

プラスミド DNA 精製実験における精製試薬の検討

笹川 昇^{*1} 矢野 遥香^{*2}

Plasmid DNA Purification Using Specialized Reagents

by

Noboru SASAGAWA^{*1} and Haruka YANO^{*2}

(Received on Mar. 25, 2017 and accepted on Jul. 6, 2017)

Abstract

Knowing what kind of reagents are used in experiments is indispensable, especially when teaching and training students. In this study, the reagents of a plasmid DNA purification kit were evaluated. Many commercial kits are based on the principle that DNA binds to a silica matrix under chaotropic conditions. However, the components of the reagents in the kit are rarely listed by the manufacturer, which makes it difficult for students to understand what kind of materials are used and how the reagents work in an experiment. Therefore, we prepared all the reagents ourselves and added them to the kit without any information on the components. The reagents were used in an experiment for training candidate students of the International Biology Olympiad. Spectrophotometric assay, restriction endonuclease cutting and electrophoresis analysis revealed that the plasmid isolated by our prepared reagents was of a high quality.

Keywords: Plasmid, Silica, Guanidine, International Biology Olympiad

1. はじめに

プラスミド DNA 精製実験は、分子生物学・生化学の研究分野では欠くべからざる実験手法である。プラスミド DNA は種々の細菌や微生物に含まれているが、たいいていの場合、組換え大腸菌からプラスミド DNA を精製することが多い。

プラスミド DNA を精製する際、宿主のゲノム DNA の混入を抑え、プラスミド DNA のみを回収しなければならない。基本的に同じ化学物質であるゲノム DNA とプラスミド DNA を選択的に分けるために幾つかの方法が考案されているが、こと大腸菌からプラスミド DNA を精製する場合には、Birnboim と Doly の論文¹⁾に従った方法(アルカリ法)が主流となっている。この方法は DNA を塩基性の環境に置くことで起こる二本鎖の解離を巧みに利用したものである。

更に現在では、アルカリ法によってプラスミド DNA を粗精製した後、DNA がカオトロピックな環境下で二酸化ケイ素(ガラスパウダー、シリカメンブレン等)に結合する性質を利用して精製度を上げていく手法が確立されている。この手法は Boom らの論文²⁾に基づくものである。この方法(Boom 法)とアルカリ法を組み合わせる商品化した実験キットは複数社から販売されており、現在ではプラスミド DNA 精製といえばこのキット使用を指すことが非常に多い。

筆者は国際生物学オリンピック(International Biology Olympiad, IBO)代表候補者を対象にした冬季特別教育を担当している。IBO とは、大学入学前の高校生や中学生を対象に、生物の知識や生命科学実験の技能を競いあう国際的な科学オリンピック大会である。この特別教育において、実際には大学初等教育程度の内容の実験を行うのだが、代表候補になるような生徒を対象にしていることもあり、実験の原理や試薬の組成、各操作の意味等をひとつひとつ説明し、理解してもらいながら実験を行うようにしている。

ところが、生命科学研究に用いる、いわゆる「試薬キット」は、その試薬の組成を明示していないものが実には多い。これでは実験の原理や試薬の組成などを説明することなど不可能である。従って、今回の特別教育(BO 2017 代表候補者冬季特別教育:2016 年 12 月開催)では、可能な限り全ての試薬を自身で調製し、その試薬を用いて実験・実習に臨むこととした。具体的には、分子生物学・生化学実験で汎用されるプラスミド DNA 抽出実験を代表候補者に課し、その実験においてキット添付品と自作品の両方の試薬を用いることで、それぞれの比較検討を行った。

2. 材料と方法

2.1 分子生物学実験に用いる材料、試薬類

培地を含め、今回の実験に用いる各種溶液を調製するにあたり、試薬は全て汎用品を用いた。

本実験において、大腸菌は XL-1 Blue (STRATAGENE

*1 工学部生命化学科教授

*2 工学研究科応用理化学専攻修士課程

社)を用いた。プラスミド DNA には pGEX-5X-1 (Amersham 社)を用い、大腸菌の培養には LB 培地を用いた。

プラスミド DNA pGEX-5X1 を XL-1 Blue に形質転換したのち、抗生物質アンピシリンで選別し、生育してきたコロニーを更に一晚液体培養することで、プラスミド DNA 抽出用サンプルとした。

プラスミド DNA の切断に用いる制限酵素 *Eco* RI, *Pst* I は TaKaRa 社の製品を用いた。また、プラスミド DNA の濃度および純度の測定には NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific 社)を用いた。

