



# 自動化されたハイスループットフォーマットのトランスフェクション グレードプラスミド精製

Promega

## Wizard® MagneSil™ Paramagnetic Particles

Doug White, Don Creswell, Elaine Schenborn, Dan Simpson, and Don Smith, Promega Corporation

### はじめに

Wizard® MagneSil™ Plasmid Purification SystemとBeckman Biomek® FXを組合せた、大腸菌培養液0.5～1.0mlからのトランスフェクショングレードのプラスミド精製法を開発しました。このシステムで使用する磁性粒子は、ライセートの清澄化、プラスミドの捕捉、エンドトキシンの除去を行い、吸引や遠心が不要です。シークエンシンググレード用の標準プロトコルを2箇所改変することで、RNA、タンパク質、エンドトキシンを低レベルに抑えることができます。この完全な自動化システムにより、約40分間で96ウェルプレート1枚を処理することができ、複数のプレートの同時処理も可能です。NIH3T3細胞へのトランスフェクションでは、シリカメンブレンや陰イオン交換による精製法に比べ、優れた効率を示しました。

### 方法

**菌体培養：**pGL3を保持する大腸菌JM109をTerrific Broth（アンピシリン含有）で一晩培養

**プラスミド濃度：**アガロースゲル分析により測定

**トランスフェクション：**TransFast™（試薬：DNA比＝1：1）を用いて、精製したプラスミドをNIH3T3細胞にトランスフェクションした。2日後、細胞を溶解し、Luciferase Assay Systemでルシフェラーゼ活性を測定

**タンパク質量：**Coomassie® Plus Protein Assay Reagent (Pierce)を使用

**RNA検出法：**RNAをアルカリ分解し、その加水分解産物をHPLCで分離し、260nmの吸光度を測定

**エンドトキシン検出法：**Pyrochrome® Limulus Amebocyte Lysate Kit (Associates of Cape Cod)を使用

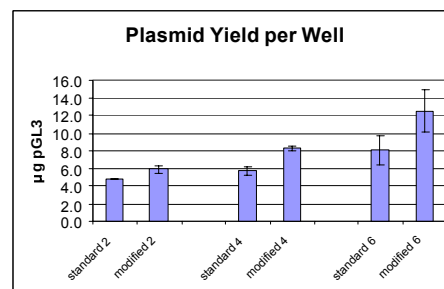


図1. 1ウェルあたりのプラスミド収量

標準法、改変法で96ウェルプレートフォーマットで精製した場合の1ウェルあたりの収量を示した。それぞれ2、4、6ODの菌体培養液を用いた。

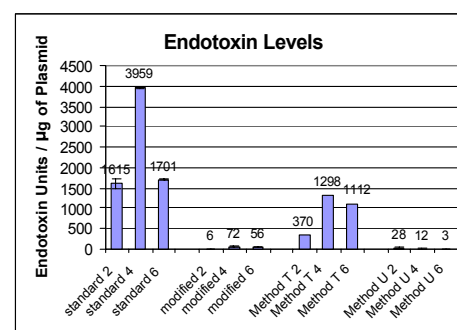


図2. エンドトキシンの混入レベル

MagneSil™法またはその他の精製法により精製したプラスミドに混入するエンドトキシンを測定した。エンドトキシン除去ステップの無い標準法は、方法Tに比べ、高いエンドトキシンレベルを示した。改変法により、最大90%のエンドトキシンレベルを抑えることができた。これまでの方法では、1000unit/µgタンパク質以上のエンドトキシンはトランスフェクションに悪影響を及ぼすことが示されている。（方法T：シリカメンブレン法（市販品） 方法U：陰イオン交換法（市販品））

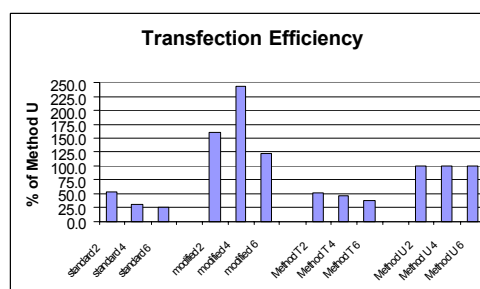
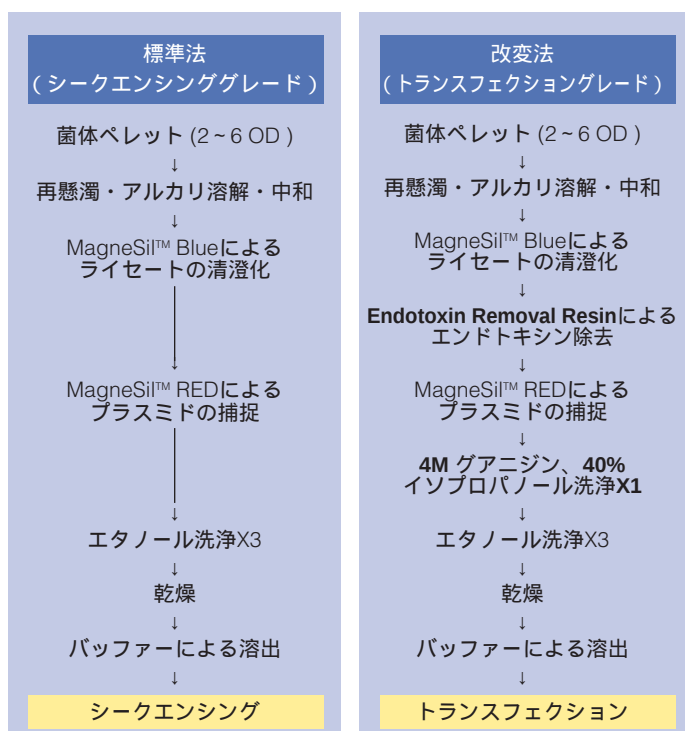


図3. トランスフェクション効率

トランスフェクション効率は、方法Uを100%とした場合の比率で表した。



### 製品案内

| 製品名                                              | サイズ      | カタログ番号 | 価格 (¥) |
|--------------------------------------------------|----------|--------|--------|
| Wizard® MagneSil™<br>Plasmid Purification System | 4X96ウェル分 | A1630  | 55,000 |
|                                                  | 8X96ウェル分 | A1631  | 92,000 |
| TransFast™                                       | 1.2mg    | E2431  | 35,000 |
| Luciferase Assay System                          | 100回分    | E1500  | 13,000 |