

いまさら聞けないプラスミド抽出法の原理

高木 昌宏

遺伝子組換え研究においてプラスミド抽出という実験操作は、今となつては日常の実験の中でルーチン化している。多くの研究室では、市販化されたキットを用いて、そのプロトコールに従って行っているか、あるいは研究室に代々伝わるマニュアルがあり、それに従って保存液を作り、既に確立されたプロトコールに従った作業により、プラスミドを抽出しているであろう。プラスミド抽出に限らず、この「キット」や「プロトコール」というのは「くせ者」で、常に科学的根拠に基づくべき「実験」が、単なる日常の「作業」となってしまう。すると、結果がうまく出ない場合に、そのトラブルを解決する方法が分からないだけでなく、その実験操作の背景にある理論的な側面に目を向けることもなく、特に大学の研究室では、その実験の教育的な価値は完全になくなってしまうであろう。

それもそのはず、キットに含まれている溶液の組成や濃度は、企業秘密であろうし、ともすれば研究室に伝わるマニュアルですら、何年も前に先生（あるいは、伝説の先輩方）が築いた産物であり、科学的な根拠は闇の中に埋もれてしまっているであろう。となれば、誰でも簡単にプラスミド抽出ができるように最適化されている科学的な理由は、キットを用いている場合も、研究室のマニュアルに従っている場合も、分からないまま実験作業を行っていたりするのではないだろうか？

この原稿の依頼を頂戴してから、筆者が調べた数社のプラスミド抽出キットのプロトコールを見る限りにおいては、やはりプラスミド抽出法の中でも最も使用頻度が高く便利なのは、アルカリ抽出法であり、数あるキットもその殆どは、多少の変更が加えられているとは言え、そのもとになるのは、H. C. Birnboim と J. Doly (Laboratoire de Genetique Moleculaire, Institut de Recherche Biologie Molecularire, FRANCE) らによる論文、A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA (*Nucleic Acids Research*, 7, 1513 (1979))¹⁾である。

そこで、本稿では、30年以上前のこの論文をひも解きながら、プラスミド抽出の原理についてお話を頂きたい。遺伝子組換え初心者の方の皆さんはもちろん、ベテランの皆さんも、もう一度一緒に、どのような背景があるか整理して頂ければ幸いである。

アルカリ抽出法の基本原理

アルカリ抽出法の基本的な原理は、DNAのアルカリ変性を巧みに利用して、効率的にプラスミドDNAを抽出することである。核酸を安定させている要因、そして変性のメカニズムについては、本誌2011年4月号の「バイオよもやま話」の「どうして核酸は変性するの？」に藤原伸介先生が詳しく説明して下さっているので²⁾、ぜひそちらを参考にして頂きたい。

pHとDNA変性の関係を簡単に要約すると、DNAは、中性付近のpHで塩基間に水素結合を形成しているが、pHが9.2を越えると塩基の脱プロトン化が始まり、水素結合が壊れてDNAは変性する(一本鎖になる)。本来、この変性状態は穏やかな変化に対しては、可逆的(つまりpHを戻せば、DNAは二本鎖に戻る)であるが、急激な変化には対応できず二本鎖に戻ることができない。また、DNAのアルカリ変性は、DNAの分子量、あるいは存在状態によっても、その効率に違いがある。この基本的なDNAの特性が、アルカリ抽出法の背景にある。

ここで紹介するBirnboimとDolyの論文のアブストラクトには、以下の記載があるので、原文のまま転載する。The principle of the method is selective alkaline denaturation of high molecular weight chromosomal DNA while covalently closed circular DNA remains double-stranded. Adequate pH control is accomplished without using a pH meter. Upon neutralization, chromosomal DNA renatures to form an insoluble clot, leaving plasmid DNA in the supernatant.

つまり同じ化学組成のDNAであるが、分子量の大きい染色体は、選択的にアルカリ変性し、分子量が小さく、しかも超らせん構造をとる閉環状(cccDNA, covalently closed circular DNAあるいはsuper coil (sc)とよばれる)のプラスミドは、変性しにくい。プラスミド分子にはトポロジーの異なる状態が存在するが、この点について簡単に触れておきたい。ご存知のようにプラスミド(図1)は環状のDNA分子だが、細胞内ではトポイソメラーゼの働きでcccの状態に変換されている。ccc状態のDNA二本鎖のうち、片方のDNA鎖のホスホジエステル結合が決断されると、残ったDNA鎖が支軸となり自由回転し、開環状(open circular, oc)になる。また二本鎖の両方が切断されると線状(linear, L; 直線状あるいは

