

Transfection-Quality Plasmid DNA in as Little as Ten Minutes Using the PureYield™ Plasmid Miniprep System

PureYield™ Plasmid Miniprep System : 10分間で調製できるトランスフェクショングレードのプラスミドDNA

By Don Smith and Eric Vincent, Promega Corporation

アブストラクト

研究者は、数多くの研究プロトコルの中で第一ステップとなるプラスミドの精製をより簡便に行う方法を常に模索しています。今回我々がご紹介する新しいPureYield™ Plasmid Miniprep Systemは、トランスフェクション、in vitro発現、シークエンシングやクローニングなど広範な下流のアプリケーションに適した高純度のプラスミドDNAを迅速に精製することができます。このシステムでは、0.6mlの菌体培養液ならば菌を遠心で回収することなく直接プラスミドを精製でき、菌体ペレットを回収する場合は最大3mlの菌体培養液を処理することができます。すべての操作は10分以内に完了することができます。

イントロダクション

プラスミド精製ミニプレップは、遺伝子操作およびタンパク質発現の両方における基礎的な研究ツールです。しかし、多くの市販されるミニプレップで得られるDNA純度と濃度では、全てのアプリケーションで使用するには限界があります。PureYield™ Plasmid Miniprep Systemは、最も純度に対する要求の高いトランスフェクションにも使用できる高純度のDNAを調製することができます。

PureYield™ Plasmid Miniprep Systemのユニークな試薬、特殊なマトリックスおよびミニカラムのデザインにより、菌体培養液より直接的、迅速（10分以内）にDNA精製を行うことができ、溶出ボリュームは30µlにまで抑えることができるため、より高濃度のプラスミドDNAを得ることができます。カラムは、実質的に液体が残存しないように設計されているため、少ない液量で溶出することができます。洗浄液や塩、アルコールがプラスミドプレップに残らないため、精製したプラスミドはトランスフェクションやS30 T7 High-Yield Protein Expression Systemなど非常に敏感なアプリケーションにも使用することができます。また、その他の利点として、低コピー数のプラスミドでも同様に精製可能であることが挙げられます。このシステムは10kb以下のプラスミドに最適ですが、18kb程度のプラスミドでも精製できた実績があります。

良質なプラスミドDNAを10分以内に精製

PureYield™ Plasmid Miniprep Systemにおけるユニークな試薬の組合せにより、菌体培養液から直接（0.6ml）または菌体ペレットにして（3ml分）精製することができます（図1）。一般的な一昼夜培養液（LB培地で16-18時間培養）0.6mlならばそのまま精製処理を行うことができます。それ以上の容量を処理する場合は、遠心で菌体を回収し、600µlのTEか水に再懸濁します。Lysis Buffer（100µl）を添加し、クリアーな青色になるまで転倒混和します。次に、氷冷したNeutralization Solution 350µlを添加し、pHが完全に変化したことを示す黄色に変色するまで転倒混和します。この中和処理の結果、大きな沈殿物が現れるので、通常の遠心機による遠心操作で清澄化します。このクリアーな溶液をcollection tubeに装着したMinicolumnに移し、15秒間遠心します。その後、Minicolumnを外し、カラム通過液を廃棄します。Minicolumnは再度 collection tubeに装着しなおし、Endotoxin Removal Wash 200µlを各Minicolumnに添加し、15秒間遠心します。次に、遠心機からMinicolumnを取り出さずにColumn Wash Buffer 400µlを加え、再度30秒間遠心します。Minicolumnを新しい1.5ml チューブに移し、Elution Buffer 30µlを添加します。1分間インキュベーションした後、遠心によりプラスミドDNAを回収します。

