

この日本語版は英語版 June 2005 に対応します

QIAGEN® Plasmid Purification プロトコールとトラブルシューティング

QIAGEN Plasmid Mini、Midi、Maxi、Mega、
および Giga Kit

トランスフェクション・グレードの超高純度プラスミド
DNA 精製用

目次	ページ
プロトコール	
QIAGEN Plasmid Mini Kit を用いたプラスミドあるいは コスミド DNA 精製	2
QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit を用いたプラスミドあるいは コスミド DNA の精製	6
QIAGEN Plasmid Mega/Giga Kit を用いたプラスミドあるいは コスミド DNA の精製	11
QIAGEN-tip 100 あるいは QIAGEN-tip 500 を用いた 低コピー数のプラスミド / コスミドからの精製	16
トラブルシューティング	22



プロトコール： QIAGEN Plasmid Mini Kit を用いたプラスミドあるいはコスミド DNA 精製

本プロトコールは QIAGEN Plasmid Mini Kit を用いて高コピーのプラスミドあるいはコスミド DNA を最高 20 µg まで精製するためにデザインされています。コスミド、低コピー数のプラスミド、BAC、PAC、P1、二重鎖複製型 M13 などの精製に関しては www.qiagen.com/goto/plasmidinfo を参照してください。

実験を始める前の重要事項

- 新規ユーザーはこのハンドブックに記載されている詳細なプロトコールを利用されることを強くお勧めします。また、包括的なバックグラウンド情報も弊社ウェブサイトのプラスミド関連ページ www.qiagen.com/goto/plasmidinfo でご覧いただけます。
- オプション：☞ のマークがあるステップでは、分析用ゲル電気泳動によって実験の経過を確認するために、サンプルの一部を採取してください（英語版 Handbook 41 ページ参照）。

実験を始める前の重要事項

- 使用前に Buffer P1 にキットの RNase A 液を加えてください。RNase A の 1 バイアル分を使用前に軽く遠心し、Buffer P1 のボトルに添加すれば、最終濃度 100 µg / ml となります。
- 低温保存中に Buffer P2 に SDS の沈澱が生じていないかどうかを確かめてください。SDS の沈澱が生じているようであれば、37 °C に加温して SDS を溶かしてから使用してください。
- Buffer P3 は、あらかじめ 4 °C に冷却してから使用してください。
- オプション：使用前にキットに入っている LyseBlue 試薬を Buffer P1 に添加し、混和します。LyseBlue の 1 バイアル分を使用前に軽く遠心し、Buffer P1 のボトルに添加すれば、1000 倍に希釈されます。LyseBlue によりバッファーが最適に混和されたことを目で確認でき、非効率的な細胞溶解や SDS、ゲノム DNA、細胞破片の不完全な沈澱を引き起こす一般的な操作ミスを防ぐことができます。詳細は英語版 Handbook 14 ページの “ Using LyseBlue reagent ” をご覧ください。

操作手順

1. 新しく作製した選択プレートから単一コロニーを採取し、適切な抗生物質を含んだ LB 培養液 2 ~ 5 ml に接種する。37 °C で約 8 時間、激しく振盪培養する（約 300 rpm）。

培養液量の少なくとも 4 倍以上の容量を有するチューブあるいはフラスコを使用してください。

2. スターター培養液を500 ~ 1000倍に選択LB培養液3 mlで希釈する。37 °Cで12 ~ 16時間、激しく振盪培養し(~ 300 rpm) バクテリア細胞を培養する。

培養液量の少なくとも4倍以上の容量を有するフラスコや容器を使用してください。この培養条件下では培養細胞密度は約 $3 \sim 4 \times 10^9$ 個/mlに達し、湿重量にして通常、約3 g/lのペレットに相当します。

3. 4 °Cで6,000 x g、15分間遠心操作し、バクテリア細胞を収集する。
⊗ ここで操作を中断する場合は、収集したバクテリアペレットは-20 °Cに保存してください。

4. バクテリアペレットを0.3 mlのBuffer P1に再懸濁する。

Buffer P1にRNase Aを加えたことを確認してください。

LyseBlueをBuffer P1に添加している場合は、使用前に瓶を強く振って、LyseBlue粒子を完全に再懸濁します。細胞塊が無くなるまでボルテックスやピペティングによりバクテリアを完全に再懸濁します。

5. 0.3 mlのBuffer P2を添加後、4 ~ 6回激しく転倒させ十分に混和し、5分間室温(15 ~ 25 °C)に放置する。

ボルテックスするとゲノムDNAが切断されるのでボルテックスしないでください。ライセートは粘稠になります。溶菌反応は5分間以上行なわないでください。Buffer P2が空気中のCO₂を吸収して酸性になるのを防止するため、Buffer P2ボトルの使用後は、直ちにしっかりと蓋を閉じて保存してください。

LyseBlueをBuffer P1に添加している場合は、Buffer P2添加後に細胞懸濁液は青色になります。混和により溶液は均一な青色になります。溶液に無色の部分があったり、茶系色の細胞塊が観察される場合は、溶液が均一な青色になるまで混和してください。

6. 冷却したBuffer P3 0.3 mlを添加後、直ちに4 ~ 6回激しく転倒させて十分に混和した後、氷上で5分間インキュベートする

冷却したBuffer P3を使用して氷上でインキュベートすると沈澱が促進されます。Buffer P3を添加すると白色綿毛状の物質が形成され、ライセートの粘稠が少なくなります。沈澱物にはゲノムDNA、タンパク質、細胞の破片、およびドデシル硫酸カリウムなどが含まれています。ドデシル硫酸カリウム塩の沈澱が部分的に偏らないようにライセートを十分に混和してください。混合液が粘性をおび、茶色っぽい場合には、溶液を完全に中性化するためにさらに混ぜてください。

LyseBlue 試薬を使用している場合は、青色が消え懸濁液が無色になるまで十分に混和します。均一で無色な溶液はSDSが効率的に沈澱したことを示します。

7. 最高速度で10分間マイクロ遠心機で遠心操作する。プラスミドDNAを含む遠心上清液を素早く回収する。

遠心にかける前にサンプルを再度混ぜ合わせてください。1.5 mlあるいは2 mlのマイクロ遠心チューブを用いて最高速度で遠心操作を行ないます（マイクロ遠心機では10,000 ~ 13,000 rpm）。最高速度はほとんどのマイクロ遠心機では14,000 ~ 18,000 x gの遠心力に相当します。遠心後の上清は透明でなければなりません。上清が透明でない場合には、2回目の短い遠心操作を行なうことにより、浮遊物や粒子をカラムにアプライすることを避けることができます。浮遊物（このためにサンプルは濁る）はカラムの目詰まりの原因となり流速が落ちたり通過不能になります。

⇒ 清澄化ライセートから50 µlを採取し、分析用ゲル電気泳動用サンプルとして保存します（サンプル1）。

8. QIAGEN-tip 20にBuffer QBT 1 mlを加え、カラムが空になるまで自然落下させ、平衡化する。

廃液トレイの上にQIARackを置いてQIAGEN-tipsをセットするか、あるいは各キットに入っているチップホルダーを使用します（英語版Handbook 13ページの“Setup of QIAGEN-tips”参照）。平衡化バッファーに含まれている界面活性剤によって表面張力が減少すると、バッファーは、自然に流出し始めます。QIAGEN-tipに添加したバッファーを完全に流出させます。バッファーの液面がカラム中の上のフリットに達するとバッファーの流出は停止するので、QIAGEN-tipを見張っている必要はありません。

9. ステップ7で得られた遠心上清をQIAGEN-tip 20に添加し、自然落下により樹脂に浸透させる。

QIAGEN-tipに遠心上清を素早く添加します。遠心上清を長時間放置しておくと、タンパク質の沈澱が生じて混濁するので、再度遠心してQIAGEN-tipの目詰まりを防ぎます。

