

ユーザーインストラクション: 精製プラスミドDNA

ベクター情報を取り出す Retrieve Vector Information

ベクターには固有のベクターIDが付与されます。ベクターIDは納品チューブラベル、または見積書から見つけることができます。VectorBuilderのホームページの“ベクター情報を取り出す”にベクターIDを入力すると、固有ベクターのマップ、シークエンス、コンポーネントのアノテーション、シークエンスファイルのダウンロード等、便利な機能が使用できます。 (www.vectorbuilder.jp)

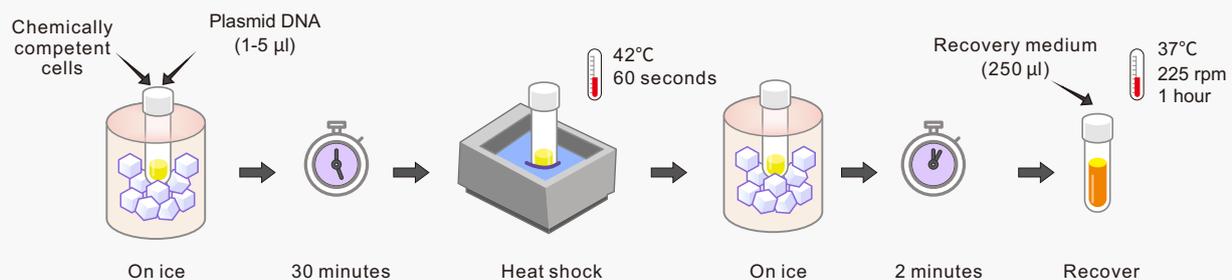
保存と取り扱い方

- ベクタービルダーのプラスミドDNAは 1x TE バッファーに保存されています。
- お受け取り後、チューブを遠心にかけてください (>10,000 x g、10~30秒)。
- プラスミドDNAは、2週間以下の短期間は4°Cでの保存が可能です。長期保存は-20°Cまたは-80°Cで保存してください。

大腸菌へのプラスミドの形質転換 (トランスフォーメーション)

- コンピテントセルのチューブを氷上で溶かします。弊社の VB UltraStable™ コンピテントセルの使用をお勧めします。
- 1-5 μ l のプラスミド溶液をコンピテントセルへ添加します。チューブをタッピングし、穏やかに混合します。(ピペッティングでは混ぜ合わせないようにしてください。)
- 氷上で30分間インキュベーションします。
- 42°Cのウォーターバスで、60秒間ヒートショックをかけます。チューブは振とうさせないで下さい。
- ヒートショックが終わったら、すぐに氷上に移し、氷上で2分間インキュベーションします。
- 250 μ l の回復用培地を添加し、しっかりとキャップをし、37°C、225 rpmにて1時間振とう培養します。
6. で培養した大腸菌を、プラスミドに耐性遺伝子が入っている抗生物質を直前に添加した5mlのLB培地に入れ、37°C、225 rpmにて振とう培養します。大腸菌のグリセロールストックを作製する場合は、6~8時間培養し、培養液と滅菌された50%グリセロール溶液を一对一の割合で混ぜ合わせます (グリセロール終濃度25%)。大腸菌のグリセロールストックは -80°Cで長期間保存が可能です。

注意: バクテリアの自然突然変異の可能性があるため、寒天培地に細胞をプレーティングし、単一コロニーを採取することはお勧めしていません。単一コロニーを拾う必要がある場合は、複数のコロニーを採取し、制限酵素による消化やシークエンスで検証した上で使用することを強くお勧めします。



Transformation procedure

プラスミドの増幅 Plasmid Amplification

1. プラスミドDNAを含む大腸菌をプラスミドに耐性遺伝子が入っている抗生物質を直前に添加した5mlのLB培地に入れ、37°C、225 rpmにて一晩振とう培養します。通常、一晩培養した5ml培養でミニプレップに十分な量があります。

注意: バクテリアの自然突然変異の可能性があるため、寒天培地に細胞をプレーティングし、単一コロニーを採取することはお勧めしておりません。単一コロニーを拾う必要がある場合は、複数のコロニーを採取し、制限酵素による消化やシーケンスで検証した上で使用することを強くお勧めします。

2. より多くのプラスミドが必要な場合は、一晩培養した培養液から1:200~1:400 希釈となるように200 ml LB培地（直前に抗生物質を添加したもの）に移します。37°C、225 rpmにて14~18時間振とう培養します。

注意: 目的のプラスミドにrelaxed型 ori が含まれ（例：pUC）、大腸菌がクロラムフェニコール耐性でない場合は、OD₆₀₀が1.2~1.5到達時に、LB培地にクロラムフェニコール(30 ug/ml) を添加することをお勧めします。クロラムフェニコールはタンパク質合成を阻害しますが、relaxed型 oriを含むプラスミドの複製にはほとんど影響がなく、1細胞（大腸菌）当たりのプラスミドDNA量を増やすことが可能です。

