

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

日本語プロトコール No. TB281J 2001年7月作成

カタログ番号 A1270, A1330, A1340, A1460 および A1470

目次

I.	はじめに	1
II.	キットの構成	3
III.	プロトコール	4
	A. 大腸菌の準備	4
	B. 大腸菌溶解液の調製	4
	C. プラスミド DNA の単離および精製プロトコール	5
IV.	補足情報	6
	A. プラスミドと大腸菌株の選択および調製	6
	B. 大腸菌株の選択	7
	C. アルカリプロテアーゼの使用	8
	D. 自動化蛍光シーケンシングに適用するための注意点	8
V.	困ったときには・・・	9
VI.	バッファーと溶液の組成	11
VII.	関連製品の紹介	11
VIII.	参考文献	11
IX.	簡易プロトコール	12

I. はじめに

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System^(a) を使えば、迅速なプラスミド DNA の単離を簡単かつ確実にこなすことができます。ミニプレップの全行程は30分以内に完了します。このキットではどのようなプラスミドでも単離することができますが、プラスミドの大きさが20,000bp以下のときに最も効率的に単離できます。単離されたプラスミドは、さらに精製することなく一般的な分子生物学の実験と同様に、自動化蛍光 DNA シーケンシングにも適用できます。また、Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor^(b,c) (カタログ番号 N2511) のようなリボヌクレアーゼ阻害剤を添加すれば、*in vitro* 転写にも適用できます。

このマニュアルには、大腸菌からプラスミド DNA を単離するためのプロトコールが紹介されています。Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System では、一晩培養した大腸菌の培養液、1 ~ 10ml からプラスミド DNA を精製することができます。プラスミドの収量は、大腸菌の培養液量、プラスミドのコピー数、培地の種類、大腸菌株など数多くの要因によって変わります。図 1 に Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System を用いたプラスミド DNA の単離・精製の手順を示します。

