

無細胞くん®に適したプラスミド精製キットのご紹介

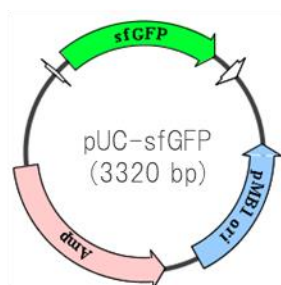
無細胞くんを用いたタンパク質合成には、T7 プロモーター、SD 配列、目的タンパク質の遺伝子、T7 ターミネーターを含むプラスミド、もしくは直鎖 DNA がご利用いただけます。各社から様々なプラスミド精製キットが市販されており、無細胞くんに使うプラスミドはといったどのキットを使ったらよいのか迷ってしまうかもしれません。ここでは、3種類の市販のキットを用いて精製したプラスミドを鋳型 DNA として、無細胞くんで合成を行ったときの結果をご紹介します。

1. 概要

プラスミド pUC-sfGFP*を
形質転換した大腸菌を培養
(*SuperfolderGFP を発現するプラスミド)



3社のキットで
プラスミドを抽出

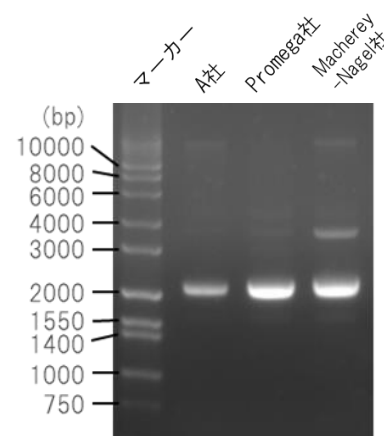


無細胞くんを用いて
sfGFP を合成し、
蛍光強度を比較



2. プラスミド抽出

1. pUC-sfGFP プラスミドを TOYOBO 社 Competent high DH5 α (Code No. DNA-903F) に形質転換し、LB/Amp プレートにまいて 37°C で一晩インキュベートしました。
2. 得られたコロニーのひとつを 500 mL の LB/Amp 液体培地に植菌し、37°C で一晩 (15 時間)、振盪培養しました。
3. 各キットのプロトコルに従ってプラスミド抽出を実施しました。
プラスミドの溶出は Milli-Q 水で行いました。
4. Thermo Scientific™ NanoDrop™ で 260 nm の吸光度を測定し、プラスミド濃度を定量しました。
5. 1% Agarose ゲル (TAE) でプラスミドを電気泳動して純度を評価しました。



メーカー	キット	プラスミド抽出に使用した培養液量(mL)	pUC-sfGFP濃度(μg/mL)	pUC-sfGFP収量(μg)	Agarose電気泳動
A社	-	35	580.3	116.1	A260 nmの定量値に比べてバンドが薄い
Promega社	Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System	100	545.3	163.6	問題なし
Macherey-Nagel社	NucleoBond® Xtra Midi	100	536.1	160.8	やや Open circular が目立つ

3. 無細胞くんでsfGFPを合成

3種類のプラスミド抽出キットを用いて調製したpUC-sfGFPを鋳型DNAとして無細胞くんSIキットで合成反応を行いました。この時、透析内液に加えるpUC-sfGFPの終濃度を1, 2, 4, 8, 12 ng/μLと5条件で行い、高い合成量が得られる鋳型DNAの濃度範囲を併せて調べました。

