

PureYield™ Plasmid Midiprep Systemを用いた迅速で信頼性のある良質なプラスミドのミディスケール精製

By Doug White, M.S., Cheryl Bailey, Ph.D., Hemant Shenoi, Ph.D., and Rex Bitner, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

本稿では新製品PureYield™ Plasmid Midiprep Systemをご紹介します。本システムは、トランスフェクションをはじめ*in vitro*発現、自動蛍光DNAシーケンシングやその他のアプリケーションで使用する高純度なプラスミドDNAを迅速に単離するためにデザインされました。新しいPureYield™ columnのユニークなデザインにより、30分以内にプラスミドDNA100~200μgを精製することができます。また、高濃度で溶出されるため、使用前にエタノール沈殿を行う必要がありません。改変されたライセートクリアリングプロトコルを実施すれば、最大400μgのプラスミドDNAを精製することができます。PureYield™ Systemを用いることにより、他のプラスミドミディプレップ法よりも3時間半操作時間を節約できるため、研究の本質的な仕事に集中することができます。

イントロダクション

研究の流れはDNAシーケンシングから発現解析へと移行しており、真核生物へのトランスフェクションや*in vitro*発現実験に適した数百マイクログラムオーダーの良質なプラスミドDNAを迅速に調製することが求められてきています。ミディプレップ量のプラスミドDNAを迅速に精製するPureYield™ Plasmid Midiprep Systemを用いることで研究の本質的な仕事のためにより多くの時間を使うことができます。

本システムは、培養した大腸菌から100~200μgの純度の高いプラスミドDNAを精製するために開発された新しいシリカメンブレンカラムを用いた迅速でシンプルな操作を実現します。プラスミドDNAは30分以内に精製することができ、レジンやその他のメンブレンカラムを用いた方法に比べ精製時間を大幅に短縮することができます。

PureYield™ Plasmid Midiprep Systemには、トランスフェクションやTNT® coupled *in vitro* Transcription/Translationなどのデリケートなアプリケーションで問題となるエンドトキシンやタンパク質、RNAの多くを除去するためのEndotoxin Removal Wash Solutionを用いる洗浄操作が含まれています。精製操作には精製プラスミドDNAのイソプロパノール沈殿操作や長時間の高速遠心操作は含まれておらず、純度の高いプラスミドDNAを迅速、簡便に調製することができます。

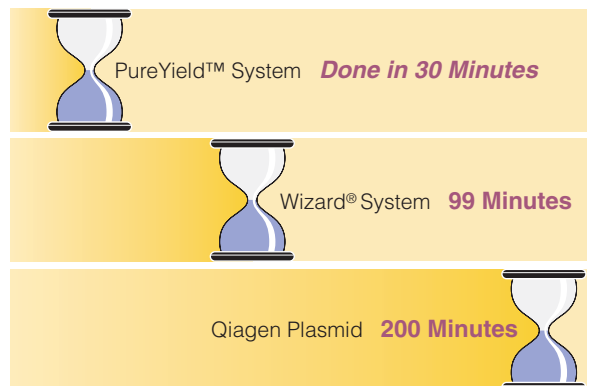


図1. 異なるシステムを用いたミディプレップ1回あたりの所要時間の比較

各システムのプロトコルは、ハイコピー数プラスミド (pGME®-3) をトランスフォームしたJM109菌株を一昼夜培養した培養液50mlを用いて製造元の説明書に従い実施した。PureYield™ Systemでは吸引プロトコルを用いた。ミディプレップで費やすトータルの所要時間を表示した。

方法

PureYield™ Plasmid Midiprep Systemは他のシステムに比べ、極めて短時間に高純度プラスミドDNAを精製します (図1)。この方法は手作業と全体の精製時間の両方を最低限に抑えるようにデザインされています。例えば、PureYield™ Lysate Clearing ColumnおよびDNA Binding Columnは高い流量を有するため、高速遠心操作が不要です。PureYield™ Systemは、低速のスイングローターを用いる遠心法または吸引法、さらに柔軟性の高い2法のコンビネーションでもプラスミドDNAを大腸菌から精製することができます。利用可能な機器、時間と収量のバランス、処理する培養液量などの要望に合わせてシステムを調整することができます。吸引法は遠心法に比べ迅速ですが、遠心法は大量のバイオマス (培養量/細胞数) を有するサンプルからのライセート清澄化を効率よく行うことができます。コンビネーションプロトコルの、捕捉段階では吸引プロトコルのスピードを採用し、ライセート清澄化では効率的な低速遠心法を利用します。3つの方法は全て良質なプラスミドDNAを供給し、少ないバイオマスのサンプルでは同等の収量が得られます (図2)。