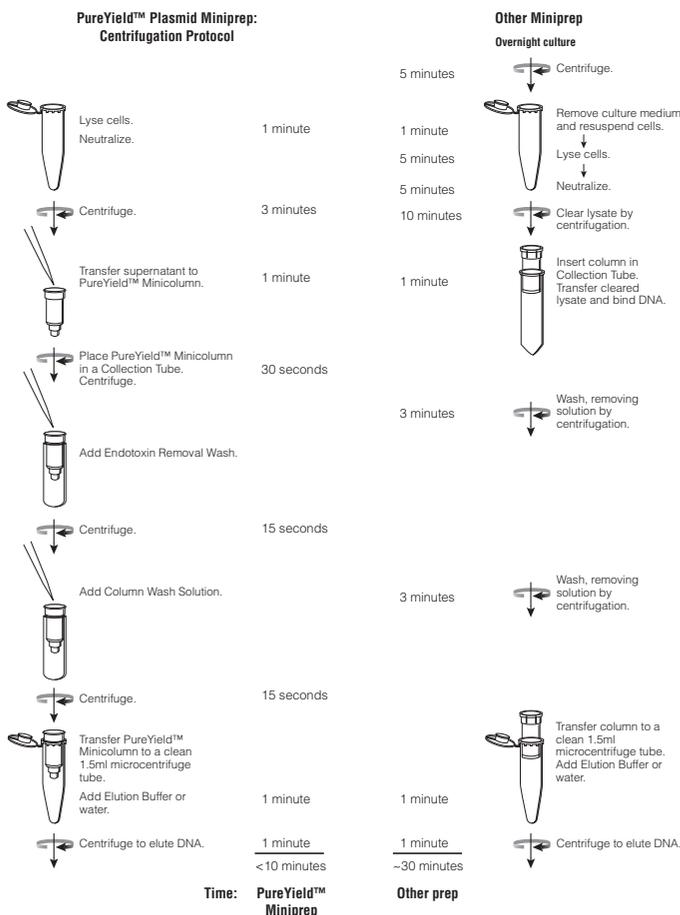


図1. PureYield™ Plasmid Miniprep Systemと標準的なミニプレップとの操作比較

高純度プラスミドを精製するミニプレップシステム

我々は、PureYield™ Plasmid Miniprep Systemを用いて、大腸菌よりpGEM®-3Zf(+) 高コピーベクターを精製しました。精製したプラスミドDNAは分光学的に分析し、吸光度260nmで収量を見積もりました。プラスミドの純度は、 $A_{260/280}$ 比 (≥ 1.8 が高純度) および $A_{260/230}$ 比 (≥ 2.0 が高純度) で判定しました。値が低い場合、タンパク質 ($A_{260/280}$) あるいはグアニジン塩あるいはその他の不純物 ($A_{260/230}$) の混入を示します。表1に得られたプラスミドDNAの収量および純度を示します。さらにアガロースゲル分析で精製したプラスミドの完全性を示しました (図2, パネルA)。溶出ボリューム増加による収量増加の可能性について調べるために、pGEM®-3Zf(+) Vectorを含むJM109菌株 0.6mlからプラスミドを精製しました。溶出ボリュームを100 μ lに上げた場合、平均収量が幾分増加しました。(図2, パネルB) しかし、溶出ボリュームを100 μ lより増量しても改善は認められませんでした (データ未掲載)。最も純度の高いプラスミドは、菌体ペレットを回収し、600 μ lの水で再懸濁した場合に得られました。培地の組成および菌体培養に伴う副産物は、 $A_{260/230}$ 比を低下させ、精製したプラスミドDNAの純度を落とす原因となる可能性があります。

転写/翻訳カップリングシステムに最適なプラスミドDNAの精製

我々は、TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systemを用いて、PureYield™ Plasmid Miniprep Systemにより精製したプラスミドDNAのパフォーマンステストを行いました (図3)。JM109菌株 1.0mlまたは1.5mlからLuciferase T7 Control Plasmidを精製しました。遠心/吸引法を用いたPureYield™ Miniprep Systemで精製したDNAは、転写/翻訳システムに添付されるコントロールDNAと比較しました。PureYield™ Miniprep Systemで精製したプラスミドはコントロールDNAと同様のパフォーマンスを示しました。

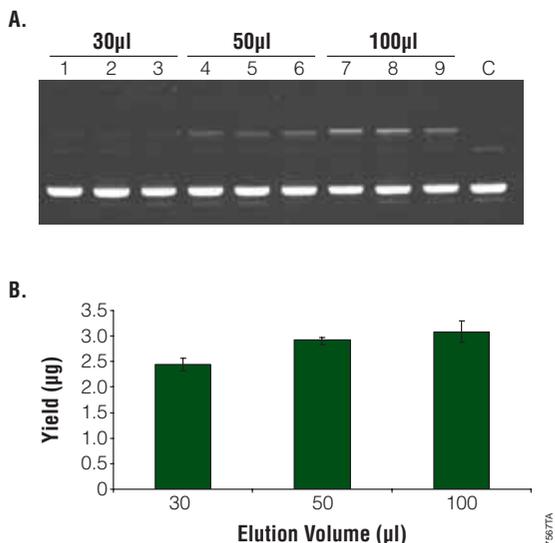


図2. PureYield™ Plasmid Miniprep Systemで得られたプラスミドの完全性
JM109培養液 0.6mlから精製したプラスミド1 μ gをアガロースゲルに添加し、エチジウムブロマイド染色により可視化した (パネルA)。レーン1-3, 溶出ボリューム 30 μ l; レーン4-6, 溶出ボリューム 50 μ l; レーン7-9, 溶出ボリューム 100 μ l; レーンC, 市販されるラジプレップで得たプラスミド。溶出ボリューム 100 μ lまで幾分収量が増加した (パネルB)。各溶出ボリュームあたり n=6