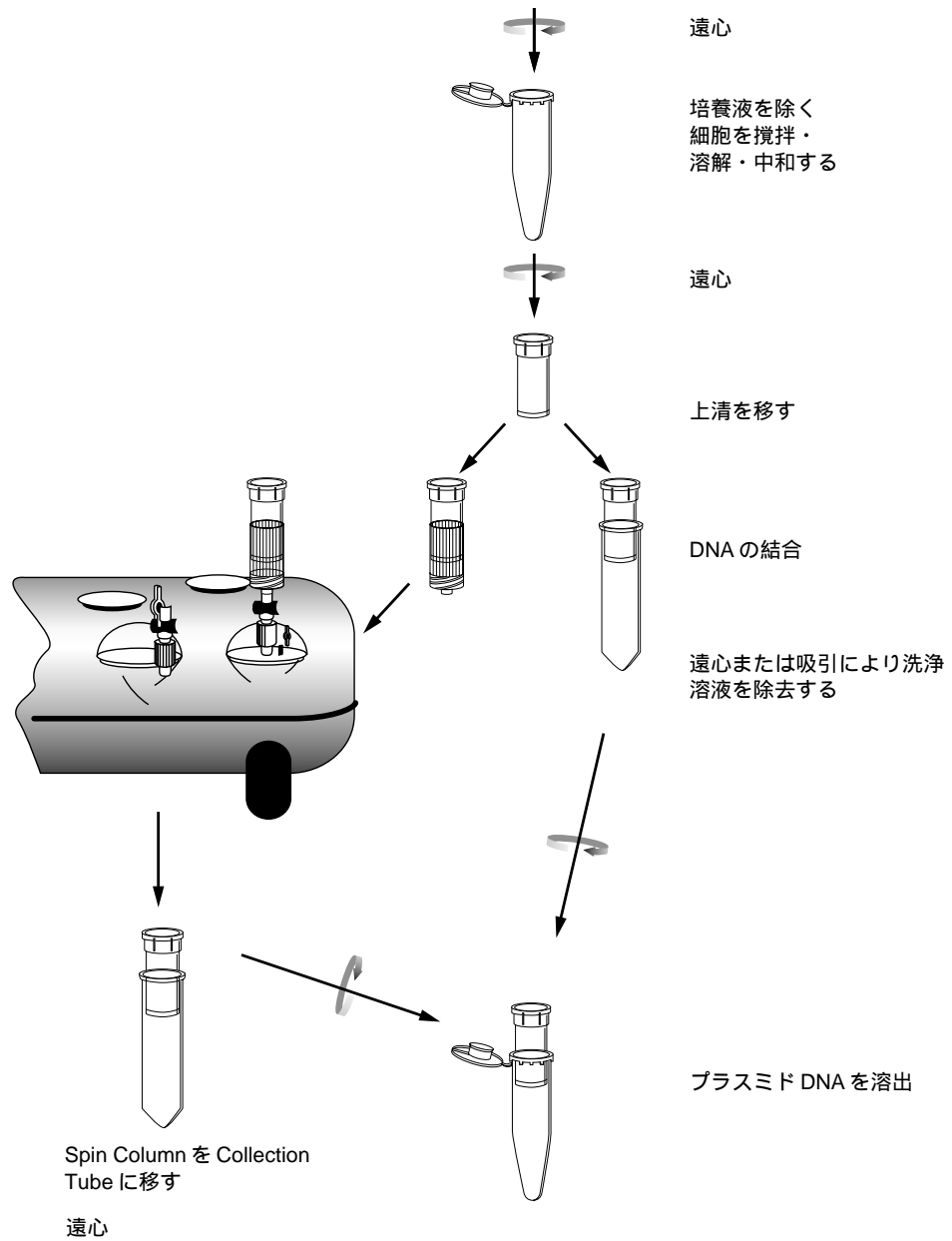


図 1. Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System を用いたプラスミド DNA の単離・精製の流れ図

II. キットの構成

製品名	サイズ	カタログ番号
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Vacuum Adapter 付)	50 回分	A1340

1-10mlの培養液から50回の精製を行うために十分量の試薬が含まれています。

- 20ml Wizard® Plus SV Cell Resuspension Solution
- 20ml Wizard® Plus SV Cell Lysis Solution
- 30ml Wizard® Plus SV Neutralization Solution
- 20ml Wizard® Plus SV Column Wash Solution
- 50 Wizard® Plus SV Minipreps Spin Columns
- 50 Collection Tubes (2ml)
- 550µl Alkaline Protease Solution
- 13ml Nuclease-Free Water
- 20 Miniprep Vacuum Adapters^(d)

製品名	サイズ	カタログ番号
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Vacuum Adapter 付)	250 回分	A1470

1-10mlの培養液から250回の精製を行うために十分量の試薬が含まれています。

- 75ml Wizard® Plus SV Cell Resuspension Solution
- 75ml Wizard® Plus SV Cell Lysis Solution
- 100ml Wizard® Plus SV Neutralization Solution
- 100ml Wizard® Plus SV Column Wash Solution
- 250 Wizard® Plus SV Minipreps Spin Columns
- 250 Collection Tubes (2ml)
- 2,700µl Alkaline Protease Solution
- 25ml Nuclease-Free Water
- 20 Miniprep Vacuum Adapters

製品名	サイズ	カタログ番号
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	50 回分	A1330
	250 回分	A1460

製品名	サイズ	カタログ番号
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, Trial Size	10 回分	A1270

1-10mlの培養液から10回の精製を行うために十分量の試薬が含まれています。

- 3ml Wizard® Plus SV Cell Resuspension Solution
- 3ml Wizard® Plus SV Cell Lysis Solution
- 4ml Wizard® Plus SV Neutralization Solution
- 4ml Wizard® Plus SV Column Wash Solution
- 10 Wizard® Plus SV Minipreps Spin Columns
- 10 Collection Tubes (2ml)
- 550µl Alkaline Protease Solution
- 1ml Nuclease-Free Water
- 5 Miniprep Vacuum Adapters

保存と安定性: Wizard® Plus SV Minipreps に含まれる全ての構成成分は 22 ~ 25 °C で保存してください。試薬の有効期限は製品のラベルに表示されています。

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systemに含まれる構成成分とその他の Wizard® Plus System^(e)に含まれる構成成分の交換や代用はできません。Wizard® PlusとWizard® SV Plusの試薬に互換性はありません。

注意：カタログ番号 A1330 と A1460 の製品には Vacuum Adapter が含まれません。

III. プロトコール

準備するもの

(溶液の組成はセクション VI をご覧ください。)

- ・ 抗生物質を含む LB 寒天培地
- ・ 抗生物質を含む LB 液体培地
- ・ エタノール(95%)
- ・ 微量高速遠心機(14,000 × g)
- ・ 滅菌済み 1.5ml 微量遠心チューブ
- ・ 高速遠心機(10,000 × g)