50ml培養液からプラスミドDNAを精製するには、遠心による集菌、バッファーによる菌体の再懸濁、穏やかなアルカリ条件下での溶菌を行います。ライセートの清澄化はPureYield™ Clearing Columnをスイングローターで低速遠心するか、PureYield™ Binding Column内のシリカメンブレンへのプラスミドDNA結合も同時に行うカラムの積み重ねによる吸引法で行います (図3)。遠心法の場合、この工程は清澄化とプラスミドDNA結合のステップに別れています。プラスミドDNAがシリカメンブレンに結合した後、メンブレンはまずエンドトキシンやRNA、タンパク質などの夾雑物を除去するためにEndotoxin Removal Washで洗浄され、さらにColumn Washでその他の不純物が除かれます。室温のNuclease-Free Waterでシリカメンブレンから直接溶出された高濃度で純度の高いプラスミドDNAは、イソプロパノール沈殿操作やその他の操作を行わずに真核生物へのトランスフェクションや*in vitro* coupled Transcription/Translation、蛍光DNAシーケンシング、その他のアプリケーションにそのまま使用することができます。

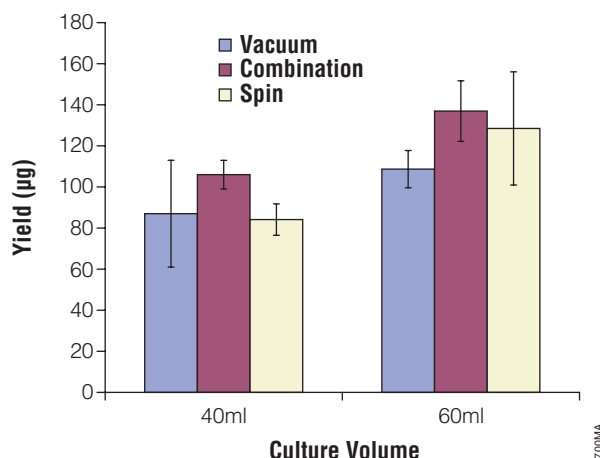


図2. PureYield™ プロトコル3種類の収量比較

表示量のpGEM® Vectorを含むJM109培養液をそれぞれのPureYield™ プロトコルで実施した。収量は260nmでの吸光度を用いて算出した。

収量と純度

トランスフォームされた大腸菌より精製したプラスミドDNAは、260nmと280nmの吸光度測定により収量と純度を分析します。プラスミドDNAの収量は260nmの吸光度を用いて算出されます。また、純度は260nmと280nmの比 (A_{260}/A_{280} 比率) とアガロースゲル分析により推定されます。純度の高いプラスミドDNAの A_{260}/A_{280} 比は1.8~1.9を示します。表1では、PureYield™ Plasmid Midiprep Systemを用いてJM109菌株を一昼夜培養した培養液50mlから精製したプラスミドDNAの平均収量と純度を示しています。

260nmでの吸光度は常にプラスミドの収量を正確に測定するわけではありません。RNAやタンパク質などの夾雑物も260nmに吸収を持つため過剰に収量を見積もる場合があります。これはプラスミドの濃度が潜在的な夾雑物に比べて低い場合に特に顕著に表れます (例. 低コピー

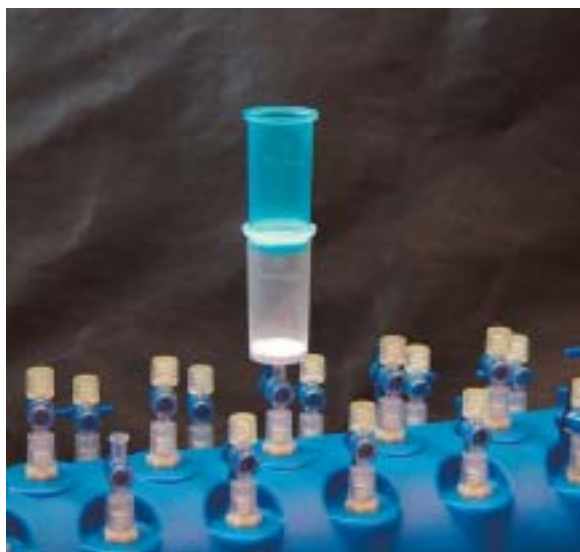


図3. PureYield™ Plasmid Midiprep Systemの吸引プロトコルを行う場合の正しいPureYield™ Clearing Column (青)と PureYield™ Binding Column (白)の装着

