

この日本語版は英語版 June 2005 に対応します

# EndoFree<sup>®</sup> Plasmid Purification プロトコールとトラブルシューティング

EndoFree Plasmid Maxi、Mega、および Giga Kit  
高度なトランスフェクション・グレード用超高純度  
プラスミド DNA 精製

目次	ページ
プロトコール	
EndoFree Plasmid Maxi Kit を用いたプラスミドあるいは コスミド DNA 精製	2
EndoFree Plasmid Mega/Giga Kit を用いたプラスミドあるいは コスミド DNA の精製	8
トラブルシューティング	14



# プロトコール： EndoFree Plasmid Maxi Kit を用いたプラスミドあるいはコスミド DNA の精製

このプロトコールは、EndoFree Plasmid Maxi Kit を使って 500 µg までのエンドトキシンフリー DNA を精製するものです。エンドトキシンフリー DNA は感受性の高い真核細胞へのトランスフェクションに優れており、遺伝子治療の研究には必須です。エンドトキシンに関するバックグラウンドは英語版 Handbook 38 ~ 41 ページをご覧ください。クロラムフェニコール存在下で増幅した低コピーのプラスミドは、適切な培養液量を決定する際、高コピーのプラスミドとして取り扱ってください。

推奨する培養液量の上限\*

EndoFree Maxi	
高コピーのプラスミド	100 ml
低コピーのプラスミド <sup>1</sup>	250 ml

\* 上記の培養液量から高コピーのプラスミドを精製する場合の予想収量は 300 ~ 500 µg、低コピーのプラスミドを精製する場合の予想収量は、50 ~ 250 µg です。

<sup>1</sup> QIAfilter Maxi Cartridge の容量から推薦できる最大培養液量です。低コピーのプラスミドが多量に必要な場合は、2本の QIAfilter Maxi Cartridge からのライセートを 1本の QIAGEN-tip 500 にロードできます。

## 実験を始める前の重要事項

- 新規ユーザーはこのハンドブックに記載されている詳細なプロトコールを利用されることを強くお勧めします。また、包括的なバックグラウンド情報もウェブサイトのプラスミド関連ページ [www.qiagen.com/goto/plasmidinfo](http://www.qiagen.com/goto/plasmidinfo) でご覧いただけます。
- 低コピーのベクターを精製する場合は、アルカリ溶解効率を高めることで DNA 収量を増やすために、溶解バッファー量を増やします。Buffer P1、P2、P3 が足りない場合は英語版 Handbook 42 ページの Appendix C “Composition of Buffers” をご覧ください。またバッファーや QIAfilter Cartridge の別途購入も可能です（英語版 Handbook 47 ページ参照）。
- 溶出およびそれ以後の操作（ステップ 13 から先）ではエンドトキシンフリーあるいはパイロジェンフリーのプラスチックピペットチップ、溶出液用のチューブをお使いください。エンドトキシンフリーあるいはパイロジェンフリーのプラスチック容器は一般的な小売販売店から購入できます。販売店にお問い合わせください。ガラスチューブでも 180 °C で一夜加熱処理したものは使用可能です。
- 通常のプロトコールと異なり、Buffer P3 の添加後は氷上でインキュベートしないでください。
- オプション：☞ 表示のあるところでは、分析用ゲル電気泳動によって実験の経過を確認するため、サンプルの一部を採取してください（英語版 Handbook 36 ページ参照）。

## 実験を始める前の準備事項

- 使用前に Buffer P1 にキットの RNase A 液を加えてください。RNase A の 1 バイアル分（使用前に軽く遠心する）を Buffer P1 のボトルに添加すれば、最終濃度 100 µg / ml となります。
- エンドトキシンフリーの 70 % エタノールは、96 ~ 100 % のエタノール 40 ml をキットの中に入っているエンドトキシンフリー水に添加して調製します。
- 低温保存中に Buffer P2 に SDS の沈澱が生じていないかどうかを確かめてください。SDS の沈澱が生じているようであれば、37 °C に加温して SDS を溶かしてから使用してください。
- Buffer P3 は、あらかじめ 4 °C に冷却してから使用してください。
- オプション：使用前にキットに入っている LyseBlue 試薬を Buffer P1 に添加し、混和します。LyseBlue の 1 バイアル分を使用前に軽く遠心し、Buffer P1 のボトルに添加すれば、1000 倍に希釈されます。LyseBlue によりバッファーが最適に混和されたことを目で確認でき、非効率的な細胞溶解や SDS、ゲノム DNA、細胞破片の不完全な沈澱を引き起こす一般的な操作ミスを防ぐことができます。詳細は英語版 Handbook 15 ページの “ Using LyseBlue reagent ” をご覧ください。

## 操作手順

1. 新しく作製した選択プレートから単一コロニーを採取し、適切な抗生物質を含んだ LB 培養液 2 ~ 5 ml に接種する。37 °C で約 8 時間、激しく振盪培養する（約 300 rpm）。  
培養液量の少なくとも 4 倍以上の容量を有するチューブあるいはフラスコを使用してください。
2. スターター培養液を 500 ~ 1000 倍に選択 LB 培養液で希釈する。高コピープラスミドにはスターター培養液 100 ~ 200 µl を培養液 100 ml に、低コピープラスミドにはスターター培養液 250 ~ 500 µl を培養液 250 ml に接種する。37 °C で 12 ~ 16 時間、激しく振盪培養し（~ 300 rpm）バクテリア細胞を培養する。  
培養液量の少なくとも 4 倍以上の容量を有するフラスコや容器を使用してください。この培養条件下では培養細胞密度は約  $3 \sim 4 \times 10^9$  個/ml に達し、湿重量にして通常、約 3 g/l のペレットに相当します（英語版 Handbook 12 ページ）。
3. 4 °C で 6,000 x g、15 分間遠心操作し、バクテリア細胞を回収する。  
○ ここで操作を中断する場合は、収集したバクテリアペレットは -20 °C に保存してください。