新規に Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System を使う前に、以下のよう
に Wizard® Plus SV Column Wash Solution を希釈してください。

10回用のキット(カタログ番号 A1270)では、7ml の 95% エタノールを加え、最終
液量を 11ml にする。

50回用のキット(カタログ番号 A1330、A1340)では、35ml の 95% エタノールを
加え、最終液量を 55ml にする。

250回用のキット(カタログ番号 A1460、A1470)では、170ml の 95% エタノール
を加え、最終液量を 270ml にする。

A. 大腸菌の準備

1. 抗生物質を含む Luria-Bertani (LB) 寒天培地から単一コロニーを採り、同じ
抗生物質を含む 1 ~ 10ml の LB 培地に接種する。Terrific Broth のような富栄
養培地では、Wizard® Plus SV Minipreps システムの許容量を超える細胞密
度となる可能性があるため、プロメガでは LB 培地を推奨します。
2. 37 °C の振とう培養器で一晩(12 ~ 16 時間)培養する。一定の培養液量に対す
るプラスミド DNA の収量を増やすために、培養時間を最適化することができます。
しかし、培養時間が長すぎると、培養液中での細胞死や細胞の溶解に
より DNA の収量が減る可能性があるため注意が必要です。

高コピー数プラスミドの場合: 5ml 以上の大腸菌培養液の処理を推奨しません。
5ml 以上の培養液の処理を行っても、Wizard® Plus SV Minipreps Spin Column
の DNA 結合容量を超加し、プラスミド DNA の収量の増加は期待できません。

低コピー数プラスミドの場合: 十分な量の DNA を回収するには、より多量
(10ml まで)の大腸菌培養液の処理が必要な場合があります。10ml 以上の培養
液を処理した場合、大腸菌の残さが完全に除かれず、プラスミド DNA 中に混入
物が増加します。

B. 大腸菌溶解液の調製

1. 1 ~ 5ml (高コピー数プラスミド)または 10ml (低コピー数プラスミド)の大腸
菌培養液を卓上遠心機で 10,000 × g、5 分間遠心し、菌を回収する。上清を
捨て、ペーパータオルの上で逆さまにして余分な培地を除く。
2. 250µl の Wizard® Plus SV Cell Resuspension Solution を加え、ボルテック
スまたはピペッティングにより大腸菌のペレットを完全に攪拌する。**細胞を
完全に攪拌することが重要です。**攪拌した大腸菌を滅菌済み 1.5ml 微量遠
心チューブに移す(すでに 1.5ml 微量遠心チューブで行っている場合には、そ
のまま以下のステップに進んでください)。
3. 250µl の Wizard® Plus SV Cell Lysis Solution を加え、4 回の転倒混和により
混合する(**ボルテックスはしないでください**)。細胞溶解液が透明になるま
で、約 1 ~ 5 分間インキュベートする。

注意: Alkaline Protease Solution の添加(ステップ 4)に進む前に、大腸菌溶解
液が半透明になっていることを確認してください。5 分間以上のインキュ
ベーションは行わないでください。

注意: A600 の値で 2 ~ 4
が菌の回収とプラスミ
ド DNA の単離に適しま
す。

染色体 DNA のせん断を
起さないように、ス
テップ 2 以降では転倒
混和を行い、ボルテッ
クスはしないでくださ
い。



4. 10 μ l の Alkaline Protease Solution を加え、4 回の転倒混和により混合する。室温で**5分間**インキュベートする。アルカリプロテアーゼは、エンドヌクレアーゼや細菌を溶解する時に放出され、単離した DNA の精製度を低下させるタンパク質を不活性化します。
5. 350 μ l の Wizard® Plus SV Neutralization Solution を加え、すぐに4回の転倒混和により混合する**(ボルテックスはしないでください)**。
6. 大腸菌溶解液を最高速度(約 14,000 × g)で室温、10分間遠心する。

プラスミドDNAにニックを生じる可能性があるため、**ステップ4**で Alkaline Protease Solutionを加えてから5分以上インキュベートしないでください。