2.2 プラスミド DNA 抽出キット

本実験には、A 社のキットを用いた。このキットは通常の生命科学研究で汎用されているものである。このキットは 1. で述べたようなアルカリ法と Boom 法に基づいたものである。この A 社のキットに添付されている試薬の組成は、一切開示されていない。キットに添付される RNA 分解酵素(Ribonuclease A, RNase A)の濃度さえ不明である。キット添付の RNase A はカタログ上で別売品を購入することが出来るが、そこでも濃度等の情報は全て伏せられている。

2.3 プラスミド DNA 抽出に関わる試薬類

Boom の原理を用いたプラスミド DNA 抽出キットは A 社だけのものではなく、他社製品のキットもまた存在する。Web 上で得られるこれら試薬組成³⁾を以下に示す。

Solution I : 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 μ g/mL RNaseA

Solution II : 1% SDS, 0.2M NaOH

Solution III : 4.2 M Guanidine-HCl, 0.9 M potassium acetate pH 4.8

A 社のキットに添付されているカラム調製バッファーは、このキットには存在していない。

洗浄バッファー : 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 80% Ethanol

溶出バッファー : 10mM Tris-HCl pH 8.5

今回はこれらの試薬組成を参考とし、全て自作した。なお、抽出に用いるカラムは、自作せずに A 社のものを用いた。

2.4 プラスミド DNA 抽出の手順

プラスミド DNA 抽出の手順に関しては、基本的に A 社キットの取扱説明書に倣った。具体的な手順は以下の通りである。なお、今回の操作において遠心機は全て 4°C に設定して作業したが、本実験において遠心の条件は室温でも大きな問題がないと考えられる。

まず、プラスミド DNA を保持する大腸菌を 100mL の LB 培地 (500mL 三角フラスコ) に植菌し、37°C で一晚培養した。その際、アンピシリンを終濃度 50 μ g/mL とするように加えた。次の日に、1.5mL チューブに 1mL の培養済み大腸菌を加え、遠心して集菌した後に上清を捨てた。そこへ更に 1mL の培養済み大腸菌を加え、再度遠心した。この操作によって、1.5mL チューブの中に培地 2mL 相当の大腸菌が回収されたことになる。なお、この

ような培養および集菌の方法は必須ではなく、プラスミド DNA を保持する大腸菌を 5mL の LB 培地に植菌、37°C で一晚振盪培養し、次の日にこの培地を遠心チューブに移して遠心機にかけ、菌体 (沈殿) を回収することでも全く問題なく実験を進めることが可能である。

この菌体に 200 μ L の Solution I を加え、完全に懸濁させた。そこに 200 μ L の Solution II を加え、転倒混和した。室温で 5 分放置したのち、更に 350 μ L の Solution III を加え、良く懸濁した。これを 12,000 \times g で 10 分間遠心し、上清を回収した。これを、プラスミド DNA 粗精製溶液とした。

次に、カラムの準備を行った。A 社キットに添付のカラムを 1.5mL チューブに挿入し、その状態のカラムに 500 μ L のカラム調製バッファーを加え、12,000 \times g で 30 秒から 1 分間遠心した。カラムを通過した液体は不要であるので廃棄した。

このカラムに、プラスミド DNA 粗精製溶液を注ぎ入れた。この状態で、12,000 \times g で 1 分間遠心し、プラスミド DNA をカラムに吸着させた。カラムを通過した液体は不要であるので廃棄した。

このカラムに対して洗浄作業を行った。プラスミド DNA を吸着させたカラムに 750 μ L の洗浄バッファーを加え、12,000 \times g で 1 分間遠心した。カラムを通過した液体は不要であるので廃棄し、更に洗浄バッファーを加えずに 12,000 \times g で 1 分間遠心して、カラムに残った溶液を完全に除去した。

ここまでの作業を行ったのち、最後にカラムを新しい 1.5mL チューブに移しかえ、100 μ L の溶出バッファーをカラムに添加したのち、12,000 \times g で 1 分間遠心した。この溶出液を、プラスミド DNA サンプルとして用いた。

2.5 制限酵素消化および電気泳動

抽出したプラスミド DNA を 15 μ L 分取し、これに反応バッファーや酵素、水を加えて全量で 17.5 μ L とするようにあわせ、DNA の制限酵素消化を行った。制限酵素消化では、*Eco* RI の単独消化および *Eco* RI と *Pst* I の同時消化の 2 通りの条件で行った。各々の反応で酵素は 0.25 μ L (3.75units)用い、37°C で 1 時間保温させることで反応を進行させた。これら消化後のサンプルをアガロース電気泳動に供した。アガロースの濃度は 1%とし、実験操作は常法に則って行われた⁴⁾。

3. 結果

3.1 カラム調製バッファー

A 社のキットは、カラム調製バッファーのみならず全ての試薬の組成が非公開である。一方で今回参考にした他社のキットには、A 社のカラム調製バッファーに相当する試薬が存在しない。従ってこのカラム調製バッファーにどのような組成の溶液を用いれば良いか皆目見当がつかない状態であったが、ここでは DNA がカラムに吸着する環境を整えるという意味があると考え、キットのカラム調製バッファーに相当するものとして、カオトロピック溶液である 6M グアニジン塩酸溶液を用いること