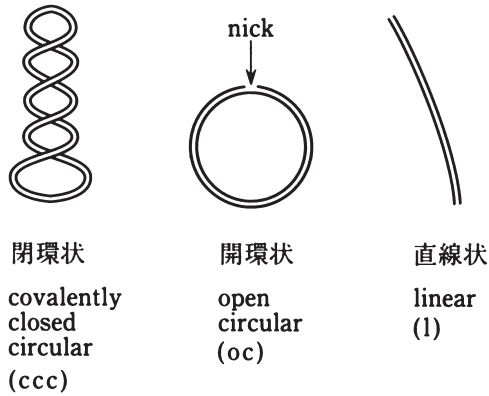


図1. プラスミドの状態変化 (文献³⁾より抜粋)

直鎖状とよばれることもある)の分子となる。構造的にcccは最も安定であり、急激なpH変化を経ても不可逆な変性状態 (irreversibly denatured form) にはなりにくい。この性質を利用してプラスミドの抽出法が開発された。以下に歴史をふり返りながら説明したい。

アルカリ抽出に至る歴史

遺伝子組換え実験が行われた1970年代においては、プラスミドを抽出する際、おもに塩化セシウムを用いた密度勾配超遠心法を用いていた。この方法は、染色体に比べてプラスミドにより多くのエチジウムブロマイド (臭化エチジウム) が結合し、相対的に密度が高くなる特徴を用いてプラスミドを遠心法によって抽出する方法である⁴⁾。かなり高い純度のプラスミドを抽出することができるが、手間、費用、時間、すべてが相当かかる方法であった。しかも相当量の発ガン物質であるエチジウムブロマイドを用いる実験で、筆者も怖々臭化エチジウムに染まる赤い遠心チューブを取り扱った経験がある。組換えプラスミドの構築を迅速に判定する目的であれば、それ程までに純度の高いプラスミドは必要ではなく、一晩かけて超遠心を行い、さらに一晩かけて透析するという時間的な余裕もないのである。制限酵素処理、電気泳動、あるいは形質転換できる程度の量と純度のDNAを、迅速、安価に調製できる方法が望まれていた。

プラスミドという言葉がまだ広まっていない、1960年代後半から70年代にかけて、ファージなどの染色体外複製ユニットの研究が盛んに行われていた。その頃、pH 12.0~12.5の狭い範囲で、線状 (つまりcccでない) DNAは変性するが、cccDNAは、その条件で簡単には変性しないことが分かっており⁵⁾、この特徴を上手く利用すれば、プラスミドDNAなどのcccDNAを調製できると考えられていた。

BirnboimとDolyの論文で発表されたアルカリ抽出法

は、pHをモニターすることなく、アルカリ条件をコントロールして簡便にプラスミドを抽出できる方法として、世界中に一気に広まった。

使用する液とその組成

溶液I: リゾチーム液 (Lysozyme 溶液)

2 mg/ml リゾチーム (lysozyme), 50 mM グルコース (glucose), 10 mM CDTA (cyclohexane diamine tetracetate), 25 mM Tris-HCl (pH 8.0). リゾチームのみ直前に混合し、その他の液はストック液として、0°Cに保存する。

CDTAとは、キレート剤であり、良く用いられるEDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) よりもアルコールに溶けやすく、金属イオンと強い複合体を形成すると言われている。しかし、CDTAの代わりにEDTAを用いても構わない。

溶液II: アルカリSDS液 (Alkaline SDS 溶液)

0.2 N 水酸化ナトリウム (NaOH), 1% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate (SDS)). 室温で保存、約1週間安定である。

溶液III: 高濃度塩溶液 (High salt 溶液)

3 M 酢酸ナトリウム (sodium acetate (pH 4.8)), 3 mol の酢酸ナトリウムを適量の水に溶かし、pH 4.8に氷酢酸にて調整し、液量を1lに合わせる。室温で保存可能。
RNaseA液 (A stock 溶液 of RNaseA)
RNase A (1 mg/ml in 5 mM Tris-HCl, pH 8.0) を準備し、100°Cで10分間処理する。

標準的な実験操作

本題に入る前に、プラスミドのコピー数について、少し説明を加える。プラスミドのコピー数とは、1つの細胞の中にいくつのプラスミドが存在するかである。コピー数は当然ながら、プラスミド抽出の収量に関わる重要な要因である。プラスミドの複製起点として多く用いられているのは、ColE1とpMB1であり、両複製起点は、互いに非常に近い関係にある (表1)。ここでの説明の際に例に挙げるプラスミドであるpBR322 (4363 bp) は、1細胞あたりに15-20のコピー数のプラスミドが存在するとされている (低コピー数プラスミド)。pUC由来のプラスミドは、変異導入されたColE1複製起点が含まれ、コピー数は高くなっており、1細胞あたり500-700のプラスミドが存在する (高コピー数プラスミド)。つまりプラスミドのコピー数には、10倍以上の違いがある事になるので、抽出実験の結果に一喜一憂する前に、自分の使っているプラスミドの複製起点の特徴や、そのコピー数については、理解しておく必要がある。表1に、代表的なプラスミドとそのコピー数についてまとめている。なお、プラスミドのコピー数制御に関しては、本誌