C. プラスミドDNAの単離および精製プロトコール

Miniprep Vacuum Adapters が添付された Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (カタログ番号A1340またはA1470)をお使いの場合、プラスミドDNAの精製方法を選択できます。遠心プロトコールでは、大腸菌溶解液を Spin Column に通したり、カラムに結合したDNAを洗浄するために**微量高速遠心機**を用います。また、吸引プロトコールでは、遠心操作に代わり**吸引圧**を利用して溶解液をカラムに通したり、カラムの洗浄を行います。Minipreps Vacuum Adapterを用いると吸引装置(例えばVac-Man® Laboratory Manifold)と真空ポンプを使ってDNA精製を行うことができます。

遠心プロトコール

Spin Column を 2ml Collection Tube に差し込み、各サンプルにつきプラスミドDNA精製ユニットを準備する。

1. 大腸菌溶解液の上清(約 850 μ l、セクション III.B、ステップ6参照)を準備した Spin Column に静かに移す。白色の沈殿に触れたり、上清と一緒に沈殿をカラムに移さないようにご注意ください。
2. この上清を微量遠心機の最高速度で室温、1分間の遠心を行う。2ml Collection Tube から Spin Column をはずし、通過した溶液を Collection Tube から捨てる。Collection Tube に Spin Column を再び挿入する。
3. あらかじめ95%エタノールを加えて希釈した 750 μ l の Column Wash Solution を Spin Column に加える。
4. 微量遠心機の最高速度で室温、1分間の遠心を行う。2ml Collection Tube から Spin Column をはずし、通過した溶液を Collection Tube から捨てる。Collection Tube に Spin Column を再び挿入する。

吸引プロトコール

吸引装置 (Vac-Man® または Vac-Man® Jr. Laboratory Vacuum Manifold) のポートに Luer-Lok Stop Cock を介して Miniprep Vacuum Adapter を取り付ける。Spin Column を Miniprep Vacuum Adapter にぴったりと収まるまで押し込む。

1. 大腸菌溶解液の上清(約 850 μ l、セクション III.B、ステップ6参照)を準備した Spin Column に静かに移す。白色の沈殿に触れたり、上清と一緒に沈殿をカラムに移さないようにご注意ください。
2. 少なくとも 15 インチ Hg の吸引圧で Spin Column を吸引する。すべての溶液が Spin Column を通過してから吸引を停止する。
3. あらかじめ95%エタノールを加えて希釈した 750 μ l の Column Wash Solution を Spin Column に加える。
4. Spin Column を吸引し、Column Wash Solution を通す。すべての溶液が Spin Column を通過してから吸引を停止する。

注意: 白色の沈殿を誤って Spin Column に移してしまった場合、Spin Column 内の溶液を滅菌した 1.5ml 微量遠心チューブに戻し、最高速度で 5 ~ 10 分間の遠心をもう一度行ってください。遠心後の上清を同じ Spin Column に移してください。Spin Column は同一のサンプルにのみ再使用できます。

インチ Hg に対する換算表

15 インチ Hg
50.8 kPa
381 Torr
0.501 atm
7.37 psi
38.1 cm Hg
508 mbar

遠心プロトコール(つづき)

- 250 μ lのColumn Wash Solutionを加え、もう一度洗浄する。
- 最高速度で室温、2分間の遠心を行う。
- Column Wash Solutionを持ち込まないように注意しながら、Spin Columnを新しい滅菌済みの1.5ml微量遠心チューブに移す。Spin ColumnにColumn Wash Solutionが付いていた場合には、最高速度で1分間、もう一度遠心を行う。

吸引プロトコール(つづき)

- 250 μ lのColumn Wash Solutionを加え、もう一度洗浄する。吸引により溶液をSpin Columnに通す。
- さらに10分間の吸引によりSpin Columnを乾かす。
- 吸引を停止し、Spin Columnを2ml Collection Tubeに付ける。Spin Columnに残ったColumn Wash Solutionを除くために最高速度で2分間の遠心を行う。2ml Collection Tubeとこのステップで集めた溶液を廃棄する。

吸引と遠心プロトコール(つづき)

- Spin Columnを新しい滅菌済みの1.5ml微量遠心チューブに移す。
- 100 μ lのNuclease-Free WaterをSpin Columnに加え、プラスミドDNAを溶出する。最高速度で室温、1分間の遠心を行う。
- DNAを溶出した後、Spin Columnを1.5ml微量遠心チューブからはずし、廃棄する。
- 溶出したDNAを-20 または-20 以下で保存する場合、DNAは水溶液中で安定なためバッファーを加える必要はありません。4 で保存する場合、DNAはTE バッファー中で安定なため、100 μ lの溶出したDNAに対して10 μ lの10 \times TE バッファーを加えてください。
- 微量遠心チューブのフタを閉め、-20 またはそれ以下の温度で保存する。