にした。後述するように、結果として 6M グアニジン塩酸溶液はカラム調製バッファーとして機能した。

3.2 プラスミド DNA の品質チェック

本実験では、対照として A 社のキット添付の試薬を用い、いわゆる全ての操作をキット添付の試薬で行う実験も行った。操作は前項に示した通りに A 社の説明に従い、自作の試薬を用いた場合と全く同じ手順である。

精製したプラスミド DNA の濃度と純度を、NanoDrop Lite によって測定した。またこの実験は 16 回繰り返して行い、そこから濃度・純度の平均値と標準偏差を算出した。その結果を Table 1, Table 2 に示す。Table 1 は、本実験においてすべて添付の試薬を用いて実験を行った場合の結果であり、Table 2 は同様の実験においてカラム以外のすべての試薬に対して自作品を用いた場合の結果である。波長 260nm の光を照射した時の吸光度 (OD260) が溶液中 DNA 濃度を表し、波長 280nm のときの吸光度 (OD280) との比を取ることで (OD260/OD280)、タンパク質が混入しているか否かを示す純度を表す。結果として、今回の実験においては、キット添付の試薬を用いて精製したプラスミド DNA よりも、自作の溶液で精製したプラスミド DNA のほうが、高い収量でプラスミド DNA を回収できたことが判明した。純度に関しては一般的に OD260/OD280 の値が 1.8 以上であると良いとされている。従って Table 1 と 2 を比較して分かるように、両者ともに純度に大きな差はなく、高純度のプラスミド DNA が回収されていることが明らかとなった。

Table 1 Absorbance, purity and concentration of plasmid DNA isolated by using commercial kit (n=16). av.: average, s.d.: standard deviation.

	OD260	OD280	OD260/280	ng/ μ L
av.	0.37	0.19	1.95	18.28
s.d.	0.11	0.05	0.14	5.70

Table 2 Absorbance, purity and concentration of plasmid DNA isolated by using specialized reagent (n=16). av.: average, s.d.: standard deviation.

	OD260	OD280	OD260/280	ng/ μ L
av.	1.05	0.55	1.92	52.75
s.d.	0.11	0.06	0.02	5.72

3.3 プラスミド DNA の制限酵素消化および電気泳動

精製したプラスミド DNA の品質チェックとして、プラスミド DNA の制限酵素消化および電気泳動も行った。その結果を Fig. 1 に示す。pGEX-5X1 は全長 4972bp (塩基対) の環状 DNA である。Eco RI と Pst I はそれぞれ pGEX-5X1 を 1 箇所ずつ切断し、さらに Eco RI と Pst I の二重で切断すると 3963bp と 1009bp の 2 本の DNA 断片

が出現する。

まず、泳動結果のバンドの濃さに差が見られ、これは各々の溶液の吸光度および DNA 濃度を反映していることが分かる。また、それぞれのサンプルに RNA の混入がないことも分かった。さらにここに示すように、自作溶液を用いて精製したプラスミド DNA に対して制限酵素は全く問題なく反応・切断した。これらのことより、精製したプラスミド DNA の品質には全く問題がないことが判明した。

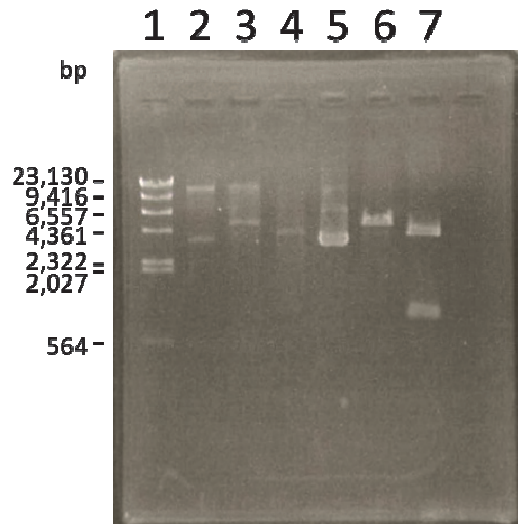


Fig. 1 Result of restriction endonuclease digestion and agarose gel electrophoresis (1%).

Lane 1: DNA Marker (λ /Hind III), Lane 2: uncut plasmid DNA (purified by commercial kit), Lane 3: plasmid DNA (purified by commercial kit) digested with Eco RI, Lane 4: plasmid DNA (purified by commercial kit) digested with Eco RI and Pst I, Lane 5: uncut plasmid DNA (purified by specialized reagent), Lane 6: plasmid DNA (purified by specialized reagent) digested with Eco RI, Lane 7: plasmid DNA (purified by specialized reagent) digested with Eco RI and Pst I.