⇒ フロースルー液50 µlを分析用ゲル電気泳動用サンプルとして採取・保存します（サンプル2）。

10. QIAGEN-tip 20をBuffer QC 2 x 2 mlで洗浄する。

QIAGEN-tipにBuffer QCを添加し、自然落下により通過させます。

⇒ 1回目と2回目を一緒にした洗浄フラクションから220 µlを採取・保存し、分析用ゲル電気泳動用サンプル（サンプル3）とします。

11. Buffer QF 0.8 mlでDNAを溶出する。

溶出液を1.5 mlまたは2 mlのマイクロ遠心チューブ（別売）に集めます。

注：45 ~ 50 kb以上のコンストラクトに関しては、収量を増やすために溶出バッファーをあらかじめ65 °Cに温めます。

⇒ 45 µlの溶出液サンプルを採取し、ゲル電気泳動による分析用のサンプルとして使用します（サンプル4）。

12. 溶出液に0.7倍容量（0.8 mlの溶出液に対して0.56 ml）の室温のイソプロパノールを添加し、DNAを沈澱させる。直ちに10,000 rpm以上で30分間遠心し、その後上清を注意深く捨てる。

イソプロパノールによる沈澱は、塩の沈澱が生ずるのを防止するために全ての溶液を室温にして操作します。イソプロパノール添加によって得られるペレットは透明で、エタノール沈澱によって得られる塩を含む綿状のペレットに比べて見分けにくいことがあります。遠心操作をする前に、遠心チューブの外壁に標識しておくことでペレットの位置が簡単に見つけられます。またイソプロパノールによる沈澱物はチューブから剥がれやすいので、上清を取り除く際は注意が必要です。

13. DNAペレットを70%エタノール1 mlで洗浄し、10,000 rpmで10分間遠心操作する。ペレットが剥がれないように上清を静かに捨てる。

70%エタノールによって沈澱している塩を除去し、イソプロパノールを揮発しやすいエタノールに置き換えることによって、DNAが溶解しやすくなります。

14. ペレットを5～10分間空気乾燥して、適当な量のバッファー（例、TE buffer、pH 8.0あるいは10mM Tris·Cl、pH 8.5）でDNAを溶かす。

遠心チューブの内壁からDNAペレットをよく洗い落として全てのDNAを回収します。ピペティングによるDNAの再懸濁はDNAの切断を起すことがありますので避けてください。ペレットを乾燥させすぎると、DNAは溶けにくくなります。DNAは弱アルカリ性の条件下でよく溶けますが、酸性バッファーには溶けにくい性質をもっています。

収量の測定

DNAの収量を決める際には、UV分光光度計による260 nmでの測定とアガロースゲル電気泳動による定量分析を併用してDNAの濃度を決めます。分光光度計で正確なDNA定量を行なうためには、 A_{260} 測定値が0.1～1.0の間であるべきです。

アガロースゲル解析

精製操作の際にサンプルの一部を採取・保存することをお勧めします（サンプル1～4）。プラスミドDNAの収量や品質が低い場合は、アガロースゲル電気泳動でサンプルを解析し、精製操作のどのステージで問題が生じたかが判断できます（英語版 Handbook 41ページ参照）。

プロトコール： QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit を用いたプラスミドあるいはコスミド DNA の精製

このプロトコールで、高コピーまたは低コピーのプラスミドあるいはコスミド DNA を、QIAGEN Plasmid Midi Kit を使用する場合は 100 µg まで、QIAGEN Plasmid Maxi Kit を使用する場合は 500 µg まで精製可能です。コピー数 10 以下のプラスミドあるいはコスミドの精製に関するプロトコールは 16 ページを参照するかウェブサイト www.qiagen.com/goto/plasmidinfo をご覧ください。

クロラムフェニコール存在下で増幅したコピー数の少ないプラスミドの場合には、適切な培養液量を選択する際には高コピーのプラスミドとして処理してください。

お薦めする培養液量の上限 *

	QIAGEN-tip 100	QIAGEN-tip 500
高コピーのプラスミド	25 ml	100 ml
低コピーのプラスミド	100 ml	500 ml

* QIAGEN-tip 100 を用いて高コピーのプラスミドを精製する場合の予想収量は 75 ~ 100 µg、低コピーのプラスミドを精製する場合の予想収量は 20 ~ 100 µg です。QIAGEN-tip 500 を用いて高コピーのプラスミドを精製する場合の予想収量は 300 ~ 500 µg、低コピーのプラスミドを精製する場合の予想収量は、100 ~ 500 µg です。

実験を始める前の注意事項

- 新規ユーザーはこのハンドブックに記載されている詳細なプロトコールを利用されることを強くお薦めします。また、包括的なバックグラウンド情報もウェブサイトのプラスミド関連ページ www.qiagen.com/goto/plasmidinfo でご覧いただけます。
- 低コピーのベクターを精製する場合は、アルカリ溶解効率を高めその結果 DNA 収量を増やすために、溶解バッファー量を増やします。Buffer P1、P2、P3 が足りない場合は英語版 Handbook 44 ページの Appendix B “Composition of Buffers” をご覧ください。またバッファーの別途購入も可能です（英語版 Handbook 49 ページ参照）。
- オプション：☞ 表示のあるところでは、分析用ゲル電気泳動によって実験の経過を確認するために、サンプルの一部を採取してください（英語版 Handbook 41 ページ参照）。

実験開始前の準備事項

- 使用前に Buffer P1 にキットの RNase A 液を加えてください。RNase A の 1 バイアル分（使用前に軽く遠心する）を Buffer P1 のボトルに添加すれば、最終濃度 100 µg / ml となります。
- 低温保存中に Buffer P2 に SDS の沈澱が生じていないかどうかを確かめてください。SDS の沈澱が生じているようであれば、37 °C に加温して SDS を溶かしてから使用してください。
- Buffer P3 は、あらかじめ 4 °C に冷却してから使用してください。
- オプション：使用前にキットに入っている LyseBlue 試薬を Buffer P1 に添加し、混和します。LyseBlue の 1 バイアル分を使用前に軽く遠心し、Buffer P1 のボトルに添加すれば、1000 倍に希釈されます。LyseBlue によりバッファーが最適に混和されたことを目で確認でき、非効率な細胞溶解や SDS、ゲノム DNA、細胞破片の不完全な沈澱を引き起こす一般的な操作ミスを防ぐことができます。詳細は英語版 Handbook 14 ページの “ Using LyseBlue reagent ” をご覧ください。

操作手順

1. 新しく作製した選択プレートから単一コロニーを採取し、適切な抗生物質を含んだ 2 ~ 5 ml の LB 培養液に接種する。37 °C で約 8 時間、激しく振盪培養（約 300 rpm）する。
培養液量の少なくとも 4 倍以上の容量を有するチューブあるいはフラスコを使用してください。
2. スターター培養液を 500 ~ 1000 倍に選択 LB 培養液で希釈する。高コピーのプラスミドの場合はスターター培養液 25 ~ 50 µl (Midi) / 100 ~ 200 µl (Maxi) を培養液 25 ml (Midi) または 100 ml (Maxi) に接種する。低コピーのプラスミドの場合はスターター培養液 100 ~ 200 µl (Midi) / 250 ~ 500 µl (Maxi) を培養液 100 ml (Midi) または 500 ml (Maxi) に接種する。37 °C で 12 ~ 16 時間、激しく振盪培養し（約 300 rpm）バクテリア細胞を培養する。
培養液量の少なくとも 4 倍以上の容量を有するフラスコや容器を使用してください。この培養条件下では通常、培養細胞密度は約 $3 \sim 4 \times 10^9$ 個/ml に達し、湿重量にして約 3 g/l のペレットに相当します。
3. 4 °C で 6,000 x g、15 分間遠心操作し、バクテリア細胞を収集する。
◎ ここで操作を中断する場合は、収集したバクテリアペレットは -20 °C に保存してください。
4. バクテリアペレットを 4 ml (Midi) または 10 ml (Maxi) の Buffer P1 に再懸濁する。
バクテリアを効率よく溶解させるためには、溶解バッファーを完全に混和させるのに十分な容量を有する容器を使用することが大切です。Buffer P1 に RNase A を加えてあるかどうかを確認してください。