注意: 精製したプラスミドDNAを自動化蛍光シーケンシングに用いる場合、ステップ11においてTE バッファーは加えないでください。

IV. 補足情報

A. プラスミドと大腸菌株の選択および調製

一晚培養した大腸菌からWizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systemを使って、プラスミドDNAを精製できます。プラスミドの収量は、プラスミドのコピー数、培養液中の細胞密度、培地の種類、大腸菌株などによって変わります。

プラスミドのコピー数はプラスミドDNAの収量に影響する重要な因子です。コピー数は複製起点を含む領域やその周囲の領域によって主に決定されます。レプリコンとして知られるこの領域は、細菌の酵素複合体によるプラスミドDNAの複製を調節します。あるDNA配列が特定のプラスミドに挿入された場合、複製の妨げとなり、プラスミドのコピー数が低下することがあります。

適当な抗生物質を含む新しいLuria-Bertani(LB)寒天培地から十分に隔離された単一コロニーを選び、適当な抗生物質を含む1~10mlのLB培地に接種します。接種した培地を37 で一晚(12~16時間)培養します。高コピー数の大腸菌の場合、A₆₀₀の値で2.0~4.0が菌体の回収とプラスミドDNAの単離に適した密度です。

B. 大腸菌株の選択

エンドヌクレアーゼは12kDaのペリプラスムタンパク質で、2本鎖DNAを分解します。このタンパク質はendA遺伝子にコードされています。大腸菌の遺伝子型endA1は、野生型endAの変異を表し、不活性型のヌクレアーゼを産生します。この変異を含む大腸菌株は、EndA⁻として表されます。表1にEndA⁻とEndA⁺の大腸菌株を示します。

表 1. EndA⁻とEndA⁺の大腸菌株

EndA ⁻	EndA ⁺
BJ5183	BL21(DE3)
DH1	CJ236
DH20	HB101
DH21	JM83
DH5 TM	JM101
JM103	JM110
JM105	LE392
JM106	MC1061
JM107	NM522 (NM で始まるすべての大腸菌株は EndA ⁺)
JM108	NM554
JM109	P2392
MM294	PR700 (PR で始まるすべての大腸菌株は EndA ⁺)
SK1590	Q358
SK1592	RR1
SK2267	TB1
SRB	TG1
XL1-Blue	Y1088 (Y10 で始まるすべての大腸菌株は EndA ⁺)
XLO	BMH71-18
	ES1301

大腸菌の遺伝子型において、endA1(またはendA)がないということは、活性化型エンドヌクレアーゼIを発現する野生型遺伝子の存在を示します。野生型はEndA⁺で示されます。Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Systemを使った場合、EndA⁺とEndA⁻の両方の大腸菌株から高品質なDNAを簡単に単離することができます。しかし、多くのアプリケーションで、EndA⁺株が問題となる場合があります。一般的には、できるかぎりEndA⁻の大腸菌株を使用することを推奨します。特に自動化蛍光シークエンシングではEndA⁻が推奨されま

す。

蛍光DNAシークエンシングのようなアプリケーションでは、プラスミドの収量と品質を最適にするため、プラスミドと大腸菌株の選択について特に考慮が必要です。自動化蛍光シークエンシングでは、高コピー数プラスミドと増殖にEndA⁻の大腸菌株を使うことによって最適な結果が得られます。

C. アルカリプロテアーゼの使用

EndA + と EndA - の両方の大腸菌株から単離されたプラスミド DNA の品質を改善するためにプロメガの Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System には、Alkaline Protease Solution が含まれます。もともと subtilisin Carlsberg として同定されたアルカリプロテアーゼは、*Bacillus licheniformis* から単離されました(1)。大腸菌溶解液を調製するときに、エンドヌクレアーゼを不活性化するために、1 サンプルあたり約 250µg のアルカリプロテアーゼを溶解ステップの最後で加えます。アルカリプロテアーゼは非特異的にタンパク質を分解するため、大腸菌溶解液に混入するタンパク質の全体量を抑えることができます(2,3)。

アルカリプロテアーゼは pH9 以上で最適に機能します。アルカリ溶解ではこの状態にあるため、このステップにおいてよく機能します。溶解液が中和されたとき、アルカリプロテアーゼの活性は著しく減少します(4,5)。

