

無細胞くん：テンプレート用プラスミドDNA精製例

1. はじめに

“無細胞くん”に用いるテンプレート用プラスミドDNAの精製方法の一例を紹介します。市販のプラスミド精製キットや一般的な精製方法で“無細胞くん”によるタンパク質発現量が低い場合などで発現量が向上する場合があります。

参考文献: Kigawa T, et. Al Cell-free Protein Synthesis Methods and Protocols (Spirin, A. S. & Swartz, J. R., eds.), 84-97

2. 使用器具及び試薬

2. 1. 使用機具

A	50 ml 遠沈管	4 本
B	冷却遠心機	1 台
C	50 ml 用アングルローター	1 台
D	2 ml 用アングルローター	1 台
E	ブロックヒーター	1 台
F	吸引ポンプ	1 台
G	吸引瓶	1 台
H	1 ml ピペット	1 本
I	1000 μ l ピペットチップ	---
J	5 ml ピペット	1 本
K	5000 μ l ピペットチップ	---
L	50 ml チューブ	1 本
M	Miracloth (7-8cm 四方に切ったもの)*	1 枚(片)
N	Wizard Midi-Prep Column**	2 本
O	1000 ml ねじ口瓶	7 本
P	500 ml ねじ口瓶	1 本
Q	250 ml ねじ口瓶	4 本
R	2000 ml ビーカー	1 個
S	1000 ml ビーカー	4 個
T	500 ml ビーカー	1 個
U	200 ml ビーカー	4 個
V	1000 ml メスシリンダー	1 個
W	500 ml メスシリンダー	1 個
X	200 ml メスシリンダー	1 個
Y	葉さじ・スパチュラ	---
Z	マグネティックスターラー	1~2 台

AA	スターラーバー	1~2 個
AB	1.5 ml チューブ	5 個

* :Miracloth:

メーカー CALBIOCHEM

製品コード 475855

内容量 18 in×50 ft (1 roll)

** :Wizard Midi-Prep Column:

メーカー Promega

製品コード A7651

内容量 100 本

2. 2. 使用試薬

2. 2. 1. 準備する試薬

試薬名	使用量
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	12.1 g
Ethylenediaminetetraaceticacid Disodium Salt (EDTA)	93.1 g
Hydrochloride (HCl)	---
Sodium Hydroxide (NaOH)	---
Ribonuclease A from bovine pancreas (RNase A)	100 mg
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	20 g
Potassium Acetate (KOAc)	230 g
Acetic Acid (AcOH)	---
Guanidine Hydrochloride (Guanidine HCl)	670 g
2-propanol	400 ml
Ethanol (EtOH)	1100 ml
Milli-Q 水	---
Wizard DNA Purification Resin*	20 ml

* :Wizard DNA Purification Resin:

メーカー Promega

製品コード A7701

内容量 1,000 ml

2. 2. 2. 使用試薬

試薬名	使用量
Cell Resuspension Solution	10 ml
Cell Lysis Solution	10 ml
Neutralization Solution, pH 4.2	10 ml
Pre-Wash Solution	30 ml
Column Wash Solution	60 ml
milli-Q 水 (滅菌処理したもの)	適量

3. 試薬調製方法

(1) Cell Resuspension Solution

500mM Tris-HCl, pH 7.5	100 ml
500mM EDTA	20 ml
RNaseA	100 mg
milli-Q 水	up to 1000 ml

=Stock Solution=

○500mM Tris-HCl, pH 7.5(at 25°C)

Tris	12.12 g
HCl conc.	pH 調製 ----- ml
milli-Q 水	up to 200 ml

○500mM EDTA

EDTA	93.06 g
NaOH	溶解するまで
milli-Q 水	up to 500 ml

(2) Cell Lysis Solution

NaOH (特級)	8 g
10% SDS	100 ml
milli-Q 水	up to 1000 ml

=Stock Solution=

○10% SDS

SDS	20 g
milli-Q	up to 200 ml

(3) Neutralization Solution

KOAc (特級)	129.624 g
2M AcOH pH 調製、pH 4.2	----- ml
milli-Q	up to 1000 ml

=Stock Solution=

○2M AcOH	
AcOH	11.4 ml
milli-Q	up to 100 ml

(4) Pre-Wash Solution

7M Guanidine HCl	600 ml
2-propanol	400 ml

=Stock Solution=

○7M Guanidine HCl	
Guanidine HCl	669 g
milli-Q	up to 1000 ml

(5) Column Wash Solution

5M KOAc	32 ml
500mM Tris-HCl, pH 7.5	33.2 ml
500mM EDTA	0.16 ml
EtOH (特級)	1100 ml
milli-Q	674.8 ml