表1. PureYield™ Plasmid Miniprep Systemで精製したプラスミドの純度

培養容量	指標	$A_{260/230}$	$A_{260/280}$	収量 (μ g)
0.6 ml	Mean	2.16	1.85	2.44
	Standard Deviation	0.179	0.023	0.315
	CV	8.27%	1.26%	12.9%
1.0 ml	Mean	2.31	1.87	5.43
	Standard Deviation	0.019	0.012	0.303
	CV	0.80%	1.26%	5.58%
1.5 ml	Mean	2.29	1.86	7.78
	Standard Deviation	0.022	0.004	0.741
	CV	0.95%	0.22%	9.53%

各培養液量あたりN=6 プレップ

PureYield™ Miniprep Systemを用いて精製したプラスミドDNAは、自動シーケンシングで優れたパフォーマンスを示し、700base以上の完全読み取りを可能にしました (図4)。

また、我々は、PureYield™ Plasmid Miniprep Systemにより精製したプラスミドDNAについてS30 T7 High-Yield Protein Expression Systemを用いたパフォーマンステストを行いました (図5)。プラスミドDNA (pFN6A-hRLまたはpFN6A-GFP)をJM109菌株にトランスフォームした後、PureYield™ Plasmid Miniprep Systemまたは他社システムを用いて菌体培養液1.5mlからプラスミドを精製しました。プラスミド1 μ gを各翻訳反応に加え、合成されたタンパク質をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後のCoomassie® Blue染色で評価しました。翻訳システムでは、PureYield™ Plasmid Miniprep Systemで精製したプラスミドDNAとコントロールDNAは同様のパフォーマンスを示しました。

PureYield™ Plasmid Miniprep Systemの大きな利点の1つは、迅速に少スケールのトランスフェクショングレードDNAを調製できる点です。図6では、競合システムまたはPureYield™ Plasmid Miniprep Systemで調製したプラスミドの比較データを示しています。精製したプラスミドはいくつかの汎用される哺乳動物細胞株へのトランスフェクションに使用しました。最も安定したトランスフェクションの結果は、

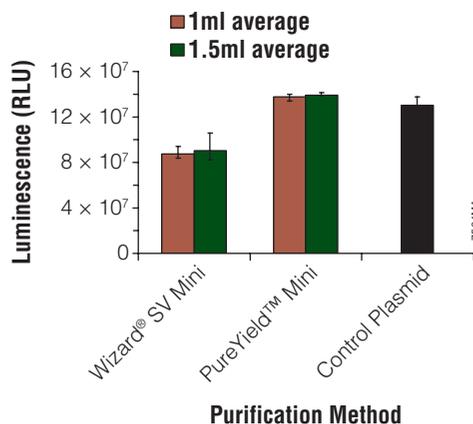


図3. PureYield™ Plasmid Miniprep Systemで得られたプラスミドは転写/翻訳カップリング反応でコントロールプラスミドと同等に機能した

Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification SystemまたはPureYield™ Plasmid Miniprep Systemを用いてJM109菌体培養液 1.0ml, 1.5mlより精製したLuciferase T7 Control Plasmid DNAおよびTNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systemに添付されるコントロールDNAをTNT®反応で転写/翻訳し、パフォーマンスを比較した。発現したタンパク質はONE-Glo™ Luciferase Assay Systemを用いて定量した (n=6)。

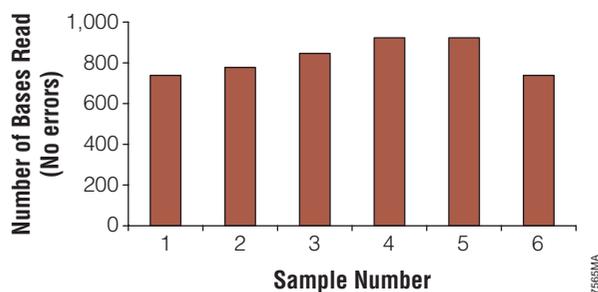


図4. PureYield™ Plasmid Miniprep Systemで精製したプラスミドDNAは自動DNAシーケンシングで優れたパフォーマンスを示した

PureYield™ Plasmid Miniprep Systemを用いて6回別々にpGEM®-3Zf(+) Vectorを調製し、シーケンシングを行った。6回にわたり調製したすべてのプラスミドサンプルで700base以上を完全に読み取ることができた。

