

QIAprep 96 *Plus* Miniprep プロトコールとトラブルシューティング

QIAprep 96 *Plus* Miniprep Kit

QIAprep 96 *Plus* BioRobot® Kit

大腸菌から 50 µg までの高品質なプラスミド DNA を
調製 (96 ウェル)

目次	ページ
プロトコール	
QIAprep 96 <i>Plus</i> Miniprep Kit を用いたプラスミド DNA 精製	2
トラブルシューティング	7



プロトコール：QIAprep 96 Plus Miniprep Kit を用いたプラスミド DNA 精製

本プロトコールは、ウェルあたり最高 5 ml の培養液（LB 培養液）から QIAprep 96 Plus Miniprep Kit を用いて 50 µg までの高コピー・プラスミド DNA を調製するために最適化されています。

実験を始める前の重要事項

- 引圧力状態の吸引マニホールドの近くで作業をする場合には、安全メガネを着用してください。
- QIAvac 96 マニホールドは常に安定した作業台の上に設置してください。
- 安全上の理由から、破損している 96 ウェルプレートは使用しないでください。
- 内破を防ぐため、耐圧仕様でない容器/材質を使用しないでください。ひびや傷のある容器を使用しないでください。
- **オプション**：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、プロトコールのステップ 5 以降でサンプルの一部を採取します。
- 吸引操作中に一定の吸引力を確保するために、各吸引ステップの間は必ず真空ポンプのスイッチを切ります。
- 5 ml の培養液を用いてプラスミド DNA の収量が予想に反して低い場合は、溶解バッファの量を増加することをお奨めします；350 µl の Buffer P1、350 µl の Buffer P2、350 µl の Buffer S3、300 µl の Buffer BB。高収量の DNA が予想される場合、溶出液を 100 ~ 120 µl に増加することができます。

実験開始前の準備事項

- 使用前に Buffer P1 に RNase A（キットに同梱）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。
- 使用前にエタノール（96 ~ 100%）を Buffer PE に添加します（添加容量は試薬ボトルのラベルを参照）。
- 低温保存中に Buffer P2 および Buffer BB に沈澱が生じていないかどうかを確かめてください。必要に応じて 37°C に加温して沈澱を溶かしてから使用してください。
- 空気中の CO₂ を吸収して Buffer P2 が酸性になるのを防止するため、使用後は Buffer P2 ボトルの蓋を閉じてください。
- 英語版 Handbook 12 ページを参照して QIAvac 96 を組み立ててください。操作を始める前に吸引圧を -300 mbar に調節します。

操作手順

1. 300 µl の Buffer P1 でバクテリアを再懸濁する。

重要： Buffer P1 に RNase A を加えたことを確認してください。

注： 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ペレットを完全に再懸濁させます。凍結細胞を使用する場合は、細胞が完全に解凍し、平底ブロックの中央にあることを確認します。細胞を平底ブロックで採取していない場合は、再懸濁した細胞を平底ブロックに移します。

2. 300 µl の Buffer P2 を各ウェルに添加する。平底ブロックの上部をペーパータオルで拭き、テープ（キットに同梱）でブロックをシールする。ブロックを静かに 6 ~ 8 回転倒混和し、室温（15 ~ 25℃）で 5 分間インキュベートする。

注： ブロックを静かに混和させることが重要です。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。必要に応じて、溶液が粘性を持ちわずかに透明になるまでブロックの混和を続けます。

重要： 溶菌反応は 5 分間以上行なわないでください。

3. ブロックのテープを取り除く。300 µl の Buffer S3 を各ウェルに添加する。平底ブロックの上部をペーパータオルで拭き、テープでブロックをシールする。ブロックを静かに 6 ~ 8 回転倒して混和する。

注： 沈殿が部分的に偏らないように、Buffer S3 の添加後すぐにサンプルを静かに、しかし完全に混和します。溶液は濁ってきます。

4. ブロックのテープを取り除く。組み立てた QIAvac 96 上にセットした TurboFilter 96 Plate のウェルにステップ 3 のライセートを移す。サンプルが TurboFilter 96 Plate のウェルを通過し S-Block (Square-Well Block) に到達するまで吸引 (-300 mbar) する。

注： TurboFilter 96 Plate の未使用のウェルはテープでシールします。

5. 全ての溶液が TurboFilter 96 Plate を通過した後、真空ポンプのスイッチを切り、QIAvac 96 の圧力をゆっくり戻す。

注： このステップの後、TurboFilter 96 Plate を廃棄します。

6. 300 µl の Buffer BB を S-Block の各ウェルの清澄化ライセートに添加する。S-Block の上部をペーパータオルで拭き、新しいテープでブロックをシールする。ブロックを 1 ~ 3 回転倒させて混和する。