4. バクテリアペレットを 10 ml の Buffer P1 に再懸濁する。

バクテリアを効率よく溶解させるためには、溶解バッファーを完全に混和させるのに十分な容量を有する容器を使用することが大切です。Buffer P1 に RNase A を加えたことを確認してください。

LyseBlue を Buffer P1 に添加している場合は、使用前に瓶を強く振って、LyseBlue 粒子を完全に再懸濁します。細胞塊が無くなるまでボルテックスやピペッティングによりバクテリアを完全に再懸濁します。

5. 10 ml の Buffer P2 を添加後、4 ~ 6 回激しく転倒させ充分に混和し、5 分間室温 (15 ~ 25 ) に放置する。

ボルテックスするとゲノム DNA が切断されるのでボルテックスしないでください。ライセートは粘稠になります。溶菌反応は 5 分間以上行なわないでください。Buffer P2 が空気中の CO<sub>2</sub> を吸収して酸性になるのを防止するため、Buffer P2 ボトルの使用後は、直ちにしっかりと蓋を閉じて保存してください。

LyseBlue を Buffer P1 に添加している場合は、Buffer P2 添加後に細胞懸濁液は青色になります。混和により溶液は均一な青色になります。溶液に無色の部分があったり、茶系色の細胞塊が観察される場合は、溶液が均一な青色になるまで混和してください。

室温に放置している間に QIAfilter Cartridge を準備する。

QIAfilter Maxi Cartridge の出口ノズルにキャップを取り付ける。QIAfilter Cartridge を適当なチューブ上に置く。

6. 冷却した 10 ml の Buffer P3 をライセートに添加後、直ちに 4 ~ 6 回激しく転倒混和する。すぐにステップ 7へ進む。氷上でライセートをインキュベートしない。

冷却した Buffer P3 を使用すると沈澱が促進されます。Buffer P3 を添加すると白色綿毛状の物質が形成され、ライセートの粘稠が少なくなります。沈澱物にはゲノム DNA、タンパク質、細胞の破片、およびドデシル硫酸カリウムなどが含まれています。ドデシル硫酸カリウム塩の沈澱が部分的に偏らないようにライセートを充分に混和してください。混合液が粘性を帯び、茶色っぽい場合には、溶液を完全に中性化するためにさらに混ぜてください。沈澱層が壊れるのを避けるために、ライセートを QIAfilter Cartridge に迅速に移すことが重要です。

LyseBlue 試薬を使用している場合は、青色が消え懸濁液が無色になるまで十分に混和します。均一で無色な溶液は SDS が効率的に沈澱したことを示します。

7. QIAfilter Cartridge の中にライセートを注ぎ、室温 (15 ~ 25 ) で 10 分間インキュベートする。ここでプランジャーを挿入しない。

**重要：**室温で 10 分間放置する事は、QIAfilter Maxi cartridge の性能を十分に発揮させるために重要です。放置中に Cartridge を攪拌しないでください。タンパク質、ゲノム DNA、界面活性剤等の沈殿物は液体の表面に浮遊層を作るので、目詰まりなく、ろ過が簡便に行なえます。10 分放置後、溶液の表面に浮遊層を形成しなければ、注意深く無菌ピペットチップで Cartridge の壁面から沈殿物を引き剥がします。

8. QIAfilter Cartridgeの出口ノズルからキャップを取り除く。静かにプランジャーをQIAfilter Maxi Cartridgeに入れ、細胞ライセートを50 mlのチューブにろ過する。

強い力は加えないで全ライセートがQIAfilter Cartridgeを通過するまでろ過してください。ろ過後、約25 mlのろ過液が一般に回収されます。

⇒ 120 µlのろ過液を分析用サンプル（サンプル1）として採取保存しておき、培養、溶解条件が最適であったかを確認します。

9. 2.5 mlのBuffer ERをろ過したライセートに添加、約10回転倒混和し、その後30分間氷上でインキュベートする。

Buffer ERを加えるとライセートに濁りが生じますが、氷上でインキュベーション中に澄んできます。

10. QIAGEN-tip 500に10 mlのBuffer QBTを加え、カラムが空になるまで自然落下させ平衡化する。

平衡化バッファーに含まれている界面活性剤によって表面張力が減少すると、バッファーは自然に流出し始めます。QIAGEN-tipに添加したバッファーを完全に流出させます。バッファーの液面がカラム中の上のフリットに達するとバッファーの流出は停止するので、QIAGEN-tipを見張っている必要はありません。

11. ステップ9からのろ過ライセートをQIAGEN-tipに添加し、自然落下によりカラムへ浸透させる。

Buffer ERによるライセートの濁りが再び生じることがあります。しかしプラスミド調製に悪影響はおよぼしません。

⇒ 120 µlのフロースルーサンプルを分析用サンプル（サンプル2）として採取保存しておき、後でQIAGEN ResinとのDNA結合率を決定します。

12. QIAGEN-tipを2 x 30 mlのBuffer QCで洗浄する。

QIAGEN-tipにBuffer QCを添加してバッファーを自然落下により通過させます。1回目の洗浄でプラスミドDNAサンプル中に混入している大部分の夾雑物を除去することができます。大量培養の場合、あるいは多量の炭水化物を産生する菌株を用いた場合には、2回目の洗浄が特に必要です。

⇒ 1回目、2回目の洗浄画分の混和液から240 µlを採取、保存し、分析用サンプル（サンプル3）とします。

注：これより後の操作では、エンドトキシンフリーのプラスチック器具（例えば新しいポリプロピレン製の遠心チューブなど）、または前処理済みのガラス器具を利用してください。

13. Buffer QN 15 ml でDNAを溶出する。

溶出液を 30 ml 容量のエンドトキシンフリーあるいはパイロジェンフリーの遠心チューブに集めます。ポリカーボネイト製の遠心チューブは、次のステップで使用するアルコールに耐性がないため、お勧めしません。

