

QuickLyse Miniprep プロトコールとトラブルシューティング

シーケンシング・グレードのプラスミドDNA精製

目次	ページ
プロトコール	
QuickLyse Miniprep Kitを用いたプラスミドDNA精製	2
トラブルシューティング	4

【重要事項】

品質実験の結果、RNaseおよび リゾチームを2～8℃で保存するとこれらの酵素の安定性が増加しました。お届けしたキットからすぐにRNaseおよびリゾチームのチューブを取り出し、2～8℃で保存してください。

またRNaseおよびリゾチームを添加したBuffer QLLは、2～8℃で保存してください。この温度で保存すると、この調製Buffer QLLは最高4ヶ月間安定です。

他の試薬はすべて室温（15～25℃）で保存してください。



プロトコール：QuickLyse Miniprep Kitを用いた プラスミドDNA精製

本プロトコールは、LB (Luria-Bertani) 培養液で一晩培養した *E. coli* 培養液 1.5 ml から、3 ~ 8 µg の高コピー数のプラスミドDNAを精製するためにデザインされています。

本プロトコールを始める前に“Important Notes”(英語版 Handbook 11 ~ 13 ページ)をお読みください。

実験を始める前の準備事項

- 英語版 Handbook 12 ページの説明に従って Complete Lysis Solution を調製したことを確認します。
- 氷上で Complete Lysis Solution を 4 以下に冷却します。
- 英語版 Handbook 13 ページの説明に従って Buffer QLW を希釈したことを確認します。

操作手順

1. 2 ml の QuickLyse Lysis Tube (添付) に 1.5 ml の細胞培養液 (OD₆₀₀ 2.0 ~ 4.0) を入れ、一般的な卓上マイクロ遠心機で室温 (15 ~ 25)、13,000 rpm (約 17,000 x g) で1分間遠心して、細胞をペレット化する。
1.5 ml の培養液は OD₆₀₀ 2 以上で使用しますが、バクテリアの量が多すぎると不十分な溶解を引き起こし、その結果収量とDNA品質が低下します。
2. 培養液をデカントまたはピペティングにより除去する。
ペーパータオルの上にチューブを逆さに置いて、培養液をできるだけ完全に除去します。
3. 氷冷した Complete Lysis Solution 400 µl をペレット化したバクテリア細胞に添加する。
最大のDNA収量を得るために Complete Lysis Solution を氷冷 (< 4) する必要があります。
4. 最高の速度設定で30秒間ボルテックスにより完全に混和する。
このステップは最大のDNA収量を得るために重要です。
ペレットが完全に再懸濁していない場合には、細胞塊が見えなくなるまでボルテックスを続けます。
5. 室温 (15 ~ 25) で3分間インキュベートする。
ライセートの粘性がなくなり、わずかに濁りますが、沈殿は生じません。
6. デカントまたはピペティングによりライセートを QuickLyse スピンカラムに入れる。

7. 卓上遠心機で13,000 rpm (約17,000 x g) 30 ~ 60秒間遠心操作を行なう。
ろ液を捨てる必要はありません。
8. 希釈したBuffer QLW 400 µlを添加して、13,000 rpm (約17,000 x g) で30 ~ 60秒間の遠心操作を行ない、QuickLyse スピんカラムを洗淨する。ろ液を捨てる。
9. QuickLyse スピんカラムを使用済みチューブにもどし、遠心機にセットする。
10. 13,000 rpm (約17,000 x g) で1分間遠心操作を行ない、QuickLyse スピんカラムを乾かす。
11. QuickLyse スピんカラムを新しいコレクション・チューブに移す。QuickLyse スピんカラムの中央に50 µlのBuffer QLEをピペットで直接入れて、DNAを溶出する。13,000 rpm (約17,000 x g) で30 ~ 60秒間遠心操作する。
溶出量を一定にするために、Buffer QLEをカラムの壁ではなく、カラムの中央にピペットでアプライします。
溶出したDNAはダウンストリーム反応に直ぐに使用することも、-20 で保存することも可能です。

トラブルシューティングガイド

コメント

回収率が低い、あるいは全く回収されない

一般的な原因

低収量は様々な原因により生じる。問題の原因を見つけるために、操作の各ステップで保存した画分をアガロースゲルで解析する。ライセートの少量および全ろ液に0.7倍容量のイソプロパノールを添加し、最高速度（13,000 rpmあるいは約17,000 x g）で30分間遠心してペレットを得る。洗浄ステップのろ液には0.1倍容量の3 Mの酢酸ナトリウム*、pH 5.0、および0.7倍容量のイソプロパノールを添加して沈殿させる。

溶出液中のDNAが少ないか皆無

- a) プラスミドが増殖しなかった 増殖の全ステージで適切な抗生物質を添加したことを確認する。英語版 Handbook 18 ~ 21 ページの (Growth of bacterial cultures) を参照にして最適な培養条件をチェックする。
- b) 細胞の再懸濁が不十分 30 秒間ボルテックスしたことを確認する。ペレットが完全に再懸濁されていない場合には、細胞塊が見えなくなるまでボルテックスする。
- c) ライセートのインキュベーション時間が短い 少なくとも3分間ライセートをインキュベートしたことを確認する（ステップ3）。インキュベーションを長くする（最高5分間）と収量が増加することがある。
- d) Buffer QLL が正しく保存されていないあるいは古い 保存条件とバッファの調製月日を確認する。
- e) Buffer QLW が正しく調製されていない 説明に従ってイソプロパノールを添加したことを確認する。

* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。詳細は製品メーカーの相当するMSDS (material safety data sheet) をご覧ください。

コメント

- f) ベクター / 宿主の組み合わせ
ライセートにイソプロパノールを添加すると収量が増加するベクター / 宿主の組み合わせがある。ステップ6のインキュベーション後 125 μ l のイソプロパノール (95 ~ 100%) をライセートに添加する。
- g) カラムにオーバーロード
培養液の OD₆₀₀ が 2.0 ~ 4.0 であることを確認する。
- h) Buffer QLE がメンブレンに適切にアプライされていない
バッファーがメンブレンを完璧に覆い、溶出効率が最高になるように、Buffer QLE を QuickLyse メンブレンの中央にのせる。

DNA の品質が低い

一般的な原因

Complete Lysis Solution が温かすぎる。Complete Lysis Solution を氷上 (0 ~ 4) で保管する。

前記の “ 細胞の再懸濁が不十分 ” および “ Buffer QLW が正しく調製されていない ” を参照する。

溶出液中に RNA

- a) RNase A による分解を省略
使用直前に RNase A を凍結乾燥したリゾチームに添加してから Complete Lysis Solution に添加したことを確認する。
- b) RNase A による分解が不十分
必要に応じて培養液量を減らす。

株式会社 キアゲン ■ 〒 104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II
Tel:03-6890-7300 ■ Fax:03-5547-0818 ■ E-mail:techservice.jp@qiagen.com



W W W . Q I A G E N . C O . J P

2301082 10/2006