反応スケール: 透析内液 50 μL/透析外液 500 μL、反応温度: 30°C、反応時間: 14 時間

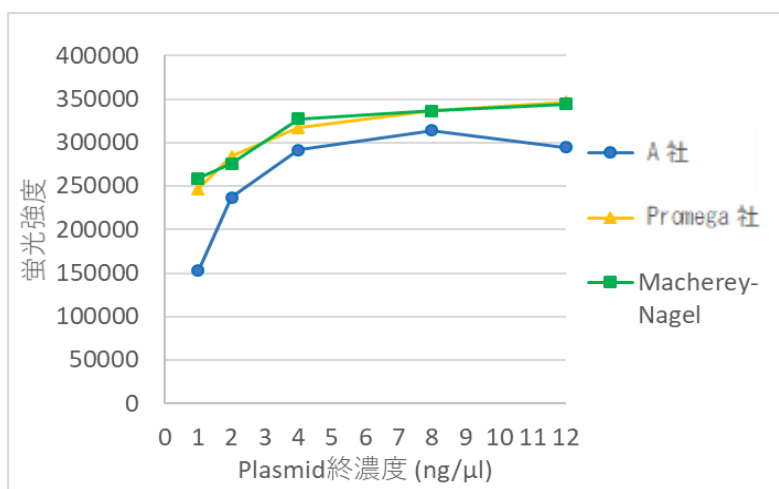
透析内液を回収後に遠心(15,000 g x 3 min)し、上清 10 μL を 90 μL の PBS に加え、プレートリーダーで蛍光を測定(ex 485 nm/em 585 nm)しました。

結果

いずれのキットで抽出したプラスミドでも、合成されたsfGFPの蛍光を確認できました。安定して高い蛍光強度が得られたのは、プラスミド終濃度が4~12 ng/μLの範囲でした。

Promega社とMacherey-Nagel社のキットで抽出したプラスミドでは、ほぼ同様の結果が得られました。

A社のキットで抽出したプラスミドでは、全体的に蛍光強度がわずかに低く、特にプラスミド終濃度が1と2 ng/μLでsfGFPの蛍光強度が低下しておりました。Agarose電気泳動の結果から考えると、何らかの夾雑物の影響等でプラスミド濃度が実際よりも高く定量されていたものと考えられます。



4. まとめ

3種類の市販のプラスミド精製キットで抽出したpUC-sfGFPを鋳型DNAとして、無細胞くんで合成反応を行い、sfGFPの蛍光強度を比較しました。どのキットで抽出したプラスミドでもsfGFPを合成できましたが、Macherey-Nagel社のキットが処理時間も早く、簡便でした。鋳型DNAの濃度については、pUC-sfGFPの場合は終濃度4~12 ng/μLの範囲で透析内液に加えることで、安定した高い蛍光強度(合成量)が得られました。プラスミドにより、最適な終濃度は多少異なる場合がございますので、一度検討して頂くのがベストではありますが、まずは4 ng/μLでお試しになってはいかがでしょうか。

5. (オプション)追加精製処理

市販のキットで精製したプラスミドでは、プラスミド終濃度を上げた際に、まれに、タンパク質合成量が大幅に低下する現象がみられます。このような場合は、以下にお示しする手順に従ってフェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿による追加の精製を行って頂くことで改善できます。

1. プラスミドと等量のフェノール、クロロホルム、イソアミルアルコールを加えて、Vortexなどで激しく混ぜます。15,000 *g* x 3 min, 4 °Cで遠心します。
2. 上清を新しい 1.5 mL チューブに移し、等量のクロロホルムを加えて、Vortexなどで激しく混ぜます。15,000 *g* x 1 min, 4 °Cで遠心します。
3. 上清を新しい 1.5 mL チューブに移し、サンプルの 0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム(pH 5.2)と 2.5 倍量のエタノールを加えて、よく混合します。-30°Cで 15 分以上冷却後に、15,000 *g* x 15 min, 4 °Cで遠心します。
4. ピペットで上清を捨て、氷冷 70%エタノールを 500 μ L 加えて、15,000 *g* x 1 min, 4 °Cで遠心します。
5. 上清を捨て、遠心エバポレーター等を用いてペレットを乾燥させます。
6. 適量の Milli-Q 水を加えて、ペレットを溶解します。
7. Thermo Scientific™ NanoDrop™等を用いて 260 nm の吸光度を測定し、DNA 濃度を定量します。

・「無細胞くん」「大陽日酸」「TAIYO NIPPON SANSO」「The Gas Professionals」は大陽日酸株式会社の登録商標または商標です。
・その他、記載されている社名及び製品名は、各社の登録商標又は商標です。本文中に TM、R マークを明記していない場合があります。

お問い合わせ

大陽日酸株式会社 イノベーションユニット SI 事業部
神奈川県横浜市西区みなとみらい 4-6-2
みなとみらいグランドセントラルタワー 7F

E-mail: isotope.TNS@tn-sanso.co.jp
HP: <https://stableisotope.tn-sanso.co.jp>