注：45 ~ 50 kb 以上のコンストラクトでは、溶出バッファを 65 °C に温めて使用すると収量が増加することがあります。

⇒ 60 µl の溶出液を分析用サンプル（サンプル 4）として採取保存しておきます。

⊗ ここで操作を中断する場合は、溶出液は 4 °C で保存してください。一晩以上保存しておくことは避けてください。

14. 溶出液に 10.5 ml（0.7 倍容量）のイソプロパノール（室温）を添加してDNAを沈澱させる。混和した後、直ちに、4 °C、15,000 x g 以上で 30 分間遠心する。遠心上清を注意深くデカントする。

全ての溶液は、塩の沈澱が生ずるのを防止するために室温で保存しますが、遠心はオーバーヒーティングを防ぐ目的で 4 °C で行ないます。あるいは、ディスプレイザブルのコニカル遠心チューブを用いて 4 °C、5,000 x g で 60 分遠心することもできます。イソプロパノールの添加によって得られるペレットは透明で、エタノール沈澱によって得られる塩を含む綿状のペレットに比べて検出が困難です。遠心操作をする前に、遠心チューブの外壁に印をつけておき、ペレットがチューブのどの位置にあるかを判別しやすくなります。イソプロパノールペレットは、遠心チューブの内壁から剥がれやすくなっているため、遠心上清を捨てる際には十分に注意してください。

15. DNA ペレットをエンドトキシンフリーで室温の 70 % エタノール（キットに添付されているエンドトキシンフリー水に 96 ~ 100% エタノール 40 ml を加えて調製）5 ml で洗浄し、15,000 x g 以上で 10 分間遠心する。ペレットが移動しないように遠心上清を注意深くデカントする。

あるいは、ディスプレイザブルのコニカル遠心チューブを用いて 4 °C、5,000 x g で 60 分遠心することもできます。70 % エタノール洗浄によって沈澱している塩を除去し、イソプロパノールを揮発しやすいエタノールに置き換えると、DNA が溶解しやすくなります。

16. ペレットを 5 ~ 10 分間、空気乾燥して、適切な量のエンドトキシンフリー Buffer TE に溶かす。

ガラス製の遠心チューブを使用した場合には特に、遠心チューブの内壁から DNA ペレットをよく洗い落として再溶解します。DNA 切断の原因となるので、再懸濁するときにピペッティング操作を繰り返し行なうことは避けてください。DNA ペレットを乾燥させすぎると、再溶解しにくくなります。DNA は弱アルカリ性の条件下でよく溶けますが、酸性バッファには溶けにくい性質をもっています。

## 収量の測定

DNAの収量を決める際には、UV分光光度計による260 nmでの測定とアガロースゲル電気泳動による定量分析を併用してDNAの濃度を決めます。分光光度計で正確なDNA定量を行なうためには、 $A_{260}$ 測定値が0.1 ~ 1.0の間であるべきです。

## アガロースゲル解析

精製操作の際にサンプルの一部を採取・保存することをお勧めします（サンプル1 ~ 4）。プラスミドDNAの収量や品質が低い場合は、アガロースゲル電気泳動でサンプルを解析し、精製操作のどのステージで問題が生じたかが判断できます（英語版 Handbook 36ページ参照）。

# プロトコール： EndoFree Plasmid Mega/Giga Kitを用いたプラスミドあるいはコスミド DNAの精製

このプロトコールは、EndoFree Plasmid Mega Kitを使って2.5 mgまでの低コピーあるいは高コピーのプラスミドあるいはコスミド DNA、EndoFree Plasmid Giga Kitを使って10 mgまでの高コピープラスミドあるいはコスミド DNAを精製するためのものです。エンドトキシンフリー DNAは感受性の高い真核細胞へのトランスフェクションに優れており、遺伝子治療の研究には必須です。エンドトキシンに関するバックグラウンド情報は英語版 Handbook38 ~ 41 ページをご覧ください(EndoFree Plasmid Giga Kitは低コピーのプラスミドあるいはコスミド DNA 精製には適していません)。クロラムフェニコール存在下で増幅した低コピーのプラスミドは、適切な培養液量を決定する際、高コピーのプラスミドとして取り扱ってください。

推奨する培養液量の上限\*

	EndoFree Mega	EndoFree Giga
高コピーのプラスミド	LB 培養液 500 ml (ペレット湿重量 1.5g)†	LB 培養液 2.5 リットル - (ペレット湿重量 7.5g)†
低コピーのプラスミド	LB 培養液 2.5 リットル - (ペレット湿重量 7.5g)†	低コピーのプラスミド あるいはコスミドには 推奨しない‡

\* 高コピーのプラスミドを精製する場合の予想収量は、EndoFree Plasmid Mega Kitでは1.5 ~ 2.5 mg、EndoFree Plasmid Giga Kitでは7.5 ~ 10 mgです。低コピーのプラスミドを精製する場合の予想収量はEndoFree Plasmid Mega Kitでは0.5 ~ 2.5 mgです。EndoFree Plasmid Giga Kitを用いた低コピー数のプラスミドからの精製は推奨しません。

† 通常振盪した培養液 1 リットル - から平均湿重量約 3 g のペレットが得られます。回転型発酵槽を用いた培養液からのペレットの湿重量は著しく増加します。従って、このような培養液を使用する際は培養液量ではなく湿重量を参照してください。

‡ 低コピーのプラスミドあるいはコスミド DNA 精製には大量の培養液が必要であり、QIAfilter Mega-Giga Cartridge の容量に限界があるために、低コピーのプラスミドあるいはコスミド DNA 精製には EndoFree Plasmid Giga Kit よりも EndoFree Plasmid Mega Kit を使用されることをお勧めします。

## 実験を始める前の重要事項

- 新規ユーザーはこのハンドブックに記載されている詳細なプロトコールを利用されることを強くお勧めします。また、包括的なバックグラウンド情報もウェブサイトのプラスミド関連ページ [www.qiagen.com/goto/plasmidinfo](http://www.qiagen.com/goto/plasmidinfo) でご覧いただけます。
- 低コピーのベクターを精製する場合は、アルカリ溶解効率を高めることで DNA 収量を増やすために、溶解バッファー量を増やします。Buffer P1、P2、P3 が足りない場合は英語版 Handbook42 ページの Appendix C “Composition of Buffers” をご覧ください。またバッファーや QIAfilter Cartridge の別途購入も可能です(英語版 Handbook 47 ページ参照)。