LyseBlue を Buffer P1 に添加している場合は、使用前に瓶を強く振って、LyseBlue 粒子を完全に再懸濁します。細胞塊が無くなるまでボルテックスやピペッティングによりバクテリアを完全に再懸濁させます。

5. 4 ml (Midi) または 10 ml (Maxi) の Buffer P2 を添加後、4 ~ 6 回激しく転倒させ十分に混和し、5 分間室温 (15 ~ 25) に放置する。

ボルテックスするとゲノム DNA が切断されるのでボルテックスしないでください。ライセートは粘稠になります。溶菌反応は 5 分間以上行なわないでください。Buffer P2 が空気中の CO₂ を吸収して酸性になるのを防止するため、Buffer P2 ボトルの使用後は、直ちにしっかりと蓋を閉じて保存してください。

LyseBlue を Buffer P1 に添加している場合は、Buffer P2 添加後に細胞懸濁液は青色になります。混和により溶液は均一な青色になります。溶液が無色の部分があったり、細胞塊が観察される場合は、溶液が均一な青色になるまで混和してください。

6. 冷却した Buffer P3、4 ml (Midi) または 10 ml (Maxi) を添加後、直ちに 4 ~ 6 回激しく転倒させて十分に混和した後、15 分間 (Midi) または 20 分間 (Maxi) 氷上でインキュベートする。

冷却した Buffer P3 を使用して氷上でインキュベートすると沈澱が促進されます。Buffer P3 を添加すると白色綿毛状の物質が形成され、ライセートの粘稠が少なくなります。沈澱物にはゲノム DNA、タンパク質、細胞の破片、およびドデシル硫酸カリウムなどが含まれています。ドデシル硫酸カリウム塩の沈澱が部分的に偏らないようにライセートを十分に混和してください。混合液が粘性を帯び、茶色っぽい場合には、溶液を完全に中性化するためにさらに混ぜてください。

LyseBlue 試薬を使用している場合は、青色が消え懸濁液が無色になるまで十分に混和します。均一で無色な溶液は SDS が効率的に沈澱したことを示します。

7. 4 、20,000 x g 以上で 30 分間遠心する。プラスミド DNA を含む遠心上清液を素早く回収する。

遠心にかかる前にサンプルを再度混ぜ合わせてください。遠心チューブはガラス製でないもの (例えば、ポリプロピレン製) を使用してください。遠心後の上清は透明でなければなりません。

注：ステップ 7 および 8 の遠心操作の代わりに QIAfilter Kit あるいは Cartridge を用いてろ過すると効率よく澄清化ライセートが得られます。

(www.qiagen.com/products/plasmid/LargeScaleKits 参照)

8. 回収した上清を 4 、20,000 x g 以上で 15 分間、再度遠心する。プラスミド DNA を含む上清を素早く回収する。

2 回目の遠心操作は、QIAGEN-tip に添加するサンプルに浮遊物や粒子が混入するのを避けるために行ないます。サンプルに懸濁物質が混入していると (不透明に見えるサンプル) QIAGEN-tip は目詰まりを起して流速が落ちたり、通過不能になります。

⇒ 240 µl (Midi) または 120 µl (Maxi) の透明なライセート遠心上清サンプルを採取し、分析用ゲル電気泳動用に (サンプル1) 保存し、培養、溶菌などの条件が最適であったかどうかを確認してください。

9. QIAGEN-tip 100 (Midi) あるいは QIAGEN-tip 500 (Maxi) に 4 ml (Midi) または 10 ml (Maxi) の Buffer QBT を加え、カラムが空になるまで自然落下させ、平衡化する。

平衡化バッファーに含まれている界面活性剤によって表面張力が減少すると、バッファーは自然に流出し始めます。QIAGEN-tip に添加したバッファーを完全に流出させます。バッファーの液面がカラム中の上のフリットに達するとバッファーの流出は停止するので、QIAGEN-tip を見張っている必要はありません。

10. ステップ 8 で得られた遠心上清を QIAGEN-tip に添加し、自然落下により樹脂に浸透させる。

QIAGEN-tip に遠心上清を素早く添加します。遠心上清を長時間放置しておく、タンパク質の沈澱が生じて混濁するので、再度遠心するか、あるいははる過すれば QIAGEN-tip の目詰まりを防ぐことができます。

⇒ 240 µl (Midi) または 120 µl (Maxi) のフロースルーサンプルを分析用ゲル電気泳動用 (サンプル 2) に採取保存しておき、後で QIAGEN Resin への DNA 結合効率を決定します。

11. QIAGEN-tip を 2 x 10 ml (Midi) または 2 x 30 ml (Maxi) の Buffer QC で洗浄する。

QIAGEN-tip に Buffer QC を添加し、自然落下により通過させます。1 回目の洗浄でプラスミド DNA サンプル中に混入している大部分の夾雑物を除去することができます。大量培養の場合、あるいは多量の炭水化物を産生する菌株を用いた場合には、2 回目の洗浄が特に必要です。

⇒ 1 回目と 2 回目を一緒にした洗浄フラクションから 400 µl (Midi) または 240 µl (Maxi) を採取保存し、分析用ゲル電気泳動用のサンプル (サンプル 3) とします。

12. 5 ml (Midi) または 15 ml (Maxi) の Buffer QF で DNA を溶出する。

溶出液を 15 ml または 50 ml の遠心チューブ (別売) に集めます。ポリカーボネイト製の遠心チューブの使用は次のステップで使用するアルコールに耐えられないためお薦めしません。

注: 45 ~ 50 kb 以上のコンストラクトに関しては、収量を増やすために溶出バッファーをあらかじめ 65 °C に温めます。

⇒ 100 µl (Midi) または 60 µl (Maxi) の溶出液を分析用ゲル電気泳動用サンプル (サンプル 4) として採取保存しておきます。

⊗ ここで操作を中断する場合は、溶出液は 4 °C で保存してください。一晩以上保存しておくことは避けてください。

13. 溶出したDNA液に3.5 ml (Midi) または10.5 ml (Maxi) の室温のイソプロパノール (0.7 倍容量) を添加し、DNAを沈澱する。混和した後直ちに、4、15,000 x g以上で30分間遠心する。遠心上清を注意深くデカントする。

全ての溶液は、塩の沈澱が生じるのを防止するために室温で保存しますが、遠心はサンプルのオーバーヒーティングを防ぐ目的で4で行ないます。ディスプレイのコニカル遠心チューブを用いて4、5,000 x gで60分遠心することもできます。イソプロパノールの添加によって得られるペレットは透明で、エタノール沈澱によって得られる塩を含む綿状のペレットに比べて検出が困難です。遠心操作前に、遠心チューブの外壁に印をつけておくと、ペレットがチューブのどの位置にあるかを判別しやすくなります。イソプロパノールペレットは、遠心チューブの内壁から剥がれやすくなっているため、遠心上清を捨てる際には十分に注意してください。

14. DNAペレットを2 ml (Midi) または5ml (Maxi) の70%エタノール (室温) で洗浄し、15,000 x g以上で10分間遠心する。ペレットが剥がれないように遠心上清を注意深くデカントする。

あるいは、ディスプレイのコニカル遠心チューブを用いて4、5,000 x gで60分遠心することもできます。70%エタノール洗浄によって、沈澱している塩が除去され、イソプロパノールが揮発しやすいエタノールに置き換えられるために、DNAが溶解しやすくなります。

15. DNAペレットを5~10分間、空気乾燥して、適切な量のバッファー (例えば、pH 8.0のTE、あるいはpH 8.5の10mM Tris-Cl) に溶解する。

ガラス製の遠心チューブを使用した場合には特に、遠心チューブの内壁からDNAペレットをよく洗い落として再溶解します。DNA切断の原因となるので、再懸濁するときにピペティング操作を繰り返し行なうことは避けてください。DNAペレットを乾燥させすぎると、再溶解しにくくなります。DNAは弱アルカリ性の条件下でよく溶けますが、酸性バッファーには溶けにくい性質もっています。