7. QIAvac base の内側に Waste Tray をセットする。QIAvac base の上に QIAvac 96 Top Plate をセットする。QIAvac 96 Top Plate の上に Plasmid Plus 96 Plate をセットする。ライセートを S-Block から Plasmid Plus 96 Plate に移す。

注： Plasmid Plus 96 Plate の未使用ウェルはテープでシールします。

8. 全サンプルが完全に通過するまで吸引する。

注：溶液が全ウェルを通過後、真空ポンプのスイッチを切り、QIAvac 96 の圧力をゆっくり戻します。

9. DNA を洗浄するために、Plasmid Plus 96 Plate の各ウェルに 900 μ l の Buffer PE を添加する。全サンプルが完全に通過するまで吸引する。

注：溶液が全ウェルを通過後、真空ポンプのスイッチを切り、QIAvac 96 の圧力をゆっくり戻します。

10. プレートのメンブレンを乾燥するために、QIAvac 96 と遠心機あるいは吸引マニホールドを使用する。

注：このステップで空気をウェルに通すことで、メンブレンに残留している Buffer PE を除去できます。

遠心機を使用する場合は、Plasmid Plus 96 Plate を S-Block に置くか、溶出用マイクロチューブをセットしたラックにおいて、6,000 x g で 10 分間遠心操作する。

重要：ここで使用する S-Block あるいは溶出用マイクロチューブは本キットには同梱されていません。

吸引マニホールドを使用する場合は、Waste Tray を空にして QIAvac 96 に戻し、最大の吸引圧で 10 分間吸引する。スイッチを切って QIAvac 96 の圧力をゆっくりと戻す。QIAvac 96 Top Plate を base から持ち上げ (Plasmid Plus Plate 96 を top plate から持ち上げない)、液滴が垂れなくなるまで重ねたる紙上で top plate を激しく叩く。Plasmid Plus 96 Plate のノズルを清潔なる紙で拭き取る。

最大の吸引力をかけた場合のみ Buffer PE を効率的に除去することが可能です (すなわち吸引制御バルブあるいは leakage valve を開放した場合など)。

11. 遠心機あるいは QIAvac 96 を用いて DNA をプレートから溶出する。

注：DNA 溶出を最適に行なうために、Buffer EB を Plasmid Plus 96 Plate メンブレンの中央にアプライしてください。80 μ l の溶出バッファを用いた場合の平均溶出液量は 65 μ l です。

遠心機を使用する場合：

- 新しい溶出用マイクロチューブ・ラック (同梱) の上に Plasmid Plus 96 Plate を置く。
- Plasmid Plus 96 Plate の各ウェル中央に 80 μ l の Buffer EB を添加する。
- 3 分間放置後、6,000 x g で 1 分間遠心操作する。

QIAvac 96 を使用する場合：

- Elution Microtube Adapter を入れた Waste Tray を再セットする。あるいは、Elution Microtube Adapter の入手が不可能な場合は空の 96 ウェルマイクロプレートを使用する。
- 溶出用マイクロチューブがセットされたラックをアダプターの上に置く。
- QIAvac base の上に top plate を戻し、Plasmid Plus 96 Plate が確実にセットされているかを確認する。Elution Microtube Adapter の代わりにマイクロプレートを使用する場合は、Plasmid Plus 96 Plate のノズルが確実に溶出用マイクロチューブに入るようにセットする。
- Plasmid Plus 96 Plate の各ウェル中央に 80 μ l の Buffer EB を添加する。
- 3 分間放置後、最大の吸引圧で 1 分間吸引する。
- 吸引スイッチを切って QIAvac 96 の圧力をゆっくりと戻す。

QIAprep 96 Plus Miniprep 操作に遠心機を使用する方法

QIAprep 96 Plus Miniprep 操作は 96 ウェルブロックに適した遠心機を用いて行うことも可能です。開始前に遠心機に 96 ウェルプレートと S-Block をセットできるかどうか確認します。

下記に記述したように吸引ステップの代わりに遠心ステップを行いません。精製法における個々のステップの詳細は 3 ~ 4 ページのプロトコールを参照にしてください。

TurboFilter 96 Plate を用いたライセート清澄化

1. プロトコールのステップ 3 の後、S-Block の上に TurboFilter 96 Plate を置く。
2. ライセートを TurboFilter 96 Plate にアプライする。
3. 組み立てたコンポーネント（S-Block の上にセットした TurboFilter 96 Plate）をローターの中に入れる。
4. 3,000 x g 以上で 3 分間遠心操作する。