- 溶出およびそれ以後の操作（ステップ15から先）ではエンドトキシンフリーあるいはピロジェンフリーのプラスチックピペットチップ、溶出液用のチューブをお使いください。エンドトキシンフリーあるいはピロジェンフリーのプラスチック容器は一般的な小売販売店から購入できます。販売店にお問い合わせください。ガラスチューブでも180℃で一夜加熱処理したものは使用可能です。
- QIAfilter Mega-Giga Cartridgeは1リッターの耐圧性ガラス瓶（45 mm、Schott、cat. no. 2181054、あるいはCorning、cat. no.1395-1L）用にデザインされています。注：ガラス瓶はキットには入っていないので、お客様にてご用意ください。カートリッジは、-200から-600 millibarの間（-150から-450 mm Hg）で吸引可能な装置（house vacuum、真空ポンプ、アスピレーター）で使用できます。吸引圧力は瓶の内側と大気（1013 millibarsあるいは760 mm Hg）の圧力差を測定しています。推奨する圧力は外気圧に対しての必要な圧力の減少で示しているために、マイナスで示しています。
- 内破を防ぐため、耐圧性の仕様でないプラスチック/ガラス瓶その他の容器は用いないでください。ひびが入ったり傷のあるプラスチック/ガラス瓶その他の容器を使用しないでください。吸引中に近辺で仕事をする場合には安全のため眼鏡を着用してください。
- オプション：☞表示のあるところでは、分析用ゲル電気泳動によって実験の経過を確認するため、サンプルの一部を採取してください（英語版 Handbook 36ページ参照）。
- 通常のプロトコールと異なり、Buffer P3の添加後は氷上でインキュベートしないでください。

#### 実験を始める前の準備事項

- 使用前にBuffer P1にキットのRNase A液を加えてください。RNase Aの1バイアル分（使用前に軽く遠心する）をBuffer P1のボトルに添加すれば、最終濃度100 µg/mlとなります。
- エンドトキシンフリーの70%エタノールは、96~100%のエタノール40 mlをキットに入っているエンドトキシンフリー水に添加して調製します。
- 低温保存中にBuffer P2にSDSの沈澱が生じていないかどうかを確かめてください。SDSの沈澱が生じているようであれば、37℃に加温してSDSを溶かしてから使用してください。
- Buffer P3は、あらかじめ4℃に冷却してから使用してください。
- オプション：使用前にキットに入っているLyseBlue試薬をBuffer P1に添加し、混和します。LyseBlueの1バイアル分を使用前に軽く遠心し、Buffer P1のボトルに添加すれば、1000倍に希釈されます。LyseBlueによりバッファーが最適に混和されたことを目で確認でき、非効率的な細胞溶解やSDS、ゲノムDNA、細胞破片の不完全な沈澱を引き起こす一般的な操作ミスを防ぐことができます。詳細は英語版 Handbook 15ページの“Using LyseBlue reagent”をご覧ください。

覧ください。

#### 操作手順

1. 新しく作製した選択プレートから単一コロニーを採取し、適切な抗生物質を含んだLB培養液5～10 mlに接種する。37℃で約8時間、激しく振盪培養する(約300 rpm)。

培養液量の少なくとも4倍以上の容量を有するチューブあるいはフラスコを使用してください。

2. スターター培養液を選択LB培養液で500～1000倍に希釈する。高コピープラスミドでは、500～1000  $\mu$ l (Mega) / 2.5～5 ml (Giga) のスターター培養液を選択LB培養液500 ml (Mega) / 2.5 l (Giga) 添加する。低コピープラスミドではスターター培養液2.5～5 ml (Mega) に選択LB培養液2.5 l (Mega) 添加する。37℃で12～16時間、激しく振盪培養し(～300 rpm) バクテリア細胞を培養する。

培養液量の少なくとも4倍以上の容量を有するフラスコや容器を使用してください。この培養条件下では培養細胞密度は約3～4 x 10<sup>9</sup>個/mlに達し、湿重量にして通常、約3 g/lのペレットに相当します。

3. 4℃で6,000 x g、15分間遠心操作し、バクテリア細胞を収集する。  
⊗ ここで操作を中断する場合は、収集したバクテリアペレットは-20℃に保存してください。
4. QIAfilter Mega-Giga Cartridgeをガラス瓶(ボトルネック; 45 mm)にセットし、吸引装置に繋ぐ。

QIAfilter Cartridgeのプラスチックが破損するので、QIAfilter Cartridgeをボトルネックに強く締めすぎないでください。

5. バクテリアペレットを50 ml (Mega) / 125 ml (Giga) のBuffer P1で再懸濁する。  
バクテリアを効率よく溶解させるためには、溶解バッファーを完全に混和させるのに十分な容量を有する容器を使用することが大切です。Mega調製では500 mlの容器、Giga調製では1000 mlの容器を推奨します。Buffer P1にRNase Aを加えてあるかどうかを確認してください。

LyseBlueをBuffer P1に添加している場合は、使用前に瓶を強く振って、LyseBlue粒子を完全に再懸濁します。細胞塊が無くなるまでボルテックスやピペッティングによりバクテリアを完全に再懸濁します。

6. 50 ml (Mega) / 125 ml (Giga) のBuffer P2を添加後、4～6回激しく転倒させ十分に混和し、5分間室温(15～25℃)に放置する。

ボルテックスするとゲノムDNAが切断されるのでボルテックスしないでください。ライセートは粘稠になります。溶菌反応は5分間以上行なわないでください。Buffer P2が空気中のCO<sub>2</sub>を吸収して酸性になるのを防止するため、Buffer P2ボトルの使用後は、直ちにしっかりと蓋を閉じて保存してください。