表1. 各種プラスミド/コスミドの複製起点およびコピー数
(Qiagen Plasmid Purification Handbook (2005) より)

DNA コンストラクト	複製開始点	コピー数	分類
<プラスミド>			
pUC ベクター	pMB1*	500-700	高コピー
pBluescript ベクター	ColE1	300-500	高コピー
pGEM ベクター	pMB1*	300-400	高コピー
pTZ ベクター	pMB1*	>1000	高コピー
pBR322 および誘導体	pMB1*	15-20	低コピー
pACYC および誘導体	p15A	10-12	低コピー
pSC101 および誘導体	pSC101	~5	非常に低いコピー
<コスミド>			
SuperCos	pMB1	10-20	低コピー
pWE15	ColE1	10-20	低コピー

*pMB1の複製起点はColE1のそれと非常に関連しているため、お互いに不和合性と考えられる。
ここに掲載されている高コピー・プラスミドはこの起点が変異したものを持つ。

次号で橋本義輝先生が詳解されているので参照いただきたい。

それでは以下に、プラスミド、pBR322についての抽出例を基本に、実験操作について述べる。

まず器具や装置について、Eppendorf-type (1.5 ml) のポリエチレンチューブ (通称エッペンドルフチューブ)、8000~10,000 × gの遠心力を掛けられる遠心分離装置、遠心分離上層液の完全な除去のためのパストールピペット・アスピレーターなどがあると便利である。

大腸菌組換え体を、100 µg/mlのアンピシリンを選択圧として含む2.5 mlのL-培地で培養する。約一晩、18時間の培養の後、0.5 mlの培養液を、1.5 ml容のエッペンドルフチューブに回収する。残りの液は、40%グリセロールを加えて、-20°Cで保存する。すべての実験操作は、特に述べない限り、室温で行う。

培養液を含むチューブは、約15秒間遠心する。上澄液をアスピレーターなどで注意深く取り除き、細胞を100 µlの溶液Iに懸濁し、そのチューブを0°Cで30分間置く。その後、200 µlの溶液IIを加えて、ゆっくりと攪拌する。その際、内容液はほとんど透明で、やや粘り気を帯びた状態になる。

溶液IIの組成は、水酸化ナトリウム (強アルカリ) と界面活性剤 (SDS) である。この状態で溶液は、高いアルカリ性になり (おおよそpH12~13)、タンパク質、核酸など、ほとんどの生体物質は、低分子物質はもちろん、高分子物質ですら溶解した状態である。特に先に述べたとおり、染色体DNAは、変性状態、つまり一本鎖状態になっている。従って、この状態では、液が透明な状態になる。

チューブを5分間0°Cで保温した後、150 µlの溶液IIIを加え、チューブを逆さまにしながら、数秒間ゆっくり

と攪拌する。この時に、DNAを含む乳白色の沈殿物が出てくる。

約1時間、チューブを0°Cで保温し、タンパク質、高分子量のRNA、そして染色体DNAを沈殿させる。5分間、遠心分離し、透明の液を新しいチューブに回収する。

そこに1 mlの冷エタノールを加えて、-20°Cで30分間保温、約2分間遠心分離した後、アスピレーターで液をできるだけ除き、沈殿を回収する。

沈殿物を100 µlの0.1 M酢酸ナトリウム/0.05 M Tris-HCl (pH 8) に懸濁し、2倍量のエタノールを加え、10分間-20°Cで保温し、再度、約2分間遠心分離し、液を除去し沈殿を回収する。沈殿に40 µlの滅菌水を加えて懸濁した後、10 µlの5×バッファーを加えて、電気泳動を行う。

形質転換や制限酵素処理に際しての変更点

形質転換に際しては、遠心分離して回収した沈殿物を、40 µlの水またはバッファーに懸濁し、そこから数µlを用いてコンピテント細胞に加えれば、充分量の形質転換体が得られる。制限酵素処理に際しては、沈殿物を36 µlの滅菌水に懸濁し、そこに4 µlのpancreatic RNase(1 mg/ml)を加えて、37°C、30分処理し制限酵素バッファーと、1ユニットの制限酵素を添加して、37°Cで保温する。

より純度の高いプラスミドを得るための変更点

ここまでの内容は、BirnboimとDolyらの論文に記載されている通りに記述しているのだが、たとえばその後、Maniatisらによって著された遺伝子組換え実験のバイブルとも言える“Molecular Cloning -A Laboratory Manual”⁶⁾では、以下の変更点が記載されている。