収量の測定

DNAの収量を決める際には、UV分光光度計による260 nmでの測定とアガロースゲル電気泳動による定量分析を併用してDNAの濃度を決めます。分光光度計で正確なDNA定量を行なうためには、 A_{260} 測定値が0.1~1.0の間であるべきです。

アガロースゲルによる分析

精製操作中、サンプルの一部 (サンプル1~4) を分取保存しておくことをお勧めします。プラスミドDNAの収量や純度に問題があるときなど、サンプルをアガロースゲル電気泳動で解析することにより、精製操作中のどの段階で問題が生じたか確認することができます (英語版 Handbook 41 ページを参照)。

プロトコール： QIAGEN Plasmid Mega/Giga Kitを用いたプラスミドあるいはコスミド DNA 精製

このプロトコールは、QIAGEN Plasmid Mega Kitを用いて高コピーあるいは低コピーのプラスミド、コスミドDNAを最高2.5 mgまで、QIAGEN Plasmid Giga Kitを用いて最高10 mgまで調製するためにデザインされています。細胞あたり10コピー数以下の低コピープラスミドあるいはコスミドからの調製は、16ページを参照するかウェブサイト www.qiagen.com/goto/plasmidinfo をご覧ください。

クロラムフェニコール存在下で増幅したコピー数の少ないプラスミドの場合には、適切な培養液量を選択する際には高コピーのプラスミドとして処理してください。

お勧めする培養液量の上限*

	QIAGEN-tip 2500	QIAGEN-tip 10000
高コピーのプラスミド	500 ml (ペレット湿重量 1.5 g)	2.5 リットラ - (ペレット湿重量 7.5 g)
低コピーのプラスミド	2.5 リットラ - (ペレット湿重量 7.5 g)	5 リットラ - [†] (ペレット湿重量 15 g) [‡]

* QIAGEN-tip 2500を用いて高コピーのプラスミドを精製する場合の予想収量は1.5 ~ 2.5 mg、低コピーのプラスミドでは0.5 ~ 2.5 mgです。QIAGEN-tip 10000を用いて高コピーのプラスミドを精製する場合の予想収量は7.5 ~ 10 mg、低コピーのプラスミドでは1 ~ 5 mgです。

[†] 通常振盪した培養液1リットラ - から平均湿重量約3 gのペレットが得られます。フォーメンテーションを用いた培養液では、ペレットの湿重量は著しく増加します。従って、このような培養液を使用する際は培養液量ではなく湿重量を参照してください。

[‡] 2倍量のアルカリ溶解バッファーが必要。

実験を始める前の注意事項

- 新規ユーザーはこのハンドブックに記載されている詳細なプロトコールを利用されることを強くお勧めします。また、包括的なバックグラウンド情報もウェブサイトのプラスミド関連ページ www.qiagen.com/goto/plasmidinfo でご覧いただけます。
- 低コピーのベクターを精製する場合は、アルカリ溶解効率を高めその結果DNA収量を増やすために、溶解バッファー量を増やします。Buffer P1、P2、P3が足りない場合は英語版 Handbook 44 ページの Appendix B “Composition of Buffers” をご覧ください。またバッファーの別途購入も可能です (英語版 Handbook 49 ページ参照)。
- オプション：☞ 表示のあるところでは、分析用ゲル電気泳動によって実験の経過を確認するために、サンプルの一部を採取してください (英語版 Handbook 41 ページ参照)。

実験開始前の準備事項

- 使用前に Buffer P1 にキットの RNase A 液を加えてください。RNase A の 1 バイアル分(使用前に軽く遠心する)を Buffer P1 に添加すれば、最終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ となります。
- 低温保存中に Buffer P2 に SDS の沈澱が生じていないかどうかを確かめてください。SDS の沈澱が生じているようであれば、37 に加温して SDS を溶かしてから使用してください。
- Buffer P3 は、あらかじめ 4 に冷却してから使用してください。
- オプション：使用前にキットに入っている LyseBlue 試薬を Buffer P1 に添加し、混和します。LyseBlue の 1 バイアル分を使用前に軽く遠心し、Buffer P1 のボトルに添加すれば、1000 倍に希釈されます。LyseBlue によりバッファーが最適に混和されたことを目で確認でき、非効率的な細胞溶解や SDS、ゲノム DNA、細胞破片の不完全な沈澱を引き起こす一般的な操作ミスを防ぐことができます。詳細は英語版 Handbook 14 ページの “ Using LyseBlue reagent ” をご覧ください。

操作手順

1. 新しく作製した選択プレートから単一コロニーを採取し、適切な抗生物質を含んだ LB 培養液 5 ~ 10 ml に接種する。37 で約 8 時間、激しく振盪培養 (約 300 rpm) する。

培養液量の少なくとも 4 倍以上の容量を有するチューブあるいはフラスコを使用してください。

2. スターター培養液を 1/500 ~ 1/1000 になるよう、選択 LB 培養液で希釈する。高コピーのプラスミドの場合はスターター培養液 500 ~ 1000 μl (Mega) / 2.5 ~ 5 ml (Giga) を培養液 500 ml (Mega) または 2.5 リッター (Giga) に接種する。低コピーのプラスミドの場合はスターター培養液 2.5 ~ 5 ml (Mega) / 5 ~ 10 ml (Giga) を培養液 2.5 リッター (Mega) または 5 リッター (Giga) に接種する。37 で 12 ~ 16 時間、激しく振盪培養し (約 300 rpm) バクテリア細胞を培養する。

培養液量の少なくとも 4 倍以上の容量を有するフラスコや容器を使用してください。この培養条件下では通常、培養細胞密度は約 $3 \sim 4 \times 10^9$ 個/ml に達し、湿重量にして約 3 g/l のペレットに相当します。

3. 4 で 6,000 x g、15 分間遠心操作し、バクテリア細胞を収集する。

注：培養液 5 リッターを用いた低コピープラスミドの Giga 調製では、非常に大量の細胞を回収するためにステップ 4 ~ 6 で使用する Buffer P1、P2、P3 の容量を 2 倍使用します。ルーチンで低コピープラスミドの Giga 調製を行なう場合、Buffer P1、P2、P3 を新たに購入する (英語版 Handbook 49 ページ参照) が、調製する必要 (英語版 Handbook 44 ページ参照) があります。

⊗ ここで操作を中断する場合は、収集したバクテリアペレットは -20 に保存してください。

4. バクテリアペレットを 50 ml (Mega) または 125 ml (Giga) の Buffer P1 に再懸濁する。

バクテリアを効率よく溶解させるためには、溶解バッファーを完全に混和させるのに十分な容量を有する容器を使用することが大切です。Mega 調製では 500 ml の容器、Giga 調製では 1000 ml の容器を推奨します。Buffer P1 に RNase A を加えてあるかどうかを確認してください。

LyseBlue を Buffer P1 に添加している場合は、使用前に瓶を強く振って、LyseBlue 粒子を完全に再懸濁します。細胞塊が無くなるまでボルテックスやピペッティングによりバクテリアを完全に再懸濁させます。

5. 50 ml (Mega) または 125 ml (Giga) の Buffer P2 を添加後、4 ~ 6 回激しく転倒させ十分に混和し、5 分間室温 (15 ~ 25) に放置する。

ボルテックスするとゲノム DNA が切断されるのでボルテックスしないでください。ライセートは粘稠になります。溶菌反応は 5 分間以上行なわないでください。Buffer P2 が空気中の CO₂ を吸収して酸性になるのを防止するため、Buffer P2 ボトルの使用後は、直ちにしっかりと蓋を閉じて保存してください。

LyseBlue を Buffer P1 に添加している場合は、Buffer P2 添加後に細胞懸濁液は青色になります。混和により溶液は均一な青色になります。溶液が無色の部分があったり、細胞塊が観察される場合は、溶液が均一な青色になるまで混和してください。

6. 冷却した Buffer P3 を、50 ml (Mega) または 125 ml (Giga) の添加後、直ちに 4 ~ 6 回激しく転倒させて十分に混和した後、30 分間氷上でインキュベートする。