LyseBlueをBuffer P1に添加している場合は、Buffer P2添加後に細胞懸濁液は青色になります。混和により溶液は均一な青色になります。溶液に無色の部分があったり、茶系色の細胞塊が観察される場合は、溶液が均一な青色になるまで混和してください。

7. 冷却した 50 ml ( Mega ) / 125 ml ( Giga ) の Buffer P3 を添加後、直ちに 4 ~ 6 回激しく転倒混和する。白色綿毛状の物質が形成され、ライセートの粘稠がなくなるまでよく混和する。すぐにステップ 8へ進む。氷上でインキュベートしない。

冷却した Buffer P3 を使用して氷上でインキュベートすると沈澱が促進されます。Buffer P3 を添加すると白色綿毛状の物質が形成され、ライセートの粘稠が少なくなります。沈澱物にはゲノム DNA、タンパク質、細胞の破片、およびドデシル硫酸カリウムなどが含まれています。混和液の粘性を抑え QIAfilter Cartridge の目詰まりを防ぐために、ライセートを十分に混和します。

LyseBlue 試薬を使用している場合は、青色が消え懸濁液が無色になるまで十分に混和します。均一で無色な溶液は SDS が効率的に沈澱したことを示します。

8. QIAfilter Mega-Giga Cartridge の中にライセートを注ぎ、室温で 10 分間インキュベートする。

重要：室温で 10 分間放置する事は、QIAfilter Mega-Giga Cartridge の性能を十分に発揮させるために重要です。放置中に Cartridge を攪拌しないでください。タンパク質、ゲノム DNA、界面活性剤等の沈殿物は液体の表面に浮遊層を作るので、目詰まりなく、ろ過が簡便に行なえます。

9. 吸引装置のスイッチを入れる。すべての溶液が通過した後スイッチを切る。QIAfilter Cartridge は取り付けたままにしておく。

- 10 50 ml ( Mega ) および Giga ) の Buffer FWB2 を QIAfilter Cartridge に添加する。滅菌したスパーテルで沈殿物を静かに攪拌する。溶液が完全に通過するまでスイッチを入れておく。

沈殿物を静かに攪拌することにより、フィルターユニットを通過する液体の流速を速くすることができます。細胞破片やドデシル硫酸カリウムのキャリーオーバーを起こし QIAGEN カラムの流速や結合に影響する可能性があるため、沈殿物を飛散させないように気をつけます。瓶の中のろ過済みライセートにはプラスミド DNA が含まれています。

⇒ 120 µl ( Mega ) / 75 µl ( Giga ) の清澄化ライセートを採取し、分析用ゲル電気泳動用に ( サンプル 1 ) 保存し、培養、溶菌などの条件が最適であったかどうかを確認してください。

11. 12.5 ml ( Mega ) / 30 ml ( Giga ) の Buffer ER をろ過したライセートに添加、約 10 回転倒混和し、その後 30 分間氷上でインキュベートする。

Buffer ER をろ液に加えると濁りが生じるが、氷上でインキュベーション中に澄んできます。

12. QIAGEN-tip 2500( Mega )/QIAGEN-tip 10000( Giga )に 35 ml( Mega )/75 ml ( Giga )の Buffer QBTを加え、カラムが空になるまで自然落下させ平衡化する。

平衡化バッファーに含まれている界面活性剤によって表面張力が減少すると、バッファーは自然に流出し始めます。QIAGEN-tipに添加したバッファーを完全に流出させます。バッファーの液面がカラム中の上のフリットに達するとバッファーの流出は停止するので、QIAGEN-tipを見張っている必要はありません。

13. ステップ 11 からのろ過ライセートを QIAGEN-tip に添加し、自然落下によりカラムへ浸透させる。

Buffer ERによりライセートの濁りが再び生じることがあります。しかしプラスミド調製に悪影響は及ぼしません。

⇒ 120 µl ( Mega ) /75 µl ( Giga ) のフロースルーサンプルを分析用 ( サンプル 2 ) サンプルとして採取保存しておき、後で QIAGEN Resin との DNA 結合率を決定します。

14. QIAGEN-tip を 200 ml ( Mega ) /600 ml ( Giga ) の Buffer QC で洗浄する。

QIAGEN-tip に Buffer QC を添加してバッファーを自然落下により通過させます。1 回目の洗浄でプラスミド DNA サンプル中に混入している大部分の夾雑物を除去することができます。大量培養の場合、あるいは多量の炭水化物を産生する菌株を用いた場合には、2 回目の洗浄が特に必要です。

⇒ 1 回目、2 回目の洗浄フラクションの混和液から 160 µl ( Mega ) /120 µl ( Giga ) を採取、保存し、分析用サンプル ( サンプル 3 ) とします。

重要：これより後の操作では、エンドトキシンフリーのプラスチック器具 ( 例えば新しいポリプロピレン製の遠心チューブなど )、または前処理済みのガラス器具を利用してください。

15. Buffer QN 35 ml ( Mega ) /100 ml ( Giga ) で DNA を溶出する。

ポリカーボネイト製の遠心チューブは、次のステップで使用するアルコールに耐性がないため、お勧めしません。

⇒ 22 µl ( Mega ) /20 µl ( Giga ) の溶出液を分析用サンプル ( サンプル 4 ) として採取保存しておきます。

注：45 ~ 50 kb 以上のコンストラクトでは、溶出バッファーを 65 °C に温めて使用すると収量が増加することがあります。

⊗ ここで操作を中断する場合は、溶出液は 4 °C で保存してください。一晩以上保存しておくことは避けてください。

16. 溶出液に 24.5 ml (Mega) /70 ml (Giga) (0.7倍容量) のイソプロパノール (室温) を添加してDNAを沈澱させる。混和後、直ちに、4、15,000 x g 以上で30分間遠心する。遠心上清を注意深くデカントする。