この手順で調製された DNA は蛍光シーケンシング、制限酵素処理、クローニングを含む分子生物学実験の幅広い領域で使われています。

D. 自動化蛍光シーケンシングに適用するための注意点

自動化蛍光シーケンシングのアプリケーションに対して、プラスミドの収量と品質を最適にするためプラスミドと大腸菌株の選択について特に考慮が必要です。

精製したプラスミド DNA は蛍光サイクルシーケンシングに推奨される範囲の濃度(理想は 0.2µg/µl、0.1µg/µl 以下にならないように)にしなければなりません。低コピー数プラスミドから得られたプラスミド DNA を用いる場合、実験に使う前にアガロースゲル電気泳動 / エチジウムブロマイド染色により DNA 濃度を決定することを強く推奨します(6)。分光光度計による DNA の定量方法では誤りが生じることがあり、大量のサンプルが必要となります。

Wizard® Plus SV Minipreps System では、pGEM® Vector[®] と DH5™ 大腸菌を含む LB 培地の培養液 1.5ml を使った場合、通常 3.5 ~ 5.0µg のプラスミド DNA を回収できます。低コピー数プラスミドでは、シーケンシングに十分な量の DNA を得るためにより大量の培養液が必要です。低コピー数プラスミドの場合、pALTER® -1 Vector[®](アンピシリン耐性)と DH5™ 大腸菌を含む 10ml の LB 培養液から通常 1.5 ~ 3.0µg のプラスミド DNA が得られます。

BigDye™ を使ったシーケンシングを行うときの考慮事項

Wizard® Plus SV Minipreps System で得られた鋳型は、ABI PRISM® BigDye™ Terminator (Perkin-Elmer Corporation カタログ番号 4303149, 4303150, 4303151) の反応を含む多くの蛍光シーケンシング法に適しています。

BigDye™ Terminator プレミックスの希釈を行う時、適切な希釈溶液 (250mM Tris-HCl [pH 9.0], 10mM MgCl₂) を使って希釈することが重要です。

高コピー数プラスミドを使った場合、6 倍希釈した BigDye™ Terminator プレミックスから 500 塩基以上の配列を解読できます。

注意: 高コピー数プラスミドと EndA - の大腸菌を使うことで通常最適な蛍光シーケンシングの結果が得られます。

表2に、BigDye™ Terminator 反応で適切な希釈を行うために必要とされる BigDye™ Terminator プレミックスと希釈溶液の量を示します。これらの反応液の泳動についての詳細は、BigDye™ Terminator システムに添付されるプロトコールをご覧ください。各反応につき、表2に示した試薬を別々のチューブに加えてください。

表 2. BigDye™ Terminator 反応の希釈倍率

構成	溶液量			
	希釈なし	2倍希釈	4倍希釈	6倍希釈
Terminator プレミックス*	8.0µl	4.0µl	2.0µl	1.3µl
DNA 鋳型(2本鎖プラスミド)	200–500ng	200–500ng	200–500ng	200–500ng
プライマー	3.2pmol	3.2pmol	3.2pmol	3.2pmol
希釈バッファー**	0µl	2.0µl	3.0µl	3.4µl
Nuclease-Free Water で最終液量を調整する	20µl	20µl	20µl	20µl

* Terminator プレミックスは 2.5 × の溶液です。

** 希釈バッファーは 5 × の溶液です。

V. 困ったときには・・・

症状	考えられる原因	コメント
大腸菌の溶解が起こりにくい	培養液に含まれる大腸菌による大腸菌培養液の過培養	A600 において 2 ~ 4 を示す大腸菌培養液を使ってください。すべての培地に抗生物質を加えてください。 低コピー数および高コピー数のプラスミドそれぞれに対して推奨される培養液量を使ってください(低コピー数プラスミドでは最大 10ml、高コピー数プラスミドでは最大 5ml)。
	大腸菌ペレットの攪拌が十分でない	大腸菌の溶解を行う前に大腸菌ペレットを十分攪拌してください。Cell Resuspension Solution を加え、ボルテックスまたはピペッティングを行ってください。攪拌後には大腸菌の塊は見えなくなります。
プラスミド DNA が精製されない	Column Wash Solution にエタノールを加えていない	精製作業を始める前に、セクション III に従い、Column Wash Solution を調製してください。
	プラスミド DNA 収量の定量を誤っている	アガロースゲル電気泳動 / エチジウムブロマイド染色によりプラスミド DNA の収量を測定してください。
	ゲルにローディングすると、ウェルから DNA が浮き出す	最後の洗浄ステップの後に、カラムに残ったエタノールを完全に除くため、10分間の吸引による乾燥を確実に行ってください(吸引法の場合)。ローディングダイの濃度を上げてください。
	低コピー数プラスミドを使った	高コピー数プラスミドを使ってください。