冷却した Buffer P3 を使用して氷上でインキュベートすると沈澱が促進されます。Buffer P3 を添加すると白色綿毛状の物質が形成され、ライセートの粘稠が少なくなります。沈澱物にはゲノム DNA、タンパク質、細胞の破片、およびドデシル硫酸カリウムなどが含まれています。ドデシル硫酸カリウム塩の沈澱が部分的に偏らないようにライセートを十分に混和してください。

LyseBlue 試薬を使用している場合は、青色が消え懸濁液が無色になるまで十分に混和します。均一で無色な溶液は SDS が効率的に沈澱したことを示しています。

7. 4 、 20,000 x g 以上で 30 分間遠心する。プラスミド DNA を含む遠心上清を素早く回収する。

遠心にかかる前にサンプルを再度混和してください。遠心チューブは 250 ml あるいは 500 ml のガラス製でないもの (例えばポリプロピレン製、別売) を使用してください。

注：ステップ 7 および 8 の遠心操作の代わりに QIAfilter Kit あるいは Cartridge を用いて過すると効率よく清澄化ライセートが得られます。

(www.qiagen.com/products/plasmid/LargeScaleKits を参照)

8. 回収した上清を4、20,000 x g以上で15分間、再度遠心する。プラスミドDNAを含む上清を素早く回収する。

このステップは、QIAGEN-tipに添加するサンプルに浮遊物や粒子が混入するのを避けるために行ないます。サンプルに懸濁物質が混入していると（不透明にみえるサンプル）、QIAGEN-tipは目詰まりを起して流速が落ちたり、通過不能になります。

⇒ 120 µl (Mega) または 75 µl (Giga) の透明なライセート遠心上清サンプルを採取し、分析用ゲル電気泳動用サンプル(サンプル1)として保存し、培養、溶菌などの条件が最適であったかどうかを確認してください。

9. QIAGEN-tip 2500 (Mega)あるいはQIAGEN-tip 10000 (Giga)に35 ml (Mega) または 75 ml (Giga) のBuffer QBTを加え、カラムが空になるまで自然落下させ平衡化する。

平衡化バッファーに含まれている界面活性剤により表面張力が減少すると、バッファーは自然に流出し始めます。QIAGEN-tipに添加したバッファーを完全に流出させます。バッファーの液面がカラム中の上のフリットに達するとバッファーの流出は停止するので、QIAGEN-tipを見張っている必要はありません。

10. ステップ8で得られた遠心上清をQIAGEN-tipに添加し、自然落下により樹脂に浸透させる。

QIAGEN-tipに遠心上清を素早く添加します。遠心上清を長時間放置しておくと、タンパク質の沈澱が生じて混濁するので、再度遠心するか、あるいははる過すればQIAGEN-tipの目詰まりを防ぐことができます。

⇒ 120 µl (Mega) または 75 µl (Giga) のフロースルーサンプルを分析用ゲルサンプル(サンプル2)として採取保存しておき、後でQIAGEN ResinへのDNA結合効率を決定します。

11. QIAGEN-tipを合計200 ml (Mega) または 600 ml (Giga) のBuffer QCで洗浄する。

QIAGEN-tipにBuffer QCを添加し、自然落下により通過させます。1回目の洗浄でプラスミドDNAサンプル中に混入している大部分の夾雑物を除去することができます。大量培養の場合、あるいは多量の炭水化物を産生する菌株を用いた場合には、2回目の洗浄が特に必要です。

⇒ 1回目と2回目を一緒にした洗浄フラクションから160 µl (Mega) または 120 µl (Giga) を採取保存し、分析用ゲル電気泳動用サンプル(サンプル3)とします。

12. 35 ml (Mega) または 100 ml (Giga) のBuffer QFでDNAを溶出する。

ポリカーボネイト製の遠心チューブの使用は次のステップで使用するアルコールに耐えられないためお勧めしません。

⇒ 22 µl (Mega) または 20 µl (Giga) の溶出液を分析用ゲル電気泳動用サンプル(サンプル4)として採取保存しておきます。

注：45 ~ 50 kb以上のコンストラクトに関しては、収量を増やすために溶出バッファーをあらかじめ65 °Cに温めます。

⊗ ここで操作を中断する場合は、溶出液は4 で保存してください。一晩以上保存しておくことは避けてください。

- 13 溶出したDNA液に24.5 ml (Mega) または70 ml (Giga) の室温のイソプロパノール (0.7倍容量) を添加し、DNAを沈澱する。混和した後直ちに、4 、15,000 x g以上で30分間遠心する。遠心上清を注意深くデカントする。

全ての溶液は、塩の沈澱が生じるのを防止するために室温で保存しますが、遠心はオーバーヒーティングを防ぐ目的で4 で行ないます。ディスポーザブルのコニカル遠心チューブを用いて4 、5,000 x gで60分遠心することもできます。イソプロパノールの添加によって得られるペレットは透明で、エタノール沈澱によって得られる塩を含む綿状のペレットに比べて検出が困難です。遠心操作前に、遠心チューブの外壁に印をつけておくと、ペレットがチューブのどの位置にあるかを判別しやすくなります。イソプロパノールペレットは、遠心チューブの内壁から剥がれやすくなっているため、遠心上清を捨てる際には十分に注意してください。

14. DNAペレットを7 ml (Mega) または10 ml (Giga) の70%エタノール (室温) で洗浄し、15,000 x g以上で10分間遠心する。ペレットを失わないように遠心上清を注意深く傾瀉する。

あるいは、ディスポーザブルのコニカル遠心チューブ (別売) を用いて4 、5,000 x gで60分遠心することもできます。70%エタノール洗浄によって、沈澱している塩が除去され、イソプロパノールが揮発しやすいエタノールに置き換えられるために、DNAが溶解しやすくなります。

15. DNAペレットを10 ~ 20分間、空気乾燥して、適切な量のバッファー (例えば、pH 8.0のTE、あるいはpH 8.5の10mM Tris-Cl) に溶解する。

ガラス製の遠心チューブを使用した場合には特に、遠心チューブの内壁からDNAペレットをよく洗い落とし再溶解します。DNA切断の原因となるので、再懸濁するときにピペティング操作を繰り返し行なうことは避けてください。DNAペレットを乾燥させ過ぎると、再溶解しにくくなります。DNAは弱アルカリ性の条件下でよく溶けますが、酸性バッファーには溶けにくい性質をもっています。

収量の測定

DNAの収量を定める際には、UV分光光度計による260 nmでの測定とアガロースゲル電気泳動による定量分析を併用してDNAの濃度を決めます。分光光度計で正確なDNA定量を行なうためには、 A_{260} 測定値が0.1 ~ 1.0の間であるべきです。

アガロースゲルによる分析

精製操作中、サンプルの一部(サンプル1 ~ 4)を分取保存しておくことをお勧めします。プラスミドDNAの収量や純度に関心があるときなど、サンプルをアガロースゲル電気泳動で解析することにより、精製操作中のどの段階で問題が生じたか確認することができます (英語版 Handbook 41 ページを参照)。

プロトコール： QIAGEN-tip 100あるいはQIAGEN-tip 500を用いたコピー数の非常に低いプラスミド/コスミドからの精製

細胞当たりのコピー数が10以下のプラスミドやコスミドからある一定量のDNAを精製するためには大量の培養液が必要です（www.qiagen.com/goto/plasmidinfoを参照）。本プロトコールはQIAGEN-tip 100あるいはQIAGEN-tip 500を用いた調製に適しています。アルカリ溶解後、QIAGEN-tipにDNAを結合させる前に、ライセートの量を減らすために追加のイソプロパノール沈澱を行いません。培養液の量とtipのサイズは予想されるDNA量がQIAGEN-tipの結合量に相当するように選択されています。QIAGEN-tipを用いてのP1およびBAC DNA精製に関しては弊社テクニカルサポート部にお問い合わせください。BAC、PAC、P1 DNAのような大量のコスミド/プラスミドの精製にはQIAGEN Large-Construct Kitをご利用ください（英語版 Handbook 48 ページ “ ordering information ” 参照）。

