

Thermo Scientific Sorvall Legend XFR と Fiberlite ロータを使用した高効率プラスミド DNA 抽出法

Nadia Boujtita, PhD, Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France

キーワード

- ・プラスミド DNA抽出
- ・細菌ペレット
- ・ユニバーサル遠心機
- ・Fiberlite F21-48x2

概論

細菌からのプラスミド DNA のミニプレップ法は、バクテリアから少量のプラスミド DNA を迅速に抽出する方法として多くの研究室で行われている^{1, 2}。細菌細胞の培養→細胞の回収→細胞の溶解→細菌ゲノム DNA と細胞残骸の除去、というステップを経てプラスミド DNA の回収が行われる。本アプリケーションノートでは、Thermo Scientific Sorvall Legend XFR とカーボンファイバーロータ F21-48x2 を用いて、大腸菌からの高効率ハイスルーブットプラスミド DNA 抽出法について紹介する。

材料と方法

Thermo Scientific Sorvall Legend XFR ユニバーサル遠心機とカーボンファイバーロータ(Fiberlite) F21-48x2 を使用することで少量サンプルのハイスルーブット処理を可能にします。最大 48 本の 1.5/2.0mL マイクロチューブを最高 24,500xg で遠心処理することができ、より短時間でのプラスミド DNA の抽出が可能です。

【試薬】

- >GTE バッファー (50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA + 4mg/mL リゾチーム)
- >Lysis バッファー (0.2N NaOH + 1% SDS)
- >中和バッファー [酢酸カリウム pH 4.8(60mL 5M 酢酸カリウム+11.5mL 氷酢酸+28.5mL 水)]
- >Tris-飽和フェノール/クロロホルム溶液
- >TE バッファー (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)

1. プラスミド DNA を保持する大腸菌株のシングルコロニーを適切な抗生物質を含む 2.5mL の LB 培地に植菌し、37°C で培養した。
2. OD₆₀₀ <2.5 に到達するまで大腸菌を培養し、培養液を 1.5mL マイクロチューブに分取した。Sorvall Legend XFR 遠心機で 24,500xg、20°C、4 分間遠心し大腸菌を回収した。
3. 大腸菌ペレットを 100μL の GTE バッファーに懸濁し、室温で 5 分間インキュベーションした。



図 1. Sorvall Legend X シリーズ(上)と
Fiberlite カーボンファイバーロータ(下)



4. 3.の懸濁液に Lysis バッファー200μL を加えたのち、インバートすることで細胞を溶解し(vortex による攪拌は厳禁)、氷上で 5 分間インキュベーションした(細胞懸濁液が透明になる)。* 細胞懸濁液が透明にならないときは細胞の溶解が不十分であるため、希釈した後再度 Lysis バッファーを添加する必要がある。
5. あらかじめ氷上で冷却した中和バッファー150μL を 4.の細胞溶解液に加え、vortex によって激しく 10 秒間攪拌した後、氷上で 5 分間インキュベーションした。
6. 4°C、24,500xg で 11 分間遠心し、上清を新しいチューブへ移した。
7. 等量の Tris 飽和フェノール/クロロホルム溶液を加え、vortex による攪拌後、4°C、5 分間、24,500xg で遠心し、変性したタンパク質や細胞の残骸を除いた。フェノール/クロロホルムを吸い取らないように、上清を新しいチューブへ移した。

8. 7.で得られた上清の2倍量の99.8%エタノールを加え、vortexでの攪拌の後、2分間室温でインキュベーションした。
9. 最高速度(24,500xg)で20分間遠心分離した。
10. 上清を取り除き、蓋を開けたチューブをペーパータオル等の上で反転させ、上清を完全に取除いた。
11. 70%エタノールで各チューブをリンスし、回収したペレットDNAを洗浄後、24,500xg、室温、20分間遠心した。
12. 上清を取り除き、蓋をあけたチューブをペーパータオル等の上で反転させ、ペレットを風乾した。
13. ペレットを50 μ LのDNase/RNase-フリーTEバッファーに再懸濁した。

制限酵素によるDNAの消化

抽出したDNA溶液10 μ Lを新しいマイクロチューブへ移し、適当な制限酵素用バッファー(10倍濃度)1.2 μ LをDNA溶液に加えた後、1Uの制限酵素を加えた。適当な温度にて1-2分間インキュベーションした。制限酵素処理を行ったDNA溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、およそのDNA濃度を測定した(図2)。

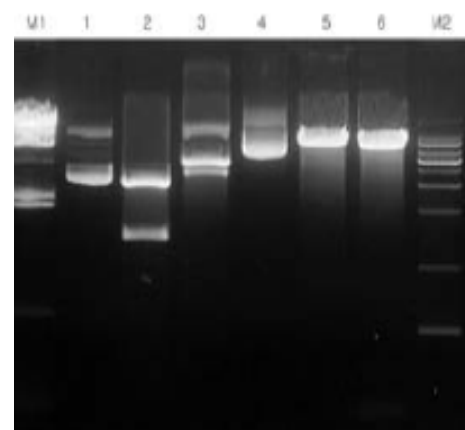


図2. レーンM1(左端)、M2(右端)は分子量マーカー、レーン1~6はサンプルプラスミド。電気泳動は1%アガロースを用い、エチジウムブロマイドで染色した。

結論

Thermo Scientific Sorvall Legend XFR および Fiberlite F21-48x2 ロータを用いて大腸菌からの高収率、高純度のDNAの抽出を行った。この方法で抽出されたDNAはそのまま制限酵素処理に使用可能であった。また、Fiberlite F21-48x2 ロータはカーボン製であるため、フェノール:クロロホルム等の有機溶媒や酢酸カリウム等に対する耐食性にも優れており、薬品等による劣化の心配なく使用することができる。

参考文献

1. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 488. Cold Spring Harbor Laboratory. USA: 86-96.
2. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Birnboim HC, Doly J Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24;7(6):1513-23