

Code No. 9085

TaKaRa

**Miniprep DNA
Purification Kit**

説明書

I. 製品説明

Miniprep DNA Purification Kitは、シリカメンブレンにDNAが吸着することを利用した、プラスミドDNAを迅速、簡便かつ確実に精製するためのキットです。20 kbpまでのサイズのプラスミドの調製に適しており、調製したプラスミドDNAはシーケンシングや他の酵素反応実験系にそのまま用いることができます。

一晚培養した1~10 mlの大腸菌培養液から1~20 µgのプラスミドDNAを得ることができます。また、アルカリプロテアーゼを使用しているため、HB101など*endA*⁺大腸菌株からもヌクレアーゼの混入のない高純度のプラスミドDNAを調製することができます。

II. 製品内容（50回用）

各容器の蓋に表示しているラベルの番号は、以下のコンポーネントナンバーと対応しています。

1. Cell Suspension Buffer	20 ml
2. Cell Lysis Buffer	20 ml
3. Neutralization Solution	30 ml
4. Wash Buffer*	20 ml
5. Alkaline Protease Solution	550 µl
6. Nuclease-free dH ₂ O	13 ml
Miniprep Spin Column	50本
Collection Tube（2 ml）	50本

*キットを使う前に、エタノール35 mlを加え最終容量を55 mlに調製する。

III. 保存 室温（22 - 25 が望ましい）

IV. キット以外に必要な試薬、器具（主なもの）

- ・ 微量遠心機（14,000 × gの遠心が可能なもの）
- ・ 1.5 mlマイクロ遠心チューブ（滅菌してあるもの）
- ・ 遠心機および対応するチューブ(培養液からの大腸菌回収用)
- ・ マイクロピペット
- ・ エタノール
- ・ 抗生物質を含むLB培地（プレートおよび液体培地）

V. 操作方法

A. 大腸菌の培養

フレッシュなプレートからシングルコロニーをとり、抗生物質を含むLB培地*¹に接種して、37℃、一晚（12～16時間）振とう培養する*²。
コピー数が多いプラスミドの場合は5 ml以下*³、コピー数が少ないプラスミドの場合は10 mlまでの培養液を使用することができる*⁴。

*¹ 培地はなるべくLB培地をご使用ください。高密度培養培地などを用いると菌体量が多すぎてプラスミドDNAがうまく調製できない場合があります。

*² 通常A₆₀₀=2～4となります。

*³ 一個のカラムに対して5 ml以上使用するとカラムの処理能力を超えるため、プラスミドDNAの収率が低下します。

*⁴ 使用量が10 mlを超えると溶菌が不十分となり、プラスミドDNAの純度が低下します。

B. 溶菌液の調製

1. 1 ~ 5 ml (高コピープラスミドの場合) または 10 ml (低コピープラスミドの場合) の培養液を 10,000 × g で 5 分間遠心する。
2. 上清を捨て、チューブをペーパータオルの上に逆さにして余分な培地を除去する。
3. Cell Suspension Buffer 250 μl を加える。ボルテックスまたはピペティングでペレットを完全に懸濁し、懸濁液を 1.5 ml のマイクロチューブに移す。
4. Cell Lysis Buffer 250 μl を加え、4 回転倒混和する (ボルテックスは避ける)。液がクリアーになっていればすぐ次の操作に進んでよい。もし、液がクリアーでなければ、クリアーになるまで室温で 1 ~ 5 分間放置する。ただし、5 分以上の放置は避ける。
5. Alkaline Protease Solution 10 μl を加え、4 回転倒混和する (ボルテックスは避ける) 室温で 5 分間放置する *1 *2。
*1 プラスミド DNA の損傷を避けるため Alkaline Protease Solution 添加後は 5 分以上放置しないでください。
*2 この操作は、HB101 など *endA*⁺ 株には必須です。JM109, DH5 など *endA*⁻ 株の場合、この操作を省略しても高純度のプラスミド DNA が得られます。
6. Neutralization Solution 350 μl を加えた直ちに 4 回転倒混和する (ボルテックスは避ける)。
7. 室温、14,000 × g で 10 分間遠心する。