低コピー数のプラスミドおよびコスミドの精製に用いる収量、培養液量、QIAGEN-tip サイズ、バッファー量の詳細を表3に記載しています。

表3. 細胞あたり10コピー数以下のプラスミドおよびコスミド精製用パラメーター

DNA 収量 *	最高 100 µg	最高 500 µg
培養液量	500 ml	2.5 l
Buffer P1 [†]	20 ml	125 ml
Buffer P2 [†]	20 ml	125 ml
Buffer P3 [†]	20 ml	125 ml
QIAGEN-tip	QIAGEN-tip 100	QIAGEN-tip 500
Buffer QBT (平衡用)	4 ml	10 ml
Buffer QC (洗浄用)	2 x 10 ml	2 x 30 ml
Buffer QF (溶出用)	5 ml	15 ml

* 低コピーのプラスミドを精製する場合の予想収量は、QIAGEN-tip 100で20 ~ 100 µg、QIAGEN-tip 500で100 ~ 500 µgです。

[†] 低コピー数のプラスミド/コスミド精製に必要な大量の細胞を効率的に溶解するために、Lysis Buffer P1、P2、P3の量は6 ~ 10ページのスタンダードのプロトコールで使用した量よりも多くなります。

実験を始める前の重要事項

- 新規ユーザーはこのハンドブックに記載されている詳細なプロトコルを利用されることを強くお勧めします。また、包括的なバックグラウンド情報もウェブサイトのプラスミド関連ページ www.qiagen.com/goto/plasmidinfo でご覧いただけます。
- 低コピーのベクターを精製する場合は、アルカリ溶解効率を高めその結果DNA収量を増やすために、溶解バッファー量を増やします。Buffer P1、P2、P3が足りない場合は英語版 Handbook 44 ページの Appendix B “Composition of Buffers” をご覧ください。またバッファーの別途購入も可能です（英語版 Handbook 49 ページ参照）。
- オプション：☞ 表示のあるところでは、分析用ゲル電気泳動によって実験の経過を確認するために、サンプルの一部を採取してください（英語版 Handbook 41 ページ参照）。

実験開始前の準備事項

- 使用前に Buffer P1 にキットの RNase A 液を加えてください。RNase A の 1 バイアル分（使用前に軽く遠心する）を Buffer P1 のボトルに添加すれば、最終濃度 100 µg / ml となります。
- 低温保存中に Buffer P2 に SDS の沈澱が生じていないかどうかを確かめてください。SDS の沈澱が生じているようであれば、37 °C に加温して SDS を溶かしてから使用してください。
- Buffer P3 は、あらかじめ 4 °C に冷却してから使用してください。
- オプション：使用前にキットに入っている LyseBlue 試薬を Buffer P1 に添加し、混和します。LyseBlue の 1 バイアル分を使用前に軽く遠心し、Buffer P1 のボトルに添加すれば、1000 倍に希釈されます。LyseBlue によりバッファーが最適に混和されたことを目で確認でき、非効率な細胞溶解や SDS、ゲノム DNA、細胞破片の不完全な沈澱を引き起こす一般的な操作ミスを防ぐことができます。詳細は英語版 Handbook 14 ページの “Using LyseBlue reagent” をご覧ください。

操作手順

1. 新しく作製した選択プレートから単一コロニーを採取し、適切な抗生物質を含んだ LB 培養液 2 ~ 10 ml に接種する。37 °C で約 8 時間、激しく振盪培養（約 300 rpm）する。
培養液量の少なくとも 4 倍以上の容量を有するチューブあるいはフラスコを使用してください。

2. スターター培養液 500 ~ 1000 μl (Midi) あるいは 2.5 ~ 5 ml (Maxi) を 500 ~ 1000 倍に選択 LB 培養液 (Midi) 500 ml あるいは (Maxi) 2.5 リッターで希釈する。37 で 12 ~ 16 時間、激しく振盪培養し (約 300 rpm) バクテリア細胞を培養する。

培養液量の少なくとも 4 倍以上の容量を有するフラスコや容器を使用してください。この培養条件下では通常、培養細胞密度は約 $3 \sim 4 \times 10^9$ 個/ml に達し、湿重量にして約 3 g/l のペレットに相当します。

3. 4 で 6,000 x g、15 分間遠心操作し、バクテリア細胞を収集する。
⊗ ここで操作を中断する場合は、収集したバクテリアペレットは -20 に保存してください
4. バクテリアペレットを 20 ml (Midi) または 125 ml (Maxi) の Buffer P1 に再懸濁する。

バクテリアを効率よく溶解させるためには、溶解バッファーを完全に混和させるのに十分な容量を有する容器を使用することが大切です。Buffer P1 に RNase A を加えたことを確認してください。

LyseBlue を Buffer P1 に添加している場合は、使用前に瓶を強く振って LyseBlue 粒子を完全に再懸濁します。細胞塊が無くなるまでボルテックスやピペッティングによりバクテリアを完全に再懸濁させます。

5. 20 ml (Midi) または 125 ml (Maxi) の Buffer P2 を添加後、4 ~ 6 回激しく転倒させ十分に混和し、5 分間室温 (15 ~ 25) に放置する。

ボルテックスするとゲノム DNA が切断されるのでボルテックスしないでください。ライセートは粘稠になります。溶菌反応は 5 分間以上行なわないでください。Buffer P2 が空気中の CO_2 を吸収して酸性になるのを防止するため、Buffer P2 ボトルの使用後は、直ちにしっかりと蓋を閉じて保存してください。

LyseBlue を Buffer P1 に添加している場合は、Buffer P2 添加後に細胞懸濁液は青色になります。混和により溶液は均一な青色になります。溶液が無色の部分があったり、細胞塊が観察される場合は、溶液が均一な青色になるまで混和を続けてください。

6. 冷却した 20 ml (Midi) または 125 ml (Maxi) の Buffer P3 を添加後、直ちに 4 ~ 6 回激しく転倒させて十分に混和した後、30 分間氷上でインキュベートする。

冷却した Buffer P3 を使用して氷上でインキュベートすると沈澱が促進されず。Buffer P3 を添加すると白色綿毛状の物質が形成され、ライセートの粘稠が少なくなります。沈澱物にはゲノム DNA、タンパク質、細胞の破片、およびドデシル硫酸カリウムなどが含まれています。ドデシル硫酸カリウム塩の沈澱が部分的に偏らないようにライセートを十分に混和してください。

LyseBlue 試薬を使用している場合は、青色が消え懸濁液が無色になるまで十分に混和します。均一で無色な溶液は SDS が効率的に沈澱したことを示します。

7. 4、20,000 x g以上で30分間遠心する。プラスミドDNAを含む遠心上澄液を素早く回収する。

遠心にかけの前にサンプルを再度混和してください。遠心チューブはガラス製でないもの（例えばポリプロピレン製、別売）を使用してください。遠心後の上清は透明でなければなりません。

8. 回収した上清を4、20,000 x g以上で15分間、再度遠心する。プラスミドDNAを含む上清を素早く回収する。あるいはひだに折って湿らせたろ紙にサンプルをアプライ、ろ過させる。

2回目の遠心操作はライセートから完璧に沈澱物質除去するために必要です。

☞ 600 µl (Midi) または 750 µl (Maxi) の透明なライセート遠心上清サンプルを採取し、分析用ゲル電気泳動用サンプル (サンプル1) として保存し、培養・溶菌などの条件が最適であったかどうかを確認してください

9. ライセートに42 ml (Midi) または262.5 ml (Maxi) の室温のイソプロパノール (0.7倍容量) を添加し、DNAを沈澱する。4、15,000 x g以上で30分間遠心し、遠心上清を注意深くデカントする。

このイソプロパノール沈澱によりサンプル量が減らせ、カラムへにアプライが容易になります。またこの操作によりタンパク質やリポ多糖類のような不必要な物質も除去します。

10. DNAペレットを500 µlのTE buffer、pH 8.0で再溶解し、最終容量がQIAGEN-tip 100 (Midi) では5 ml (Midi)、QIAGEN-tip 500 (Maxi) では12 ml (Maxi) になるようにBuffer QBTを添加する。