全ての溶液は、塩の沈澱が生ずるのを防止するために室温で保存しますが、遠心はオーバーヒーティングを防ぐ目的で4で行ないます。あるいは、ディスプレイのコンニカル遠心チューブを用いて4、5,000 x gで60分遠心することもできます。イソプロパノールの添加によって得られるペレットは透明で、エタノール沈澱によって得られる塩を含む綿状のペレットに比べて検出が困難です。遠心操作をする前に、遠心チューブの外壁に印をつけておき、ペレットがチューブのどの位置にあるかを判別しやすくなります。イソプロパノールペレットは、遠心チューブの内壁からはがれやすくなっているため、遠心上清を捨てる際には十分に注意してください。

17. DNAペレットをエンドフリーで室温の70%エタノール(キットに添付されているエンドトキシンプリー水に96~100%エタノール40mlを加えて調製)7ml (Mega) /10 ml (Giga) で洗浄し、15,000 x g以上で10分間遠心する。ペレットが移動しないように遠心上清を注意深くデカントする。

あるいは、ディスプレイのコンニカル遠心チューブを用いて4、5,000 x gで60分遠心することもできます。70%エタノール洗浄によって沈澱している塩を除去し、イソプロパノールを揮発しやすいエタノールに置き換えると、DNAが溶解しやすくなります。

18. DNAペレットを10~20分間、空気乾燥して、適切な量のエンドトキシンプリー Buffer TE に溶かす。

ガラス製の遠心チューブを使用した場合には特に、遠心チューブの内壁からDNAペレットをよく洗い落として再溶解します。DNA切断の原因となるので、ピペティングによる再懸濁は操作を避けてください。DNAペレットを乾燥させすぎると、再溶解しにくくなります。DNAは弱アルカリ性の条件下でよく溶けますが、酸性バッファーには溶けにくい性質をもっています。

## 収量の測定

DNAの収量を決める際には、UV分光光度計による260nmでの測定とアガロースゲル電気泳動による定量分析を併用してDNAの濃度を決めます。分光光度計で正確なDNA定量を行なうためには、 $A_{260}$ 測定値が0.1~1.0の間であるべきです。

## アガロースゲル解析

精製操作の際にサンプルの一部を採取・保存することをお勧めします(サンプル1~4)。プラスミドDNAの収量や品質が低い場合は、アガロースゲル電気泳動でサンプルを解析し、精製操作のどのステージで問題が生じたかが判断できます(英語版 Handbook 36ページ参照)。

# トラブルシューティングガイド

## コメント

---

### DNA収量が少ないか皆無

ライセート(サンプル1)中にDNAが存在しない

- a) プラスミドが増殖しなかった
- 弊社ウェブサイト [www.qiagen.com/goto/plasmidinfo](http://www.qiagen.com/goto/plasmidinfo) の “ Growth of Bacterial Cultures ” を参照にして、最適な培養条件であることを確認する。
- b) アルカリ溶解が不十分
- プロトコルで指示されているよりも細胞の増殖が高密度、あるいは培養液量が多すぎた場合には、バクテリアと溶解液の適正量比が変わる。プラスミドDNAを効率よく解離させるためのBuffer P1、P2とP3の量が不十分なために、このような条件下では溶解が不完全になる。培養液量を減らすか、またはBuffer P1、P2とP3の液量を増す。
- 溶解試薬が十分に混和していないと収量が低下することもある。Buffers P1、P2、P3を添加後完全に混和して均一な溶液にする。LyseBlueを用いて混和が効率良く行なわれているか色で確認する。
- c) 低コピーのプラスミドを調製する際の溶解が不完全
- 低コピーのプラスミドを調製する際には、2倍容量の溶解Buffer P1、P2とP3を添加すれば、プラスミドの収量、純度を上げることができる(英語版 Handbook 11ページ、または[www.qiagen.com/goto/plasmidinfo](http://www.qiagen.com/goto/plasmidinfo)を参照)。
- d) ライセート調製が不正確
- Buffer P2の低温保存によってSDSの沈澱ができる場合には、温めてSDSを溶かす。Buffer P2の入っているボトルの使用後は、直ちに蓋をしっかりと閉めておく。溶解バッファーは英語版 Handbook 43ページに掲載されている指示に従って調製する。必要に応じて、新しいBuffer P1、P2、P3を調製する。

## コメント

### フロースルー分画（サンプル2）中にDNAが存在する

- a) カラムへのオーバーロード  
それぞれのプロトコールのはじめに記載されている QIAGEN-tip の容量に対しての培養液量と収量の関係をチェックする。プロトコールの指示に従って培養液量を減らすか、または、高収量が必要なときには、さらに大きい容量の QIAGEN-tip を選択する。大量培養を必要とするコピー数が非常に少ないプラスミドあるいはコスミドを調製する場合には、ウェブサイトの [www.qiagen.com/goto/plasmidinfo](http://www.qiagen.com/goto/plasmidinfo) を参照。
- b) SDS（またはその他のイオン性界面活性剤）がライセートに混在  
Buffer P3 を使用前に冷却しておく。遠心後のライセートが透明であれば、遠心操作後すぐに QIAGEN-tip に添加する。ライセートが粘稠で、Buffer P3 と混和しにくいようであれば、培養液量を減らすか、Buffer P1、P2 と P3 の液量を増やす。  
LyseBlue を用いて混和が効率良く行なわれているか色で確認する。
- c) バッファー中に不適切な塩類が含まれているか、pH が不適切  
研究室で準備されたバッファーが英語版 Handbook 43 ページに記載されている指示に従って作製されているか確かめる。
- d) カラムの流速が一定でない  
QIAGEN-tip は室温（15 ~ 25 ）で保存する。冷蔵保存、あるいは長期間、湿度の高い場所で保存するとレジンが塊りになっていることがある。使用前にカラムを振って使用すれば、この問題は解消される。