V. 困ったときには・・・(つづき)

症状	考えられる原因	コメント
プラスミド DNA の収量が少ない	形質転換されていない大腸菌による大腸菌培養液の過培養	液体培地と寒天培地の両方に抗生物質を加えたことを確認してください。
	大腸菌の培養液が古い	抗生物質を含む培地に、一晚培養したプレートから新鮮な単一のコロニーを接種してください。37℃で12～16時間培養してください。
	低コピー数プラスミドを使った	使ったプラスミドのコピー数を確認してください。高コピー数プラスミドを推奨します。
	プラスミド DNA の収量が正確に定量されていない	アガロースゲル電気泳動/エチジウムブロマイド染色により確認してください。分光光度計をもちいた定量結果のみを当てにしないでください。
プラスミド DNA にニックが入る。	アルカリ溶解ステップのインキュベーションが長すぎる	Lysis Solution と Alkaline Protease Solution を大腸菌溶解液に加えたときのインキュベーションは、それぞれ5分以内にしてください。
蛍光自動シークエンシングで長く読めない	シークエンス反応に加えた DNA 量が少なすぎる	新しく単離した大腸菌のコロニーを新しい LB 培地に接種してください。プラスミド DNA を精製し、アガロースゲル電気泳動/エチジウムブロマイド染色で定量してください。
	DNA の溶出に TE buffer を使った	もう一度プラスミド DNA を精製し、Nuclease-Free Water で溶出してください。
	プラスミドの濃度が正しく定量されていない	プラスミド DNA の正確な定量にはアガロースゲル電気泳動/エチジウムブロマイド染色を使ってください。
制限酵素で消化されない	制限酵素の濃度が低い、または処理時間が短い	制限酵素の量を増やす、またはインキュベーション時間を延ばしてください。使っている制限酵素の最適温度と最適バッファーで消化してください。持ち越した塩を除くためにプラスミド DNA のエタノール沈殿を行ってください。
ゲノム DNA が混入している	ボルテックスや攪拌のしすぎによりゲノム DNA が混入している	ゲノム DNA のせん断を避けるため Lysis Solution を加えた後にサンプルをボルテックスしないでください。
	誤った試薬を使った	使用前に Column Wash Solution をエタノールで希釈したことを確認してください。注意: Wizard® Plus と Wizard® SV Plus の試薬に互換性はありません。
ゲル電気泳動で確認した DNA 収量が、分光光度計の結果と比較して低いように見られる	分光光度計の読み値を上げる混入物が溶出された DNA に存在する	フェノール:クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行い、70%エタノールで洗浄後に、再び分光光度計による測定を行ってください。最も正確な定量結果を得るためにはアガロースゲル電気泳動/エチジウムブロマイド染色によって DNA の定量を行います。

VI. バッファーと溶液の組成

10 × TE buffer

100mM Tris-HCl (pH 7.5)
10mM EDTA

LB medium

10g casein peptone
5g yeast extract
5g NaCl
15g agar (寒天培地作成時のみ)

1Lの蒸留水に溶解する。オートクレーブし、55℃まで冷ましてから抗生物質を加える(表1を参照)。

VII. 関連製品の紹介

Wizard® SV 96 Plasmid DNA Purification Systems

製品名	サイズ	カタログ番号
Wizard® SV 96 Plasmid DNA Purification System(a)	1 × 96 回分	A2250
	5 × 96 回分	A2255
Wizard® SV 96 Cell Resuspension Solution	500ml	A7113
Wizard® SV 96 Cell Lysis Solution	500ml	A7123
Wizard® SV 96 Neutralization Solution	500ml	A1481
Wizard® SV 96 Wash Solution	185ml	A1311
Wizard® SV 96 DNA Binding Plates	10 枚入	A2271
Wizard® SV 96 Lysate Clearing Plates	10 枚入	A2241
Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold	20 個口	A7231
Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold	2 個口	A7660
Vac-Man® 96 Vacuum Manifold	96 ウェルフォーマット	A2291
Vacuum Miniprep Adapters	20 個	A1331
SV Total RNA Isolation System(d)	50 回分	Z3100
SV Total RNA Isolation System, Trial Size	10 回分	Z3101