TE bufferによりDNAの再溶解が容易に行なわれます。Buffer QBTにより結合条件が最適になります。

11. QIAGEN-tip 100 (Midi) あるいはQIAGEN-tip 500 (Maxi) に4 ml (Midi) または10 ml (Maxi) のBuffer QBTを加え、カラムが空になるまで自然落下させ、平衡化する。

平衡化バッファーに含まれている界面活性剤によって表面張力が減少すると、バッファーは自然に流出し始めます。QIAGEN-tipに添加したバッファーを完全に流出させます。バッファーの液面がカラム中の上のフリットに達するとバッファーの流出は停止するので、QIAGEN-tipを見張っている必要はありません。

12. ステップ10で得られたDNA溶液をQIAGEN-tipに添加し、自然落下により樹脂に浸透させる。

☞ 50 µl (Midi) または24 µl (Maxi) のフロースルーサンプルを分析用ゲル電気泳動用サンプル (サンプル2) として採取保存しておき、後でQIAGEN ResinへのDNA結合効率を決定します。

13. QIAGEN-tipを2 x 10 ml (Midi) または2 x 30 ml (Maxi) のBuffer QCで洗浄する。

QIAGEN-tipにBuffer QCを添加し、自然落下により通過させます。1回目の洗浄でプラスミドDNAサンプル中に混入している大部分の夾雑物を除去することができます。大量培養の場合、あるいは多量の炭水化物を産生する菌株を用いた場合には、2回目の洗浄が特に必要です。

⇒ 1回目と2回目を一緒にした洗浄フラクションから200 µl (Midi) または120 µl (Maxi) を採取保存し、分析用ゲル電気泳動用サンプル(サンプル3)とします。

14. 5 ml (Midi) または15 ml (Maxi) のBuffer QFでDNAを溶出する。

ポリカーボネイト製の遠心チューブの使用は次のステップで使用するアルコールに耐えられないためお勧めしません。

注：45 ~ 50 kb以上のコンストラクトに関しては、収量を増やすために溶出バッファーをあらかじめ65 °Cに温めます。

⇒ 50 µl (Midi) または30 µl (Maxi) の溶出液を分析用ゲル電気泳動用サンプル(サンプル4)として採取保存しておきます。

⊗ ここで操作を中断する場合は、溶出液は4 °Cで保存してください。一晩以上保存しておくことは避けてください。

15. 溶出したDNA液に3.5 ml (Midi) または10.5 ml (Maxi) の室温のイソプロパノール(0.7倍容量)を添加し、DNAを沈澱する。混和した後直ちに、4 °C、15,000 x g以上で30分間遠心する。遠心上清を注意深くデカントする。

全ての溶液は、塩の沈澱が生じるのを防止するために室温で保存しますが、遠心操作はサンプルのオーバーヒーティングを防ぐために4 °Cで行ないます。ディスパーザブルのコニカル遠心チューブを用いて4 °C、5,000 x gで60分遠心することもできます。イソプロパノールペレットは透明で、エタノール沈澱によって得られる塩を含む綿状のペレットに比べて検出が困難です。遠心操作前に、遠心チューブの外壁に印をつけておくと、ペレットがチューブのどの位置にあるかを判別しやすくなります。イソプロパノールペレットは、遠心チューブの内壁から剥がれやすくなっているため、遠心上清を捨てる際には十分に注意してください。

16. DNAペレットを2 ml (Midi) または5 ml (Maxi) の70%エタノール(室温)で洗浄し、15,000 x g以上で10分間遠心する。ペレットが剥がれないように遠心上清を注意深く傾瀉する。

あるいはディスパーザブルのコニカル遠心チューブ(別売)を用いて4 °C、5,000 x gで60分遠心することもできます。70%エタノール洗浄によって、沈澱している塩が除去され、イソプロパノールが揮発しやすいエタノールに置き換えられるために、DNAが溶解しやすくなります。

17. DNAペレットを5～10分間、空気乾燥して、適切な量のバッファー（例えば、pH 8.0のTE、あるいはpH 8.5の10mM Tris-Cl）に溶解する。

ガラス製の遠心チューブを使用した場合には特に、遠心チューブの内壁からDNAペレットをよく洗い落として再溶解します。DNA切断の原因となるので、再懸濁するときにピペティング操作を繰り返し行なうことは避けてください。DNAペレットを乾燥させ過ぎると、再溶解しにくくなります。DNAは弱アルカリ性の条件下でよく溶けますが、酸性バッファーには溶けにくい性質をもっています

収量の測定

DNAの収量を定める際には、UV分光光度計による測定とアガロースゲル電気泳動による定量分析を併用してDNAの濃度を決めます。

アガロースゲルによる分析

精製操作中、サンプルの一部（サンプル1～4）を分取保存しておくことをお勧めします。プラスミドDNAの収量や純度に問題があるときなど、サンプルをアガロースゲル電気泳動で解析することにより、精製操作中のどの段階で問題が生じたか確認することができます（英語版Handbook 41ページを参照）。

トラブルシューティングガイド

コメント

DNA 収量が少ないか皆無

ライセート(サンプル1)中にDNAが存在しない

- a) プラスミドが増殖しなかった
- 弊社ウェブページ www.qiagen.com/goto/plasmidinfo の “ Growth of Bacterial Cultures ” を参照にして、最適な培養条件であることを確認する。
- b) アルカリ溶解が不十分
- プロトコールで指示されているよりも細胞の増殖が高密度、あるいは培養液量が多すぎた場合には、バクテリアと溶解液の適正量比が変わる。プラスミドDNAを効率よく解離させるための Buffer P1、P2とP3の量が不十分なために、このような条件下では溶解不良になる。培養液量を減らすか、または Buffer P1、P2とP3の液量を増す。
- 溶解試薬が十分に混和していないと収量が低下することもある。Buffers P1、P2、P3を添加後完全に混和して均一な溶液にする。LyseBlueを用いて混和が効率良く行なわれているか色で確認する。
- c) 低コピーのプラスミドを調製する際の溶解が不完全
- 低コピーのプラスミドを調製する際には、2倍容量の溶解 Buffer P1、P2とP3を添加すれば、プラスミドの収量、純度を上げることができる(16ページ、あるいは www.qiagen.com/goto/plasmidinfo を参照)。
- d) ライセート調製が不正確
- Buffer P2の低温保存によってSDSの沈澱ができる場合には、温めてSDSを溶かす。P2バッファの入っているボトルの使用後は、直ちに蓋をしっかりと閉めておく。溶解バッファは英語版 Handbook 45ページに掲載されている指示に従って調製する。
- 必要に応じて、新しい Buffer P1、P2、P3を調製する。

フロースルー分画（サンプル2）中にDNA

- a) カラムへのオーバーロード
それぞれのプロトコールのはじめに記載されている QIAGEN-tip の容量に対しての培養液量と収量の関係をチェックする。プロトコールの指示に従って培養液量を減らすか、または、高収量が必要なときには、さらに大きい容量の QIAGEN-tip を選択する。大量培養を必要とするコピー数が非常に少ないプラスミドあるいはコスミドを調製する場合には、16 ページを参照。
- b) SDS（またはその他のイオン性界面活性剤）がライセートに混在
Buffer P3 を使用前に冷却しておく。遠心後のライセートが透明であれば、遠心操作後すぐに QIAGEN-tip に添加する。ライセートが粘稠で、Buffer P3 と混和しにくいようであれば、培養液量を減らすか、Buffer P1、P2 と P3 の液量を増やす。LyseBlue を用いて混和が効率良く行なわれているか色で確認する。
- c) バッファー中に不適切な塩類が含まれているか、pH が不適切
研究室で準備されたバッファーが英語版 Handbook 45 ページに記載されている指示に従って作製されているか確かめる。
- d) カラムの流速が一定でない
QIAGEN-tip は室温（15 ~ 25 °C）で保存する。冷蔵保存、あるいは長期間、湿度の高い場所で保存するとレジンが塊りになっていることがある。使用前にカラムを振って使用すれば、この問題は解消される。