注意：ゲノムDNAの混入を防ぐため、Step4以降はボルテックスは避け、転倒混和により混合してください。

C. プラスミド DNA の精製

使用前に Wash Buffer (20 ml) にエタノール 35 ml を加え、55 ml に調製してください。

1. Miniprep Spin Column を Collection Tube にセットする。
2. B-7 で調製した溶菌液上清 (約 850 μl) を Miniprep Spin Column に移す。このとき、白い沈殿物を持ち込まないように注意する *1。
*1 沈殿物が混入した場合は Miniprep Spin Column 内の液を 1.5 ml マイクロチューブに移し、5 ~ 10 分遠心して上清を Miniprep Spin Column に戻してください。
3. 室温、14,000 × g で 1 分間遠心する。Collection Tube から Miniprep Spin Column をはずし、ろ液を捨てて再び Miniprep Spin Column をセットする。
4. エタノールを加えた Wash Buffer 750 μl を Miniprep Spin Column に加える。
5. 室温、14,000 × g で 1 分間遠心する。Collection Tube から Miniprep Spin Column をはずし、ろ液を捨てて再び Miniprep Spin Column をセットする。
6. エタノールを加えた Wash Buffer 250 μl を Miniprep Spin Column に加える。
7. 室温、14,000 × g で 2 分間遠心する。
8. Miniprep Spin Column を 1.5 ml 容マイクロチューブに移す *2。
*2 Wash Buffer を持ち込まないように注意してください。持ち込んでしまった場合は、1 分間遠心して、Miniprep Spin Column を新しいマイクロチューブに移してください。
9. Miniprep Spin Column に Nuclease-free dH₂O 100 μl を加える。
10. 室温、14,000 × g で 1 分間遠心し、DNA を溶出する。
11. Miniprep Spin Column を取り外し、チューブの蓋を閉めて、-20 °C に保存する *3。
*3 4 °C で保存する場合は 10 μl の 10 × TE バッファーを加えてください。ただし、シークエンスに用いる場合には TE の添加はお勧めできませんので、そのまま -20 °C で保存してください。

VI. プラスミドDNAの収量

プラスミドDNAの収量はプラスミドのコピー数や使用する菌株、培地の種類、菌数によって変わる。コピー数の多いプラスミドの場合、たとえば、DH5⁺を宿主とした1.5 ml LB培地のオーバーナイト培養液から3.5 ~ 5.0 μ gのプラスミドDNAを得ることができる。

コピー数の少ないプラスミドの場合、同様に培養した10 mlの培養液からの収量は1.5 ~ 3.0 μ gである。

VII. トラブルシューティング

現象	考えられる原因	コメント
クリアな溶菌液が得られない	菌体量が多すぎる	使用する菌体量を減らしてください。培養には抗生物質を含むLB培地をご使用ください。(コピー数の少ないプラスミドは最大10 ml、コピー数の多いプラスミドは5 mlまで)
	菌体ペレットの懸濁が不十分	溶菌の前に菌体を確実に懸濁してください。Cell Suspension Bufferを加え十分にボルテックスまたはピペティングしてください。細菌の固まりがみえる状態では、懸濁が不十分です。
プラスミドDNAが回収できない	Wash Bufferにエタノールが加えられていない	操作を始める前に、Wash Bufferにエタノールを加えてください。
プラスミドDNAの回収率が低い	プラスミドのっていない大腸菌が増殖している	抗生物質が全ての液体、固体培地に入っていることを確認してください。
	大腸菌が古い	プレートで一晩培養した新鮮なシングルコロニーを抗生物質が入った液体培地に接種してください。 37 [°] で12-16時間培養してください。
	コピー数が少ないプラスミドを使用している	使ったプラスミドのコピー数を調べてください; 可能であれば、コピー数が多いプラスミドの使用をおすすめします。
プラスミドDNAが損傷を受けている	アルカリ溶解後、放置しすぎている	Cell Lysis Bufferを添加・混合後は、液がクリアーになり次第、次のステップに進んでください。Alkaline Protease Solutionを添加した後5分以上放置しないでください。