4. 考察

A 社のキット、今回試薬組成を参考にした他社のキットともに、プラスミド DNA 精製に関わる基本的な原理は共通しているものと考えられる。両者ともに、カオトロピックな環境下で DNA がシリカパウダーに吸着される原理を用いているのである。しかし原理は同じとはいいながら、両者が同じ組成の試薬を用いているのかは不明である。また、仮にこれらの試薬を入れ替えても機能するかどうかは、実際に試してみないとわからない。

今回の実験では、試薬組成が一切開示されていないキットに対して、自身で調製した試薬を適用することで、期待される実験結果が得られるか試した。結果として、今回試したプラスミド DNA 精製キットに関しては、自作した試薬を用いても全く問題なく実験が可能であると

ということが判明した。たいへん驚くべきことに、今回の実験に関しては、キット添付の試薬よりも自作の試薬を用いたほうが、良い収量を得ることができた。用いた菌体は全く同じであったにも関わらず、回収されたプラスミド DNA の量は約 3 倍もの違いが見られた。かつ、純度に関してはキットでも自作試薬でも同等の値が得られた。

収量に関して変動係数を取り、この値のぶれ幅をみたところ、キットの試薬で回収したプラスミド DNA の収量と標準偏差の変動係数が 31.1%であったのに対し、自作の試薬で行った時のそれは 10.8%であった。つまり、自作の試薬を用いたほうが、安定して結果が得られることが判明した。2.4 で述べたように、今回の実験では 1 個の三角フラスコで培養した大腸菌を 1.5mL チューブに順次分注していった。つまり、今回繰り返し行われた実験において、そのチューブ内の大腸菌の量は一定であると考えられる。従って、収量や標準偏差の違いを培養条件や菌体量の違いなどに理由を求めることは考えづらい。

A 社キットの取扱説明書には、1~5mL の培地で培養した大腸菌からおおよそ 15 μ g の精製プラスミド DNA が回収できると記載されている。Table 1 に示す濃度から収量を計算すると平均で 18 μ g 取れていることになり、このことから A 社キットの添付試薬のみで得られたプラスミド DNA は説明書通りの十分な量が回収されたと考えられる。

シリカメンブレンを用いたプラスミド DNA 精製の際には、単にプラスミド DNA がシリカメンブレンに吸着するだけではなく、最後の段階である溶出も容易でなくてはならない。DNA とシリカメンブレンの吸着が強すぎると、最後の溶出段階におけるプラスミド DNA の溶出が困難となり、結果として収率が低下する可能性も考えられる。また、高塩濃度の溶液でありさえすればグアニジンのような試薬を用いずとも DNA と二酸化ケイ素との結合が起こるとする報告もあり⁵⁾、キットの試薬はそのようなことも考慮して「結合バッファー」が最適化されている可能性もある。しかし組成が開示されていないため、それ以上のことは不明である。ひとつ言えることは、今回の実験において、少なくとも自作品を用いた場合にもプラスミド DNA はシリカメンブレンに正しく結合し、正しく溶出したという結果が得られたことである。

一般論として、実験を行う際に原理や試薬組成を知ろうとすることは当然のことであるが、特に、実験を人に教える際には、その試薬の組成や実験の原理をはっきりとさせておかなければならない。それなくしては、安全面に関する注意さえ曖昧になってしまう。今回の実験が、キット偏重に陥っている生命科学研究に一石を投じることになるなら、それもまた意味があることではないかと思われる。

なお、2016 年度の IBO 冬季特別教育では、本稿で報告した実験以外にも、ボイル法によるプラスミド DNA 精製における塩化リチウムの有無の影響を見る実験や、RNase A 存在・非存在下でのアルカリ法によるプラスミド DNA 精製における結果の違いを見る実験を行ったことをここに加えておく。

5. 謝辞

この実験を行うにあたり、様々なご助言とご協力をいただきました。国際生物学オリンピック日本委員会の齋藤淳一先生、東京大学教養学部の福田裕子先生、東海大学工学部生命化学科の柴田遥香氏、国際生物学オリンピック 2017 年大会代表候補者の諸君に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) H.C. Birnboim and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523, 1979.
- 2) R. Boom, C.J. Sol, M.M. Salimans, C.L. Jansen, P. M. Wertheim-van Dillen and J. van der Noordaa. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495-503, 1990.
- 3) http://www.openwetware.org/wiki/B_Buffers
- 4) J.F. Sambrook *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN978-0879695774.
- 5) F. Neudecker and S. Grimm. High-throughput method for isolating plasmid DNA with reduced lipopolysaccharide content. *Biotechniques* 28, 107-109, 2000.