Buffer QC による洗浄分画（サンプル3）中にDNA

- a) カラムへのオーバーロード
それぞれのプロトコールのはじめに記載されている QIAGEN-tip の容量に対しての培養液量と収量の関係をチェックする。プロトコールの指示に従って培養液量を減らすか、高収量が必要なときには、さらに大きい容量の QIAGEN-tip を選択する。大量培養を必要とするコピー数が非常に少ないプラスミド、あるいはコスミドを調製する場合には16 ページを参照。
- b) Buffer QC が適正でなかった
Buffer QC に含まれる塩類濃度、pH は適正かどうかをチェックする。沈澱させて DNA を回収し、新しい QIAGEN-tip カラムを用いて精製する（ウェブページの www.qiagen.com/goto/plasmidinfo の “ Purification of plasmid DNA prepared by other methods ” 参照）。

コメント

溶出液 (サンプル 4) 中に DNA が存在しない

- a) ライセート中に DNA が存在しない 22 ページの “ ライセート (サンプル 1) 中に DNA が存在しない ” を参照
- b) 溶出用 Buffer QF あるいは QN が適正でない Buffer QF あるいは QN 中の塩類濃度、pH をチェックする。新しいバッファーで DNA を溶出・回収する。
- c) DNA がカラムを通過しフロースルーまたは洗浄分画に含まれていた 前の 2 項目を参照

沈澱後の DNA 収量が低いあるいは全く存在しない

- a) DNA が沈澱しなかった 沈澱を 15,000 x g 以上で 30 分間遠心したかどうかを確かめる。より高速で長時間遠心分離して DNA を回収する。別のバッチのイソプロパノールを試す。
- b) DNA ペレットを紛失 イソプロパノールの添加によって得られるペレットは透明で見分けにくい。遠心操作をする前に遠心チューブの外壁に印をつける。イソプロパノールペレットは、遠心チューブの内壁から剥がれやすくなっているため、遠心上清を静かに捨てる。
- c) DNA の再溶解が不十分 DNA が完全に再溶解したかをチェックする。特にガラス製のチューブと固定ローターを使用した場合には、DNA がすべて管壁から溶解されたかを確かめる。全 DNA の半分量は管壁にスメアー状に付着していることもある。一方、スウィング型のローターを使用すれば、チューブの底にペレットを局在化できる。

プラスミド DNA が溶けにくい

- a) ペレットが乾燥しすぎ 高分子量の DNA である場合は特に吸引装置を使用せずに空気乾燥とする。DNA を再溶解させる場合には、溶液を軽く温めて、時間をかけて溶かす。
- b) ペレット中にイソプロパノールが残存 イソプロパノールを除去するために、必ずペレットを 70 % エタノールで洗う。DNA を再溶解させるために軽く温め、時間をかけて溶かす。必要に応じて、再溶解のバッファーの量を増やす。
- c) ペレット中の塩含有量が高すぎる DNA を沈澱させるときに、イソプロパノールを室温で使用したか、またペレットを室温の 70 % エタノールで 2 回洗浄したかを確かめる。溶解用のバッファーの量を増やし DNA を回収する。

コメント

- d) バッファーのpHが低すぎた DNAは酸性バッファーには溶けにくい性質をもっているため、再溶解に使ったバッファーのpHが8.0以上であったかを確認する。
- e) 再溶解液の量が少なすぎた ペレットを覆っている溶液が極端に粘稠な場合は、再溶解液の量を増やす。

夾雑物を含むDNA / 純度の低いDNA

- a) 溶出液中のゲノムDNA バクテリアのライセートを激しく混和しすぎた。染色体DNAの切断を防ぐためには、Buffer P2とP3を加えた後のライセートを穏やかに取り扱うようにする。ライセートの粘稠性が高い場合には、培養液量を減らす。
- b) 溶出液中のRNA RNase Aによる分解が不十分。培養液量が適正であるかどうかをチェックし、必要に応じて培養液量を減らす。キットに入っているRNase Aを使用したことを確認する。Buffer P1が6ヶ月以上経過している場合はRNase Aを追加する。溶出液を沈澱し、RNase A分解を行ない、新しいQIAGEN-tipを用いた精製を行なってDNAを回収する(www.qiagen.com/goto/plasmidinfo のPurification of plasmid DNA prepared by other methods” 参照)。
- c) ヌクレアーゼの混入 バッファーにヌクレアーゼが混入していないかを確認し、必要に応じて新しいものと交換する。新しいガラス、プラスチック容器に換え手袋も着用する。
- d) 溶解時間が長すぎた 溶解ステップ (Buffer P2) で溶解時間が5分を超えていないかを確認する。
- e) アルカリ溶解を過剰に添加 QIAGEN-tipの容量に対する培養液量と収量をチェックする。培養液量を減らすか、あるいはBuffer P1、P2とP3の量を増やす。
- f) プラスミドDNAのニック/切断/分解 DNAの溶解バッファーが適当でない。ヌクレアーゼ活性を阻害し保存中のpHを安定に保つためには、pH 8.0のTEにDNAを再溶解する。
- g) 宿主菌がエンドヌクレアーゼを持っている www.qiagen.com/goto/plasmidinfo のバックグラウンド情報を参照し、*E. coli* 宿主菌株を変える。

コメント

- h) 再溶解の際の切断 ボルテックスや激しいピペティングを行わずに DNA を穏和に再溶解する。容量の小さなピペットチップを使用しない。
- i) 再溶解した DNA に粒子が混入 DNA 溶液を遠心して上清を新しいチューブに入れる。粒子は DNA 品質に影響しない。あるいは溶出液をろ過する QIAprecipitator の入った HiSpeed キットを使用する。

DNA の品質が低い

- a) ペレット中に過剰の塩が混入 沈澱のためのイソプロパノールを室温で使用したか、またペレットを室温の 70 % エタノールで 2 回洗浄したかを確認する。塩を除去するために DNA を再沈澱する。
- b) タンパク質が残存 培養液量が適正であるかどうかをチェックし、必要に応じて培養液量を減らす。20,000 x g 以上、45 分間の遠心、あるいは QIAfilter Cartridge によって得られたバクテリアライセートが、透明な溶液になっているかを確認する。

ゲル電気泳動分析における余分な DNA バンドがある

- a) プラスミドの二量体 プラスミド DNA の複製の際は、プラスミドスーパーコイル DNA の二量体と多量体が形成される。通常、精製したプラスミド DNA の電気泳動のゲルをエチジウムブロマイド染色すると、スーパーコイル DNA の単量体と二量体がみられる（英語版 Handbook 42 ページ、図 3 参照）。これらの比率はしばしば宿主菌に依存している。
- b) 変性スーパーコイルプラスミドが形成 この変性スーパーコイル DNA は、ゲル内では、閉環状 DNA より速く移動し、制限酵素には耐性である（英語版 Handbook 42 ページ、図 3 参照）。Buffer P2 を添加した後で 5 分間以上インキュベートしてはいけない。Buffer P3 の添加後、直ちに混和する。
- c) 欠失変異株の可能性 いくつかの塩基配列はプラスミド中で安定に維持されない。制限酵素分析によって欠損の有無をチェックする。特に、コスミドクローンの場合は、長期培養の大腸菌の中では不安定なので、新しく撒いたプレートの中で他のコロニーと重なっていないコロニーから調製しなくてはならない。

QIAGEN-tipの目詰まり

ライセートが濁っていた

カラムに添加する前にライセートが透明であるかを確認する。Buffer P3は使用前に冷えているかどうかを確認する。遠心力と遠心時間をチェックする。QIAfilter Cartridgeによってライセートを透明にすることも可能である。目詰まりを起こしたQIAGEN-tipを通過可能にするには、穴のあいたゴム栓に注射器を合わせたものなどで加圧する。

株式会社 キアゲン ■ 〒 104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II
Tel:03-6890-7300 ■ Fax:03-5547-0818 ■ E-mail:techservice.jp@qiagen.com



W W W . Q I A G E N . C O . J P