現象	考えられる原因	コメント
分光光度計の定量と比ベゲルで測ったDNAの回収量が少ない	DNA中の不純物が原因で分光光度計で正しい測定ができなかった	C-8でWash Bufferを持ち込んだ場合にも、分光光度計の測定値に影響が出ることがあります。回収したプラスミドDNAをフェノール/クロロホルム抽出しエタノール沈殿で再回収し、測定し直してください。
ゲノムDNAの混入	ゲノムDNAの断片化	ゲノムDNAの損傷を防ぐため、Cell Lysis Bufferを加えた後の操作ではボルテックスで混合しないでください。
	Wash Bufferにエタノールが加えられていない	操作Wash Bufferにエタノールが添加されていることを確かめてください。
オートシーケンサーでの解析の結果が不十分	シーケンシング反応に加えたDNAが少なすぎる	新しいIL B 培地に新鮮な大腸菌のシングルコロニーを接種してください。また、分光光度計の測定値が不正確な場合もありますので、アガロースゲル電気泳動を利用した定量も行ってください。
	DNAの溶出にTEバッファーを使用	プラスミドDNAを再精製し、Nuclease-free dH ₂ Oに置換してください。
制限酵素消化されない	制限酵素の濃度と消化時間が不適当	制限酵素の量やインキュベーション時間を増やしてください。酵素に至適のバッファーを用いて至適温度で消化を行ってください。特に至適塩濃度が低い酵素の場合にはすべての塩を除去するため、エタノール沈殿を行うことをおすすめします。

VIII. エンドヌクレアーゼ I について

エンドヌクレアーゼ I は大腸菌の持つ 12 kDa のペリプラズムタンパク質で、二本鎖 DNA 分解活性を持っている。大腸菌の菌株のうち、遺伝子型に *endA1* を持つものはエンドヌクレアーゼ I をコードする *endA* 遺伝子に変異があり、ヌクレアーゼ活性を失っている (*endA⁻*)。遺伝子型に *endA1* (または *endA*) がないものは野生型で、エンドヌクレアーゼ活性を持っている (*endA⁺*)。 *endA⁺* の菌株から簡便法でプラスミド DNA を抽出すると、エンドヌクレアーゼ I が混入し、プラスミドの純度に影響を与えることがある。

本キットは溶菌液の調製の工程に Alkaline Protease Solution を用いているためエンドヌクレアーゼ I を不活化し、*endA⁻*、*endA⁺* 両方の菌株から高純度のプラスミド DNA を得ることができる。

アルカリプロテアーゼはエンドヌクレアーゼ I だけでなく他の大腸菌タンパク質も分解するためプラスミド DNA の純度を上げることができる。ただし、調製したプラスミド DNA を蛍光シークエンサーでシークエンシングする場合には *endA⁻* 株を使用することが望ましい。アルカリプロテアーゼ (subtilisin Carlsberg) は *Bacillus licheniformis* より調製されている。本酵素の至適 pH は 9 以上なので、Neutralization Solution 添加後はほとんど活性を示さない。

表 1. *E. coli endA⁻* および *endA⁺* 株のリスト

<i>endA⁻</i>	<i>endA⁺</i>
DH5	CJ236
JM109	HB101
NovaBlue	MV1184
XL1-Blue	TH2
DH10B	

IX. バッファーおよび溶液の組成

10 X TE buffer	LB 培地
100 mM Tris-HCl (pH 7.5)	1% casein peptone
10 mM EDTA	0.5% yeast extract
	0.5% NaCl
	1.5% agar (プレートのみ)

X. 参考文献

- 1) Guntelberg, A.V. and Otteson, M. (1954) *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* **29**, 36.
- 2) Ahle, W. *et al.* (1993) Rational protein engineering and industrial application: structure prediction by homology and rational design of protein-variants with improved 'washing performance'-the alkaline protease from *Bacillus alcalophilus*. *J. Biotechnol.* **28**, 31.
- 3) Van der Osten, C. *et al.* (1993) Protein engineering of subtilisins to improve stability in detergent formulations. *J. Biotechnol.* **28**, 55.
- 4) Vetter, R. *et al.* (1994) Highly alkaline proteases. U. S. Pat. No. 5,352,603. (October 4, 1994).
- 5) Shetty, J.K., Patel, C.P. and Nicholson, M.A. (1995) Method of preparation of purified alkaline protease. U. S. Pat. No. 5,439,817. (August 8, 1995).
- 6) Kahn, M. *et al.* (1979) Plasmid cloning vehicles derived from plasmids *ColE1*, *F*, *R6K*, and *RK2*. *Meth. Enzymol.* **68**, 268.

本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床用診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品として使用しないでください。

製品についての技術的なお問い合わせ先

TakaRa テクニカルサポートライン

Tel 077-543-6116 Fax 077-543-1977

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社