=Stock Solution=

○5M KOAc	
KOAc	98.14 g
milli-Q	up to 200 ml

4. プラスミド DNA 精製方法

- (1) 200 ml LB 培地 (必要抗生物質添加したもの) に鑄型プラスミドを含む大腸菌を植菌する
- (2) 37℃で一晩振とう培養する
- (3) 50 ml 遠沈管に培養液を移す
- (4) 10,000×g、4℃、10 分間遠心する
- (5) 上清を捨てる
- (6) 冷滅菌水に懸濁し、1 本にまとめる
- (7) 10,000×g、4℃、10 分間遠心する
- (8) 上清を捨て、ウエス (キムワイブ等) の上に逆さに置き、培地・水をしっかり取り除く
- (9) この菌体が入った 50 ml 遠沈管に Cell Resuspension Solution 10 ml を加えてボルテックスで完全に懸濁する

*菌の塊が残っていると、綺麗なプラスミドが得られないのでしっかり懸濁すること

- (10) これに Cell Lysis Solution 10 ml を加え、すぐに蓋をして優しく 3~4 回程度転倒混和する

*ボルテックスは使用しない

**3 分以上の放置しないこと

- (11) すぐに蓋を開け、この溶菌液に Neutralization Solution 10 ml を加える

- (12) 蓋をして、優しく 3~4 回転倒混和する

*ボルテックスは使用しない

- (13) バランスをとり、14,000×g、4℃、15 分間遠心する

- (14) 遠心時に 1.5 ml チューブ (滅菌済) に 1 ml 程度の滅菌 milli-Q 水を入れてブロックヒーターを用いて 70℃に加温する

- (15) 50 ml チューブに Miracloth をカップ上になるように折り、載せておく

- (16) Wizard Midi-Prep Column (以下 Column) を 2 本準備しておく

- (17) 遠心終了後直ちに Miracloth をのせた 50 ml チューブに上清を注ぐ

- (18) 50 ml チューブ上の Miracloth を廃棄する

- (19) この DNA 溶液に Wizard DNA purification Resin (よく懸濁したもの) を 20 ml 加える

- (20) 蓋をして軽く混ぜる

- (21) DNA 溶液/Resin を 2 本の Column に移す (1 本 15 ml 程度)

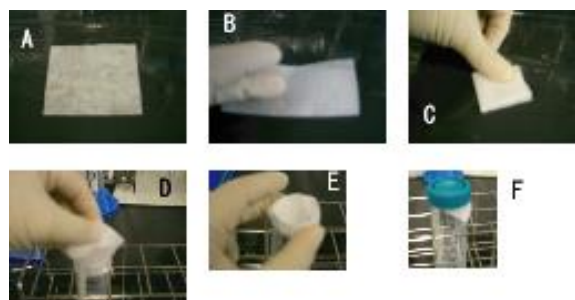
- (22) 吸引装置に Column をセットし吸引する

- (23) 残りの DNA 溶液/Resin を 2 本に均等に移す

- (24) 完全に吸引する

- (25) 各 Column に Pre-Wash Solution を 15 ml ずつ加える

- (26) 液が Column 内になくなるまで吸引する



A: Miracloth 7~8cm 四方にカットしたものを 1 枚用意する

B: 半分に折る

C: さらに半分に折る

D: 片方の一面を開いてチューブにのせる

E: チューブからはみ出た部分を折り返しチューブにかぶせる

F: チューブの蓋をして放置する

図 1. Miracloth のセッティング

- (27) 各 Column に Column Wash Solution を 15 ml ずつ加える
- (28) 液が Column 内になくなるまで吸引する
- (29) 各 Column に Column Wash Solution を 15 ml ずつ加える
- (30) 液が Column 内に完全になくなるまで吸引する
- (31) さらに 30 秒吸引を続ける
- (32) Column の図のように切り離し、樹脂が入っている下部の方を 1.5 ml チューブにのせる
- (33) 10,000 rpm で 2 分間遠心し、樹脂中の液を完全に除く
- (34) Column の下部を新しい 1.5 ml チューブにのせかえる
- (35) 予め 70°C に加温した滅菌 milli-Q 水を 300 μ l ずつ Column に入れる
- (36) 1 分間静置する
- (37) 10,000 rpm で 2 分間遠心する
- (38) カラムを廃棄し、氷上で保管する
- (39) DNA 溶液を濃度及び純度測定用に少量採りおき、残りを -20°C で保存する
- (40) DNA 溶液を滅菌 milli-Q 水で 100 倍希釈し、スペクトル (200-300 nm) 測定または 260 nm、280 nm の吸光度測定をする
- (41) 260 nm、280 nm の吸光度から純度と濃度を換算する

• DNA 濃度: 以下の式より換算する

$$[\text{DNA 濃度 } \mu\text{g/ml}] = A_{260} / e_{260} \times \text{希釈倍率}$$

• 純度: 以下の式より求める→高純度であると 1.8-2.0 になる

$$[\text{DNA 純度}] = A_{260} / A_{280}$$

A_{260} : サンプルの 260 nm の吸光度

A_{280} : サンプルの 280 nm の吸光度

e_{260} : DNA 1 mg/ml の 260 nm の吸光度 = 0.02