結合ステップ

5. プロトコールのステップ 6 の後、S-Block の上に Plasmid Plus 96 Plate を置く。
重要：このステップで使用する S-Block はキットに同梱されていません。
6. ライセートを Plasmid Plus 96 Plate にアプライする。
7. 組み立てたコンポーネント（S-Block の上にセットした Plasmid Plus 96 Plate）をローターの中に入れる。
8. 160 x g で 1 分間遠心操作する。

洗浄ステップ

9. S-Block の上に **Plasmid Plus 96 Plate** を置く。

重要: このステップで使用する S-Block はキットに同梱されていません。

10. それぞれの洗浄バッファを添加する。

11. 組み立てたコンポーネント (S-Block の上にセットした **Plasmid Plus 96 Plate**) をローターの中に入れる。

12. 160 x g で 1 分間遠心操作する。

乾燥ステップ

13. 溶出用マイクロチューブ・ラック (同梱) あるいは新しい S-Block の上に **Plasmid Plus 96 Plate** を置く。

重要: このステップで使用する S-Block はキットに同梱されていません。

14. 6,000 x g で 10 分間遠心操作する。

溶出ステップ

15. 新しい溶出用マイクロチューブ・ラック (同梱) の上に **Plasmid Plus 96 Plate** を置く。

16. プロトコールに記載されているように溶出バッファ (Buffer EB) を添加する (4 ページ)。

17. 組み立てたコンポーネント (溶出用マイクロチューブの上にセットした **Plasmid Plus 96 Plate**) をローターの中に入れる。

18. 6,000 x g で 1 分間遠心操作する。

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、清澄化ライセートの一部を分取保存しておくことをお勧めします (3 ページ、ステップ 5)。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。詳細は英語版 Handbook の Appendix B をご覧ください。

トラブルシューティング

コメント

収量が低い、あるいは全くない

カラムにアプライする前の清澄化ライセート中に DNA が存在しない

- a) プラスミドが
増殖しなかった 最適な培養条件であったかをチェックする。詳細は、www.qiagen.com/goto/plasmidinfo を参照する。
- 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密度が高すぎたり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、S3 の量が不十分なため、このような条件下では溶解が不完全になる。溶解バッファーに対するバイオマスの割合を改善するために培養液量を減らす。
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、S3 を添加後、完全に混和して均一な溶液にする。
- c) Buffer P2 あるいは
BB が沈澱 溶液を 37℃ に温めて溶解する。
- d) 細胞の再懸濁が不十分 ペレット化した細胞を Buffer P1 で完全に再懸濁する。均一な懸濁液が得られるまで Buffer P2 を添加しない。

DNA が洗淨フロースルー液中に存在する

洗淨バッファーに
エタノールが入って
いない 正確に洗淨バッファー (Buffer PE) を調製しなおす。

DNA の品質が低い

溶出液中に
洗淨バッファー中の
エタノールが残留して
いる 遠心機あるいは吸引装置を用いて Plasmid Plus 96 Plate のメンブレンを完全に乾燥したことを確認する (4 ページのステップ 10)。

コメント

ろ過中に TurboFilter 96 Plate が目詰まりを起こす

- | | |
|---|---|
| a) 過剰な培養液量を使用 | プロトコール中で指示されている量以上の培養液を使用しない。 |
| b) Buffer S3 を添加後の混和が不十分 | 溶液が濁るまでよく混和する。沈殿物が局所的に存在するのを回避するために、Buffer S3 を添加後、直ちに混和する。 |
| c) Buffer S3 添加後の混和が激し過ぎる | Buffer S3 を添加後、ライセートをすぐに、しかし穏和に混和する。激しく混和すると、綿毛状の沈澱が崩壊して微細な粒子を形成する。 |
| d) ブロックを攪拌した | Buffer S3 を添加後、静かに混和する。攪拌は DNA を切断する。 |
| e) Buffer S3 を添加後すぐに TurboFilter 96 Plate にロードしなかった | Buffer S3 を添加後、ライセートを即座に TurboFilter 96 Plate にロードする。 |
| f) 吸引力が弱すぎた | -200 から -600 millibar (-150 から -450 mm Hg) の吸引が可能な装置を使用する。 |

— Memo —

Trademarks: QIAGEN®, BioRobot® (QIAGEN Group).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載の QIAGEN 製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2010 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

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

