として販売されています。医薬品、家庭用その他試験研究以外の用途には使用できません。Neutralization/Binding SolutionおよびOptional Wash Solutionは有害物質であるグアニジンを含みます。Column Preparation Solutionは刺激性を有します。危険性や安全な取り扱いに関しては化学物質安全データシート(MSDS)をご覧ください。

## 調製

1. **試薬類をそれぞれよく混合します。** 沈殿の有無を確認します。試薬に沈殿が生じた場合は、沈殿が溶解するまで 55~65 °Cで加温します。試薬は室温に戻してから使用します。
2. **Resuspension Solution:** 最初の使用の前に、500  $\mu$ L (15回用) または 1.75 mL (50回用) の RNase A 溶液を Resuspension Solution の全量に加えます。
3. **Wash Solution:** 最初の使用の前に、Wash Solution Concentrate を 95~100% エタノールで希釈します。
  - 15回用の Concentrate のボトルには 200 mL の 95~100% エタノールを加えます。
  - または、
  - 50回用の Concentrate のボトルには 320 mL の 95~100% エタノールを加えます。
 希釈後の Wash Solution はエタノールの蒸発を防ぐため、使用後は密栓してください。

## 保存

室温で保存してください。試薬に沈殿が生じた場合は上記の「調製」の項を参照してください。

## 手順

すべてのステップは室温で実施します。

1. **菌体の回収** 一晚培養した 25~200 mL の組換え *E. coli* 培養液を遠心して菌体をペレット化します。最適な使用培養液量は培養液の菌体密度によって異なります。収量を最大とするには下記の注意事項に従ってください。適量の組換え *E. coli* 培養液を遠心チューブに移し、3,000~5,000  $\times g$  で 5~10 分間遠心して菌体をペレット化します。すべての上清を除去して捨てます。

**注:** 最良の結果を得るには、新鮮な画線培養プレートから得たシングルコロニーから培養を始めてください。適切な抗生物質を含む Luria broth (LB) を用い、37 °C で十分に振盪 (250~300 rpm) しながら一晚培養します。一晚培養した培養液の 600 nm における吸光度を測定します。OD600  $\times$  培養液量 (mL) の値を cell mass (菌体量) として、cell mass が約 300 に相当する培養液を使用します。

培養液使用量を算出するには、一晚培養した培養液の 600 nm における吸光度で、所定の cell mass 値 (ここでは 300) を割り算します。例えば、非常に密度の高い組換え *E. coli* 培養液で OD600 が約 4.0 だとしたら、使用する培養液量はわずか 75 mL です。これよりも密度の低い培養液で OD600 が約 2.0 だとしたら、使用量は 150 mL です。

低コピー数プラスミドの場合、使用する総 cell mass は 500 とします。cell mass が多すぎると収量が減少します。栄養豊富な培地で培養した場合はさらに使用量を減らす必要があるかもしれません。

2. **菌体の再懸濁** 最初の使用の前に、適切な量の RNase A 溶液を Resuspension Solution に加えたことを確認してください。菌体ペレットに 6.0 mL の Resuspension Solution を加え、ピペティングにより完全に再懸濁します。完全に均一となるまで再懸濁されていることを確認してください。再懸濁が不十分だと収量が減少します。懸濁液を、15,000  $\times g$  以上で使用できる遠心チューブ (オークリッジ型または同等品) に移します。
3. **溶解** 6.0 mL の Lysis Buffer を加えて懸濁液中の菌体を溶解します。ただちにチューブを静かに転倒混和して、混合物が透明で粘稠になるまで繰り返します (6~8 回)。ボルテックスは行わないでください。乱暴に混合するとゲノム DNA が切断されるため、抽出したプラスミド DNA に染色体 DNA が混入します。

**溶解処理は 5 分以上行わないでください。** 長時間のアルカリ溶解処理はスーパーコイル状プラスミド DNA を不可逆的に変性させてしまうため、その後ほとんどの用途に使用できなくなる可能性があります。

4. **中和** 8.0 mL の Neutralization/Binding Solution を加えて菌体の破片を沈殿させます。チューブを静かに 4~6 回転倒混和します。15,000  $\times g$  以上で 10~15 分間遠心し、菌体破片をペレット化します。菌体破片、タンパク質、脂質、SDS、染色体 DNA は白濁した粘稠な沈殿となって溶液から分けられます。遠心後の上清に多量の浮遊する菌体破片が存在する場合は、ステップ 5 に進む前に上清を再度遠心してください。