### Buffer QC による洗浄画分（サンプル3）中に DNA

- a) カラムへのオーバーロード  
それぞれのプロトコールのはじめに記載されている QIAGEN-tip の容量に対しての培養液量と収量の関係をチェックする。プロトコールの指示に従って培養液量を減らすか、高収量が必要なときには、さらに大きい容量の QIAGEN-tip を選択する。コピー数が非常に少ないプラスミド、あるいはコスミドで大量培養を必要とする調製する場合には弊社ウェブサイトの [www.qiagen.com/goto/plasmidinfo](http://www.qiagen.com/goto/plasmidinfo) を参照。
- b) Buffer QC が適正でなかった  
Buffer QC に含まれる塩類濃度、pH は適正かどうかをチェックする。沈澱させて DNA を回収し、新しい QIAGEN-tip カラムを用いて精製する（ウェブサイトの [www.qiagen.com/goto/plasmidinfo](http://www.qiagen.com/goto/plasmidinfo) の “Purification of plasmid DNA prepared by other methods” 参照）。

## コメント

### 溶出液（サンプル4）中にDNAが存在しない

- a) ライセート中にDNAが存在しない 14 ページの“ライセート（サンプル1）中にDNAが存在しない”を参照
- b) 溶出用Buffer QNが適正でない Buffer QN中の塩類濃度、pHをチェックする。新しいバッファーでDNAを溶出・回収する。
- c) DNAがカラムを通過しフロースルーまたは洗浄画分に含まれていた 前の2項目を参照

### 沈澱後のDNA収量が低いあるいは全く存在しない

- a) DNAが沈澱しなかった 沈澱を15,000 x g以上で30分間遠心したかどうかを確かめる。より高速で長時間遠心分離してDNAを回収する。別のバッチのイソプロパノールを試す。
- b) DNAペレットを紛失 イソプロパノールの添加によって得られるペレットは透明で見分けにくい。遠心操作をする前に遠心チューブの外壁に印をつける。イソプロパノールペレットは、遠心チューブの内壁から剥がれやすくなっているため、遠心上清を静かに捨てる。
- c) DNAの再溶解が不十分 DNAが完全に再溶解したかを確認する。特にガラス製のチューブと固定ローターを使用した場合には、DNAがすべて管壁から溶解されたかを確認する。全DNAの半分は管壁にスメア状に付着していることもある。一方、スウィング型のローターを使用すれば、チューブの底にペレットを局在化できる。

### プラスミドDNAが溶けにくい

- a) ペレットが乾燥しすぎ 高分子量のDNAである場合は特に吸引装置を使用せずに空気乾燥とする。DNAを再溶解させる場合には、溶液を軽く温めて、時間をかけて溶かす。
- b) ペレット中にイソプロパノールが残存 イソプロパノールを除去するために、必ずペレットを70%エタノールで洗う。DNAを再溶解させるために軽く温め、時間をかけて溶かす。必要に応じて、再溶解のバッファーの量を増やす。
- c) ペレット中の塩含有量が高すぎる DNAを沈澱させるときに、イソプロパノールを室温で使用したか、またペレットを室温の70%エタノールで2回洗浄したかを確認する。溶解用のバッファーの量を増やしDNAを回収する。



## コメント

- d) バッファーのpHが低すぎた DNAは酸性バッファーには溶けにくい性質をもっているため、再溶解に使ったバッファーのpHが8.0以上であったかを確認する。
- e) 再溶解液の量が少なすぎた ペレットを覆っている溶液が極端に粘稠な場合は、再溶解液の量を増やす。

### 夾雑物を含むDNA / 品質の低いDNA

- a) 溶出液中にゲノムDNAが混入 バクテリアのライセートを激しく混和しすぎた。染色体DNAの切断を防ぐためには、Buffer P2とP3を加えた後のライセートを静かに取り扱うようにする。ライセートの粘稠性が高い場合には、培養液量を減らす。
- b) 溶出液中のRNA RNase Aによる分解が不十分。培養液量が適正であるかどうかをチェックし、必要に応じて培養液量を減らす。キットに入っているRNase Aを使用したことを確認する。Buffer P1が6ヶ月以上経過している場合はRNase Aを追加する。溶出液を沈澱し、RNase A分解を行ない、新しいQIAGEN-tipを用いた精製を行なってDNAを回収する( [www.qiagen.com/goto/plasmidinfo](http://www.qiagen.com/goto/plasmidinfo) のPurification of plasmid DNA prepared by other methods” 参照 )。
- c) ヌクレアーゼの混入 バッファーにヌクレアーゼが混入していないかを確認し、必要に応じて新しいものと交換する。新しいガラス、プラスチック容器に交換し、手袋も着用する。
- d) 溶解時間が長すぎた 溶解ステップ ( Buffer P2 ) で溶解時間が5分を超えていないかを確認する。
- e) アルカリ溶解を過剰に添加 QIAGEN-tipの容量に対する培養液量と収量をチェックする。培養液量を減らすか、あるいはBuffer P1、P2とP3の量を増やす。
- f) プラスミドDNAのニック / 切断 / 分解 DNAの溶解バッファーが適当でない。ヌクレアーゼ活性を阻害し保存中のpHを安定に保つためには、pH 8.0のTEにDNAを再溶解する。
- g) 宿主菌がエンドヌクレアーゼを持っている [www.qiagen.com/goto/plasmidinfo](http://www.qiagen.com/goto/plasmidinfo) のバックグラウンド情報を参照し、*E. coli* 宿主菌株を変える。

## コメント

- 
- h) 再溶解の際の切断      ボルテックスや激しいピペティングを行わずに DNA を穏和に再溶解する。容量の小さなピペットチップを使用しない。
- i) 再溶解した DNA に粒子が混入      DNA 溶液を遠心して上清を新しいチューブに入れる。粒子は DNA 品質に影響しない。あるいは溶出液をろ過する QIAprecipitator の入った HiSpeed キットを使用する。

精製 DNA を用いてよい結果が得られない

- a) ペレット中に過剰の塩が混入      沈澱のためのイソプロパノールを室温で使用したか、またペレットを室温の 70 % エタノールで 2 回洗浄したかを確認する。塩を除去するために DNA を再沈澱する。
- b) タンパク質が残存      培養液量が適正であるかどうかをチェックし、必要に応じて培養液量を減らす。20,000 x g 以上、45 分間の遠心、あるいは QIAfilter Cartridge によって得られたバクテリアライセートが、透明な溶液になっているかを確認する。