表1. PureYield™ Plasmid Midiprep Systemで精製したプラスミドDNAの収量と純度

Sample	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	µg/ml	Yield (µg)
1	1.93	1.86	251	128
2	1.79	1.73	270	143
3	2.02	1.89	293	147
4	2.15	1.90	266	141
5	1.81	1.72	203	142
6	2.12	1.89	257	141
average	1.97	1.83	257	140
Std. Dev	0.15	0.08	30	6
%CV	8	5	12	5

数プラスミドの精製など)。我々は、PureYield™ Systemと他のプラスミドプレップ法による収量を A_{260} による方法とアガロースゲル分析で比較しました (データ未掲載)。ある精製方法を用いた場合、 A_{260} により決定された収量はゲル分析により算出された収量の2倍であり、 A_{260} は収量決定において常に正確な方法ではないことを示していました。それに対して、PureYield™ Systemを用いた場合、 A_{260} とゲル分析による収量の比率は1~1.2で、 A_{260} 収量決定法の確度に対する信頼性が向上します。

PureYield™ Systemを用いた場合に A_{260}/A_{280} の平均から求められた純度は1.8~1.9でした (表1)。精製されたプラスミドDNAをMULTI-CORE™ Bufferで37℃、16時間インキュベーションしアガロースゲルで可視化しても分解は認められず、検出可能なエンドヌクレアーゼの持込が無いことを示していました。また、高コピー数プラスミドのアガロースゲル分析では、90%以上がスーパーコイルのプラスミドであることを示していました (データ未掲載)。

さらにシステムをテストするために、我々は菌体培養量を増加させてプラスミドDNAの収量を比較し、結合容量を決定しました。ライセートの清澄化に高速遠心操作を加えた改変ライセートクリアリングプロトコルを用いた場合、180mlまたは240mlの菌体培養液から2倍の収量 (400µg) を得ました (図4)。このプロトコルを用いてPureYield™ Systemによる精製を行えば、標準的な結合容量 (100~200µg) を有する他のミディプレップ法を大幅に上回る多量のプラスミドDNAを得ることができます。

真核細胞へのトランスフェクション

ミディプレップにより調製したプラスミドDNAの最も一般的なアプリケーションは、真核細胞へのトランスフェクションだと考えられます。トランスフェクションの成否は、エンドトキシンレベルの低い高純度のプラスミドDNAの調製にかかっています。本実験では、ホタルルシフェラーゼ遺伝子をもつpsiCHECK™-2 Vector (カタログ番号C8021) をPureYield™ System, HiSpeed™ Qiagen Plasmid Midi Kit, Eppendorf Perfectprep® Plasmid Midi Kitのそれぞれを用いて精製し、HeLa細胞にトランスフェクションしました。トランスフェクションしたHeLa細胞を発光測定することにより、PureYield™ Systemで精製したプラスミドDNAを用いた場合にホタルルシフェラーゼが高レベルに発現していることが示されました。

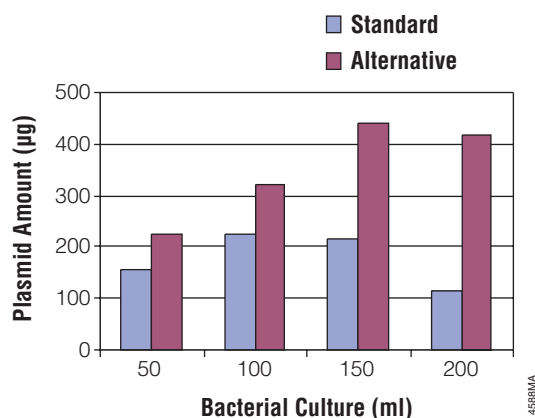


図4. 異なる2つのライセート調製法を用いた場合のJM109菌株培養液 増加にともなう精製pGEM®プラスミドの収量

pGEM®プラスミドを含むJM109菌株はLB培地で一昼夜培養した。ライセートはTechnical Manual #TM253に記載される標準または改変プロトコルにより調製し、吸引マニホールドを用いて澄清化した。バイオマス（培養量や菌数）を増加させる場合、標準的なライセートプロトコルに変えて、改変クリアリング法を推奨する。