PureYield™ Plasmid Miniprep Systemで調製したプラスミドで得られました。CHO細胞のような導入の難しい細胞株でも優れた効率でトランスフェクションすることができました。

まとめ

PureYield™ Plasmid Miniprep Systemは、トランスフェクション、クローニング、シーケンシングおよび転写/翻訳カップリング反応などのアプリケーションに適した良質のDNAを小規模で調製することができる新しいオプションを提供します。操作は10分以内に完了でき、菌体培養液0.6mlから直接、あるいは菌体培養液3.0mlまでなら菌体ペレットを回収して精製することができます。

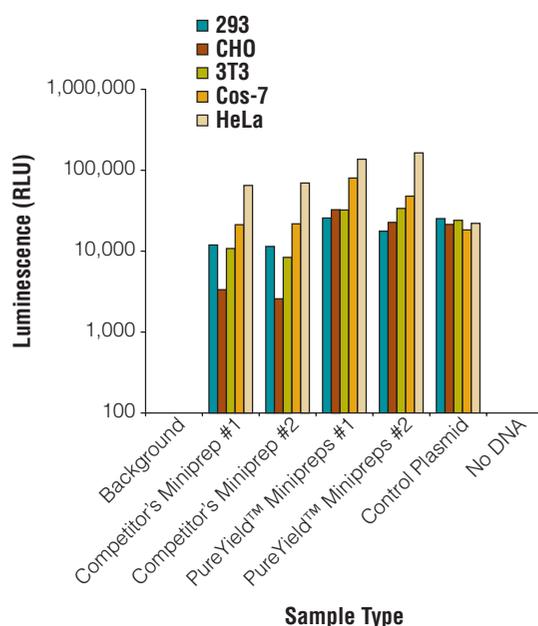


図6. PureYield™ Plasmid Miniprep Systemで調製したプラスミドDNAは、トランスフェクション実験で安定した機能を発揮した

pGL4.13[Luc2/SV40] VectorはPureYield™ Plasmid Miniprep Systemまたは他社競合品を用いて調製した。汎用される5種類の哺乳動物細胞株にプラスミドをトランスフェクションし、ONE-Glo™ Luciferase Assay Systemを用いてルシフェラーゼ活性を測定し、トランスフェクション効率を評価した (N=6)。

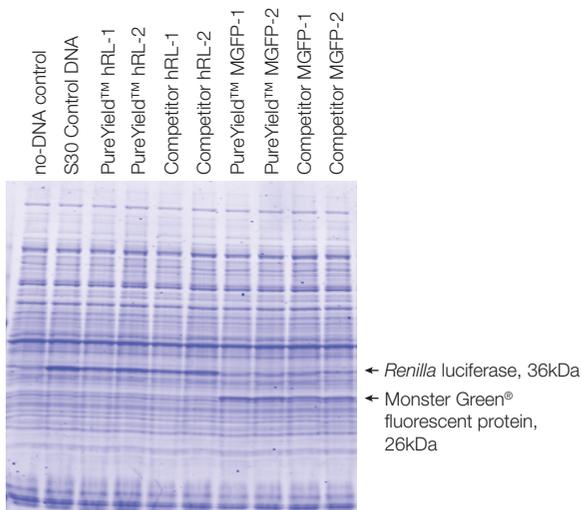


図5. PureYield™ Plasmid Miniprep Systemで精製したプラスミドDNAは、転写/翻訳カップリング反応でControl Plasmid DNAと同等に優れたパフォーマンスを示した

pFN6A-hRLまたはpFN6A-GFPプラスミドDNAをPureYield™ Plasmid Miniprep Systemまたは他社競合品を用いてJM109菌体培養液1.5mlより精製した。1µgのプラスミドをS30 T7 High Yield Protein Expression System転写/翻訳反応に添加した。ウミシイタケルシフェラーゼ (36kDa) およびGFP (26kDa) のタンパク質の合成結果はSDS-PAGE後のCoomassie® blue染色により評価した。PureYield™ Plasmid Miniprep Systemは、翻訳システムとともに供給されるコントロールDNAと同等のパフォーマンスを示した。

プロトコル

- ◆ PureYield™ Plasmid Miniprep System Technical Bulletin, #TB374, Promega Corporation
www.promega.com/tbs/tb374/tb374.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
PureYield™ Plasmid Miniprep System	50回分	A1221	12,000
	250回分	A1222	48,000