ゲル電気泳動分析における余分な DNA バンドがある

- a) プラスミドの二量体      プラスミド DNA の複製の際は、プラスミドスーパーコイル DNA の二量体と多量体が形成される。通常、精製したプラスミド DNA の電気泳動のゲルをエチジウムブロマイド染色すると、スーパーコイル DNA の単量体と二量体がみられる（英語版 Handbook 37 ページ、Figure 3 参照）。これらの比率はしばしば宿主菌に依存している。
- b) 変性スーパーコイルプラスミドが形成      この変性スーパーコイル DNA は、ゲル内では閉環状 DNA より速く移動し、制限酵素には耐性である（英語版 Handbook 37 ページ、Figure 3 参照）。Buffer P2 を添加した後で 5 分以上インキュベートしてはいけない。Buffer P3 の添加後、直ちに混和する。
- c) 欠変異株の可能性      いくつかの塩基配列はプラスミド中で安定に維持されない。制限酵素分析によって欠損の有無をチェックする。特に、コスミドクローンの場合は、長期培養の大腸菌の中では不安定なので、新しく撒いたプレートの中で他のコロニーと重なっていないコロニーから調製しなくてはならない。

---

## QIAGEN-tipの目詰まり

ライセートが濁っていた

カラムに添加する前にライセートが透明であるかを確かめる。Buffer P3は使用前に冷えているかどうかを確かめる。遠心力と遠心時間をチェックする。QIAfilter Cartridgeによってライセートを透明にすることも可能である。目詰まりを起こしたQIAGEN-tipを通過可能にするには、穴のあいたゴム栓に合う注射器などで加圧する。

## QIAfilter Cartridge

コメントおよび対処法

---

QIAfilter Cartridgeがろ過中に目詰まりを起こす

- a) 過剰な培養液量を使用      プロトコール中で指示されている量以上の培養液を使用しない。
- b) Buffer P3を添加後の混和が不十分      綿毛状の白色物質が生成し、ライセートの粘性がなくなるまでよく混和する。
- c) Buffer P3添加後の混和が激し過ぎる      Buffer P3を添加後、ライセートをすぐに、しかし穏和に混和する。ボルテックスで混和しない。激しく混和すると、綿毛状の沈澱が崩壊して微細な粒子を形成し、QIAfilter Cartridgeが目詰まりを起こす。
- d) Buffer P3を添加後すぐにQIAfilter Cartridgeにロードしなかった      Buffer P3を添加後、すぐにライセートをQIAfilter Cartridgeにロードする。しばらく放置した後に添加すると沈澱が崩壊して微細な粒子を形成し、QIAfilter Cartridgeが目詰まりを起こす。
- e) インキュベーション中にQIAfilter Cartridgeを攪拌      ライセートにBuffer P3を添加した後、すぐにQIAfilter Cartridgeに注ぎ、10分間のインキュベーション中にはかき混ぜない。かき混ぜると浮遊層が形成されずに、沈澱は微細な粒子に崩壊する。
- f) Buffer P3添加後のインキュベーションを室温でなく氷上で行なった      QIAfilter Cartridgeの中でのインキュベーションを室温で行なったかどうかを確かめる。沈澱の浮遊物は氷上よりも室温でよく形成される。
- g) Buffer P3添加後のインキュベーションの時間が短い      プロトコールの指示に従ってBuffer P3とインキュベーターする。10分間のインキュベーション後に液面に浮遊層が形成されない場合、注意深く滅菌ピペットチップ、または滅菌スパーテルなどでCartridgeの内壁に付着した沈澱を剥がした後、ろ過を続ける。

## コメント

---

- h) 吸引が弱いあるいはほとんどない (QIAfilter-Mega-Giga Cartridge のみ) 吸引力が-200 から -600 milibar (-150 から -450 mm HG) の吸引が可能な装置を使用する。

### Buffer FWB2の添加後QIAfilter Cartridgeが詰まる

(QIAfilter Mega-Giga Cartridgeのみ)

Buffer FWB2の添加後、沈澱を撈拌していない Buffer FWB2をQIAfilter Mega/Giga Cartridgeに添加後、滅菌スパーテルで沈殿物を静かに撈拌する。

ろ過後のライセートが透明でない

(QIAfilter MidiおよびMaxi Cartridgeのみ)

QIAfilter Cartridgeに負荷したライセートに生じた沈澱を無理に通過させた ライセートのすべてが、QIAfilter MidiあるいはMaxi Cartridgeを通過し終わるまでろ過し、過剰な加圧をしない。通常約 10 ml (QIAfilter Midi) あるいは 25 ml (QIAfilter Maxi) のライセートが回収される。

## EndoFree Plasmid Kit

### コメントおよび対処法

---

予想よりエンドトキシン含有量が高い

- a) Buffer ERとのインキュベーションの時間が短かすぎる 効率よくエンドトキシンを除去するために、ライセートを氷上で30分間、インキュベートしたかを確認する。

Buffer ERを加えた直後は濁っているが、氷上でインキュベートしている間に再び透明になる。ライセートが透明になるのでインキュベーションが十分な時間であったかどうかの目安になる。

- b) 調製後にDNAが再び混入 エンドトキシンフリーあるいはパイロジェンフリーのプラスチックあるいはガラス容器を使用する。以前に一度でもバクテリアの滅菌に使用したことがあるオートクレーブを使用してプラスチック、あるいはガラス容器を滅菌することは厳禁。70%エタノール溶液を準備する場合には、エンドトキシンフリーの水を使用する。DNAを再溶解する際には、エンドトキシンフリーBuffer TEを使用する。

ライセートがQIAGEN-tipと結合する際に濁る

これは氷上でのインキュベーションから室温で行なう結合ステップに移行したときの温度変化によるもので、EndoFree Kitの性能には何ら悪影響がない。







---

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