PureYield™ Systemで精製したプラスミドDNAを用いたTNT® 反応による*in vitro*タンパク質発現

DNAシーケンシングにより決定されたオープンリーディングフレームを確認する一般的な方法として*In vitro*でのタンパク質発現法があります。この*in vitro*タンパク質発現を行う上で最も頑健でシンプルな方法の1つはTNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systemを用いる方法です。SP6コントロールプラスミドをトランスフォームしたJM109菌株からPureYield™ System を用いて精製したプラスミドDNAを、他のシステムで単離したプラスミドDNAと比較しました。TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System Technical Manual #TM045に従い、タンパク質発現を行いました。図6では、本システムで精製したプラスミドが、TNT® Systemに添付されるコントロールプラスミドや他法で精製したプラスミドDNAよりも頑健なタンパク質発現を示していました。

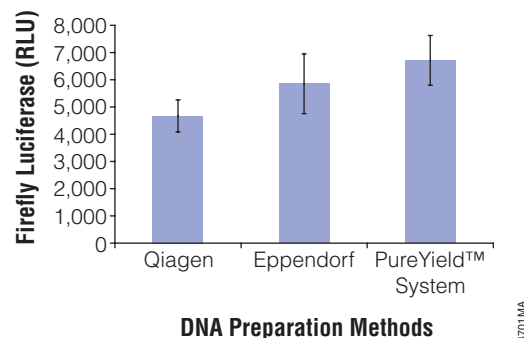


図5. PureYield™ Plasmid Midiprep Systemを用いて精製したプラスミドDNAのトランスフェクション効率

ホタルルシフェラーゼ遺伝子をもつpsiCHECK™-2 Vector（カタログ番号 C8021）はPureYield™ System, HiSpeed™ Qiagen Plasmid Midi Kit, Eppendorf perfectprep® Plasmid Midi Kitを用いて大腸菌から精製した。0.07µgのDNAを25µlの全液量になるように調整し、HeLa細胞へトランスフェクションした。ホタルルシフェラーゼのシグナルはDual-Glo™ Luciferase Assay System（カタログ番号 E1910）で測定した。



Lane Sample

- 1 Luciferase SP6 Control DNA
- 2 PureYield™ Plasmid Midiprep
- 3 Qiagen Midiprep

図6. 異なるミディプレップシステムにより精製したプラスミドDNAの*in vitro*転写/翻訳の比較

Luciferase SP6 Control DNA（カタログ番号 L4741）のミディプレップは製造元の説明書に従って行った。転写/翻訳反応は、TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System Technical Manual #TM045に従った。各TNT® 反応液1µlを4～20%NOVEX® gelを用いたSDS-PAGEにより分析した。分離したタンパク質はPVDFメンブレン（BioRad Sequi-Blot™）に転写し、PhosphorImager® cassetteに2時間暴露した。カセットの分析にはStorm® PhosphorImager®を使用した。

PureYield™ Plasmid DNA Midiprep Systemで
精製したプラスミドDNAのアプリケーション：
蛍光自動DNAシーケンシング

自動蛍光DNAシーケンシングでは適切な濃度の良質なプラスミドDNAが要求されます。このアプリケーションにおけるPureYield™ Systemより精製したプラスミドの適応性を調べるために、DNAシーケンシングサービスSeqWright (Houston, TX) に調製したサンプルを送付し、自動蛍光DNAシーケンシングを行いました。シーケンシングはABI 3730 fluorescent sequencerを用いたABI BigDye®法で行われました。精製プラスミドDNAは、700ベースでphredスコア20～30であり、配列分析結果が99%の精度であることを示していました（データ未掲載）。

結論

PureYield™ Plasmid Midiprep Systemは、ミディウムスケールのプラスミドDNA精製を迅速、シンプルに行えるシステムです。このシステムは、新しいシリカメンブレンを用いたデザインで、他社同等品に比べ、短時間でより多くの収量が得られます。また、溶出されたDNAは、アルコール沈殿操作を行わずにそのまま次のアプリケーションで使用することができます。本システムは、真核細胞へのトランスフェクション、in vitro発現、蛍光DNAシーケンシングなどの要求度の高いアプリケーションに適する一貫した品質を提供します。

プロトコル

- ◆ PureYield™ Plasmid Midiprep System Technical Manual #TM253, Promega Corporation.
(www.promega.com/tbs/tm253/tm253.html)
- ◆ TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems Technical Manual #TM045, Promega Corporation.
(www.promega.com/tbs/tm045/tm045.html)

製品案内			
製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
PureYield™ Plasmid Midiprep System	25回分 100回分	A2492 A2495	27,000 96,000
Vac-Man® Jr. Laboratory Vacuum Manifold, 2-sample capacity	1 個	A7660	3,000
Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold, 20-sample capacity	1 台	A7231	45,000