3. プラスミドDNAを普段ご使用のプラスミド精製キットを用いて回収します。プラスミドの回収率を上げるために、溶出バッファー（elution buffer）を予め60-65°Cに温めておくことと溶出手順の繰り返しをお勧めします。

抗生物質の濃度

抗生物質は以下の推奨濃度でご使用下さい。

Ampicillin: 100 μ g/ml
Kanamycin: 50 μ g/ml
Chloramphenicol: 34 μ g/ml
Tetracycline: 5 μ g/ml
Streptomycin: 50 μ g/ml
Gentamycin: 10 μ g/ml

トラブルシューティング：プラスミドDNAの回収率が低い

可能性のある要因	推奨される回収方法または解決方法
接種量が少なすぎた	グリセロールストックからの接種量を増やすとプラスミドの回収量が増えることが多いです。
プラスミドのコピー数は様々である	プラスミド上の複製起点は、コピー数の異なるタイプを内在している可能性があります。VectorBuilderで製造しているプラスミドベクターの中には、中・低コピータイプのもがあり、高コピープラスミドに比べ大腸菌内での複製頻度が低くなっているものがあります。低コピープラスミドの回収率を上げるには、大腸菌の培養量を増やしてください。
抗生物質の問題	大腸菌の培養において抗生物質を正しく使用することは、高いプラスミド収率を得るために不可欠です。まず、プラスミドDNAチューブのラベルをよく読み、プラスミド上の抗生物質耐性遺伝子に対応する抗生物質を使用していることを確認して下さい。抗生物質を誤って使用すると、細菌の繁殖を阻害する可能性があります。次に、アンピシリンのような一部の抗生物質は、液体培養では早く分解されます。その結果、プラスミドを含まない細菌が培養液中で繁殖し、かなりの割合を占めるとプラスミド回収量が低下する可能性があります。これを避けるため、アンピシリン含有増殖培地は使用直前に調製した新鮮なものを利用し、十分なアンピシリンが供給されていることを確認してください。また、アンピシリン耐性菌を培養する場合は、液体培養を長く飽和させないようにして下さい。
EndA ⁺ 株	EndA ⁺ 株はEndAエンドヌクレアーゼを発現する能力を保持しており、精製したプラスミドDNAを分解する原因となることがあります。エンドヌクレアーゼを除去するためには、プラスミドDNA精製の際に精製カラムの洗浄工程を増やしてください。または、EndA ⁻ 株の使用をお勧めします。
微生物汚染 (コンタミネーション)	大腸菌を抗生物質無添加の環境で培養する必要がある場合は、微生物汚染が起こらないように十分注意してください。プラスミドの複製は細胞分裂に必要なエネルギーを消費するため、形質転換していない微生物の方が増殖が速く、培養に優位になる傾向があります。もし、コンタミネーションが起きてしまった場合は、ベンチやオービタルシェーカーを75%エタノールで洗浄してください。また、培養フラスコやピペットチップは十分に滅菌してください。また、特定の抗生物質を用いて、寒天培地上で正しい菌株のコロニーをスクリーニングする必要があります。
ファージ汚染 (コンタミネーション)	ファージが混入すると、バクテリアの培養で細胞溶解が起こる可能性があります。万が一、ファージが混入した場合は、直ちに培養液を捨ててください。細菌培養の準備に使用した溶液は全て捨ててください。ベンチの表面やオービタルシェーカーを0.05%水酸化ナトリウム溶液で丁寧に洗浄してください。また、菌の増殖に使用した培養フラスコもすべて水酸化ナトリウム溶液に浸して洗浄した後、オートクレーブで滅菌することが必要です。また、大腸菌はT1ファージに耐性を示すため、VB UltraStable™ ケミカルコンピテントセルのようなfhuA変異を持つ菌株がクローニングにはお勧めです。
プラスミド精製に用いた培養液量が不適切であった	ご使用のプラスミド精製カラムの結合容量と、ご使用のプラスミドが高コピーか低コピーかをご確認ください。ミニプレップの場合、1-5mlのオーバーナイト菌体培養液の使用をお勧めします。マキシプレップでは、高コピープラスミドの場合は100-150ml、低コピープラスミドの場合は300-500 mlのオーバーナイト培養液の使用をお勧めします。通常、高コピープラスミドの場合、ミニプレップでは1mlの培養ごとに~5ugのプラスミドDNAが回収でき、150mlの培養で~500ugのプラスミドDNAが得られます。低コピープラスミド（例：pET）の場合はミニプレップで1 ml当たり1.5-2.5 ug、150mlの培養で150-200ugのプラスミドDNAが得られます。
プラスミド精製キットのマニュアル通りに操作ができていない	プラスミド精製キットを使用する場合は、使用前にマニュアルをよくお読みください。不適切な操作により、キットの性能が低下することがよくあります。
低品質のプラスミド精製キットを使用した	プラスミドDNA調製用カラムのメーカーによっては、DNA調製の性能が低かったり、品質が一貫していなかったりするものがあります。