5. **DNA結合カラムの準備** GenElute Maxiprep Binding Columnを50 mL回収用チューブに差し込みます。各カラムに12 mLのColumn Preparation Solutionを加え、スイングバケットローターを用いて 3,000~5,000 × *g*で1~2分間遠心します。カラム通過液を捨てます。

注: Column Preparation SolutionはフィルターへのDNA結合量を最大化し、より安定した収量が得られるようにするものです。このカラム準備ステップは、ステップ 4に進む前(またはステップ4の間)に行っておくと便利です。

6. **清澄化されたライセートのロード** ステップ4で得られた清澄化されたライセートを、50 mL回収用チューブにセットしたDNA結合カラムに移し、スイングバケットローターを用いて3,000~5,000 × *g*で1~2分間遠心します。カラム通過液を捨てます。
7. **オプションの洗浄 (endA<sup>+</sup>株を使用する場合のみ実施)**  
8.0 mLのOptional Wash Solutionをカラムに加えます。スイングバケットローターを用いて 3,000~5,000 × *g*で2分間遠心します。カラム通過液を捨てます。

注: HB101、JM101、NMシリーズ、PRシリーズなど、野生型のendA<sup>+</sup>遺伝子を保有する菌株を使用する場合、抽出したプラスミドDNA産物にヌクレアーゼが混入することを防ぐため、このオプションの洗浄ステップが必要です。

8. **カラムの洗浄** 最初の使用の前に、Wash Solution Concentrateにエタノールを必ず加えてください。15 mLの希釈済みWash Solutionをカラムに加えます。スイングバケットローターを用いて 3,000~5,000 × *g*で5分間遠心します。このカラム洗浄ステップではカラム中に残存する塩やその他の夾雑物を除去します。カラムからWash Solutionが完全に除去されたことを確認してください。

9. **DNAの溶出** カラムを別の50 mL回収用チューブに移します。5 mLのElution Solutionまたは分子生物学グレード水をカラムに加えます。DNAシーケンシングやその他の酵素処理用には、溶出に水または5 mM Tris-HCl(pH 8.0)を使用します。スイングバケットローターを用いて 3,000~5,000 × *g*で3~5分間遠心します。溶出液にはプラスミドDNAが含まれており、ただちに使用するか、または-20 °Cで保存することができます。

注: より濃度の高いDNA溶液が必要な場合は、溶出液の量を最小1 mLまで減らすことができます。1 mLで溶出する際に収率を最大とするには、Elution Solutionをあらかじめ65 °Cに加熱しておき、そのまま結合フィルターに加えます。結合カラムが温かいElution Solutionに浸った状態で10分間静置してから遠心します。温かいElution Solutionによる処理は収率を向上させますが、プラスミドDNAの総収量は本来の5 mLで溶出させる場合よりは少なくなる可能性があります。

### 結果

収率および純度は分光分析で測定できます。260 nmと280 nmの吸光度比(A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>)は1.7~1.9が適正な値です。DNAのサイズおよび品質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。

### 参考文献

1. Birnboim, H.C., and Doly, J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1523 (1979).
2. Vogelstein, B., and Gillespie, D., Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 615-619 (1979).

## トラブルシューティングガイド

問題	原因	対策
プラスミドDNAの収率が低い	結合カラムをアングルローターで遠心した、または遠心時のgが不足だった	液体が結合カラムを効率よく通過するよう、スイングバケットローターを用いて3,000~5,000 x gで遠心してください(ステップ5~9)。rpm単位による実際の遠心速度はローターの大きさによって異なります。
	Wash Solutionが濃すぎる	Wash Solution Concentrateが規定量のエタノールで希釈されていることを確認してください。蒸発を防ぐため、使用すること容器のフタをきちんと閉めてください。
	培養液が古すぎる	凍結保存菌株を新しいプレート培地に画線してシングルコロニーを拾い、新しい培養液を準備してください。
	菌体使用量が多すぎる(または少なすぎる)	OD600を測定して菌体密度を確認してください。使用する培養液量を算出するには、一晚培養した培養液の600 nmにおける吸光度でcell mass値(高コピー数プラスミドで300、低コピー数プラスミドで500)を割り算します。
	プラスミドの複製が少ない	適切な培地を用いて最適な条件で培養したかどうかを確認してください。
	抗生物質の活性が不十分である	新鮮な抗生物質溶液を添加して一晚培養します。大半の抗生物質溶液は光に弱く、2~8 °Cで長期間保存すると分解します。
	アルカリ溶解処理が長すぎる	溶解処理の時間(ステップ3)を3分間に短縮するか、または細胞懸濁液が透明で粘稠な液体となるまでに留めてください。
	菌体破片の沈殿が不完全である	使用する培養液量を減らしてください。
	溶解が不十分である	使用する培養液量を減らすか、または溶解(ステップ3)の際、状態を目視で確認しながら溶解処理時間を延長してください。最良の結果を得るには、総cell massは、高コピー数プラスミドで300、低コピー数プラスミドで500としてください。
精製したDNAの吸光度がプラスミドの正確な量を反映していない(A260/A280比が高すぎるか低すぎる)	Wash Solutionが不純なエタノールで希釈されている	250~300 nmにおけるエタノールの吸光度を確認してください。吸光度の高いエタノールは使用しないでください。微量の不純物が洗浄後の結合カラムに残存していて、最終残物の吸光度に影響することがあります。
	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)	最初の使用前にResuspension SolutionにRNase A溶液を加えたかどうか確認してください。RNase A溶液は高温(65 °C以上)または長期保存(室温で6か月以上)によって失活します。
	プラスミドDNAに染色体DNAが混入している	24時間以上培養した培養液や細胞死が起こり始めた培養液は使用しないでください。溶解処理(ステップ3)や中和処理(ステップ4)の間、細胞を含む溶液をボルテックスにかけたり激しく振盪したりしないでください。
	シリカ微粒子によるバックグラウンド値が高い	DNAサンプルを最高速度で1分間遠心し、上清を用いて吸光度を再測定してください。
	カラムへのロード量が多すぎたために精製が不十分である	使用する培養液量を減らしてください。