VIII. 参考文献

1. Guntelberg, A.V. and Otteson, M. (1954) *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* **29**, 36.
2. Aehle, W. *et al.* (1993) Rational protein engineering and industrial application: structure prediction by homology and rational design of protein-variants with improved 'washing performance'—the alkaline protease from *Bacillus alcalophilus*. *J. Biotechnol.* **28**, 31.
3. van der Osten, C. *et al.* (1993) Protein engineering of subtilisins to improve stability in detergent formulations. *J. Biotechnol.* **28**, 55.
4. Vetter, R. *et al.* (1994) Highly alkaline proteases. U.S. Pat. No. 5,352,603. (October 4, 1994).
5. Shetty, J.K., Patel, C.P. and Nicholson, M.A. (1995) Method of preparation of purified alkaline protease. U.S. Pat. No. 5,439,817. (August 8, 1995).
6. Kahn, M. *et al.* (1979) Plasmid cloning vehicles derived from plasmids *ColE1*, *F*, *R6K*, and *RK2*. *Meth. Enzymol.* **68**, 268.

このプロトコールは、このキットを使ったことがあるユーザーが流れを追うことを目的に作成されています。初めてお使いになる方は本文のセクション III を参照してください。

<p>大腸菌溶解液の調製 (セクション III.B)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 大腸菌培養液を 10,000 × g で 5 分間遠心し、大腸菌をペレットにする。 2. 250µl の Cell Resuspension Solution を加え、各サンプルを完全に懸濁する。 3. 250µl の Cell Lysis Solution を各サンプルに加え、4 回の転倒混和により攪拌。 4. 10µl の Alkaline Protease Solution を加え、4 回の転倒混和により攪拌。室温で 5 分間インキュベート。 5. 350µl の Neutralization Solution を加え、4 回の転倒混和により攪拌。 6. 最高速度で室温、10 分間遠心。 	
<p>プラスミド DNA の結合 (セクション III.C)</p>	<p>遠心法による精製:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Spin Column を Collection Tube に挿入する。 2. 大腸菌溶解液を準備した Spin Column に移す。 3. 最高速度で室温、1 分間遠心。通過した液体を捨て、Collection Tube に Spin Column を挿入する。 	<p>吸引法による精製:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. マニホールドのポートに Miniprep Vacuum Adapter を取り付け、Adapter Tube に Spin Column を再び挿入する。 2. 大腸菌溶解液を準備した Spin Column に移す。 3. 吸引により、カラムに液体を通過させる。すべての液体がカラムを通過した後、吸引を止める。
<p>洗浄 (セクション III.C)</p>	<p>遠心法による精製:</p> <ol style="list-style-type: none"> 4. エタノールで希釈済みの 750µl の Wash Solution を加える。 5. 最高速度で室温で 1 分間遠心。通過した液体を捨て、Collection Tube に Spin Column を再び挿入する。 6. 250µl Wash Solution を加え、ステップ 5 を繰り返す。 7. 最高速度で室温、2 分間遠心。 	<p>吸引法による精製:</p> <ol style="list-style-type: none"> 4. エタノールで希釈済みの 750µl の Wash Solution を加える。カラムに液体を通過させるために吸引する。 5. 吸引を止め、250µl Wash Solution を加え、ステップ 4 を繰り返す。 6. 吸引を 10 分間続けて、Spin Column を乾かす。 7. Spin Column を 2ml Collection Tube に移し、最高速度で 2 分間遠心。
<p>溶出 (セクション III.C)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 8. Spin Column を滅菌した 1.5ml 微量遠心チューブに移す。 9. DNA を溶出するために、100µl の Nuclease-Free Water を Spin Column に加える。最高速度で室温、1 分間遠心。 10. DNA の溶出後、1.5ml 微量遠心チューブから Spin Column をはずし、Column を廃棄する。 11. DNA を -20 または -20 以下で保存する。TE バッファー中に保存するには、10µl の 10 × TE バッファーを溶出した DNA に加える。TE バッファー中ならば 4 に保存できます。 	