### トラブルシューティングガイド(前頁からの続き)

電気泳動でスーパーコイル状プラスミドの先に別のバンドがある	プラスミドDNAの一部が不可逆的に変性している	溶解処理(ステップ3)は5分以上行わないでください。電気泳動において、ニックの入った環状の二本鎖プラスミドDNAはスーパーコイル状DNAよりも遅く泳動します。
精製プラスミドDNAを用いた酵素反応がうまくいかない	精製が不十分である	溶液に含まれる塩類は沈殿することがあります。その場合は沈殿が溶解するまで65℃で加熱してください。溶液は室温に戻してから使用します。
	DNA濃度が低すぎる	DNAをエタノールで沈殿させてから、少量の水またはElution SolutionにDNAを再溶解してください。または、シリカ結合DNAの溶出に用いるElution Solutionの量を減らしてください。Elution Solutionの量を減らすと全体の収量は減少することがありますので注意してください。
	endA <sup>+</sup> 株からDNAを抽出した	endA <sup>+</sup> 株からDNAを抽出する際はオプションの洗浄(ステップ7)を実施する必要があります。
	プラスミドDNAを含む最終の溶出液に多量の塩が含まれている	DNAをエタノールで沈殿させてください。ペレットを乾燥します。その後、水またはElution Solutionに再溶解します。Elution SolutionにはEDTAが含まれていますが、EDTAは多くの酵素の重要な補因子である二価陽イオン(Mg <sup>2+</sup> など)をキレートする点に注意してください。
	希釈したWash Solutionに由来するエタノールがカラムに残存している	洗浄(ステップ8)の後、残存するWash Solutionを除去するため、カラムを1分間再遠心してください。

#### 関連製品

- Water, Molecular Biology Reagent、製品番号 W4502
- LB Broth, EZMix™、製品番号L7658
- LB Agar, EZMix、製品番号 L7533
- Terrific Broth, EZMix、製品番号 T9179
- Precast Agarose Gels, 1.0%, 8-well、製品番号 P5472
- TAE Buffer (10x)、製品番号 T9650
- TBE Buffer (10x)、製品番号 T4415
- Gel Loading Solution、製品番号 G2526

- DirectLoad™ Wide Range DNA Marker、製品番号 D7058
- Ethidium bromide, aqueous, 10 mg/mL、製品番号 E1510
- GenElute Plasmid Midiprep Kits、製品番号 PLD35, PLD140
- GenElute Plasmid Miniprep Kits、製品番号 PLN10, PLN70, PLN350

†PCRプロセスはHoffman-LaRoche, Inc.が保有する特許で保護されています。

DC,JWM,RK,KTA 09/05-1

Sigma ブランド製品は Sigma-Aldrich, Inc.を通じて販売されています。

Sigma-Aldrich, Inc.は同社製品がこの文書およびその他の Sigma-Aldrich 発行文書に含まれる情報に合致していることを保証します。お客様の個別の用途と製品の適合性についてはお客様にてご判断ください。掲載の品目、製品情報、価格などは予告なく変更される場合がございます。

納品伝票または同梱の内容明細書の裏面をご覧ください。