溶液IIIの組成が、5M酢酸カリウムpH4.8に変更され

ている。溶液IIIを添加した後の遠心上澄液に、等量のフェノール/クロロホルム液を加え攪拌・遠心し、その水層に対してエタノールを加えている。エタノール沈殿の後、沈殿物に70%エタノールを加えて、遠心する操作が含まれている。

さらにその後、溶液IIIは、7.5M酢酸アンモニウム溶液 (pH7.6) に変更されている例、また、最初のエタノール沈殿の際に、エタノールではなく、イソプロパノールを用いて行う例など、改良点に関する報告は非常に多くある。最近販売されている多くのプラスミド精製キットで採用されているのは、吸着ビーズ、シリカ膜などであり、スピнкаラムなどを用いて、純度の高いプラスミド抽出を可能にしている。これらの変更点の意義については、後述する。

各溶液の役割について

ここでは、溶液ごとにその組成に基づいて役割を整理したい。

溶液I：リゾチームは、細胞壁の分解、グルコースは、浸透圧を与えて細胞膜を破壊する役目、そしてキレート剤 (CDTA, EDTA) は、金属イオンを活性中心を持つデオキシリボヌクレアーゼを阻害する目的がある。溶液Iの組成から分かるように、この操作は細胞壁を溶解する操作である。大腸菌のようなグラム陰性菌の場合には細胞壁は弱く、この操作で良い (実際には、リゾチームが無くても抽出できる)。しかし、細胞壁構造の強固なグラム陽性菌の場合には、その表層の性質に応じてリゾチーム濃度や保温温度を変更する必要がある。BirnboimとDolyの論文にも、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) からのcccDNAの抽出には、溶液I添加後、室温または37°Cで30分保温する操作が有効であるとの記載がある。

溶液II：界面活性剤とpHにより、細胞成分は完全に溶解するのがこの操作である。SDSは、細胞の膜構造を破壊し、水酸化ナトリウムの高いpHにより、は、染色体DNAを変性させる。

溶液III：酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸アンモニウムなど、色々な化合物が用いられるが、いずれの場合もpHを急激に中性に戻すステップである。この条件では、いったん溶解したタンパク質とSDS、そして染色体DNAが複合体を形成し、不溶性の凝集物を形成する。

その後の改良に用いられている試薬についても以下に説明する。フェノール/クロロホルム処理は、水溶液中に残るタンパク質を完全に変性させる操作である。酢酸ナトリウムを用いた当初の方法が、酢酸カリウムや酢酸アンモニウムに変更されている点、さらにはエタノールではなく、イソプロパノールがDNA沈殿に用いられるようになったのは、制限酵素処理条件に影響するナトリウム

塩の沈殿物への混在をできるだけ除去する目的である。

最近のキットで、シリカ膜やビーズなどが良く用いられているが、これは塩濃度の高い状態ではDNAが膜やビーズに吸着し、塩濃度の低い状態では離れる性質を利用し、最終的に純度の高いプラスミドが精製できるように工夫されている。

アルカリ条件下におけるプラスミドDNA

ここで再び、BirnboimとDolyらの論文に戻って、アルカリ条件下におけるプラスミドDNAについて考察した結果について紹介したい。先にも述べたとおり、アルカリ抽出法の基本は、高pH条件下でプラスミドDNAをそのままに、染色体DNAを変性させることにある。しかし、プラスミドDNAも非常に高いpH条件 (たとえばpH13) の条件では、不可逆的に変性してしまう。この不可逆な変性状態 (論文では、irreversibly denatured formと命名されている) は、プラスミド抽出において避けなくてはならない状態である。図2は、BirnboimとDolyらの論文から、そのまま引用した図であるが、図2aは、塩化セシウム・超遠心法で精製したプラスミドpBR322である。バンド4はccc状態、微量のoc状態であるバンド3と、ccc2量体状態 (ccc-dimer) であるバンド2も認められる。図2bは、先ほどのaに対して、0.1Nの水酸化ナトリウム (NaOH) で処理した結果であるが、より移動度の高いバンド5が認められる。これが、不可逆な変性状態 (irreversibly denatured form) である。さらに2つのマイナーバンドが見えるが、これらは2種類の一本鎖状態のDNA (直鎖状: linearと環状: circular) であり、oc状態から変性したと考えられる。そこで、アルカリ処理の前にS1ヌクレアーゼを用いて、ccc状態のDNAの一本鎖にニック (傷) を入れてアルカリ処理をした結果、バンド4とバンド5の量が減り、一本鎖状態のDNAの量が増えていることがわかる。このようにして、プラスミドの不可逆変性状態の量を電気泳動ゲル上での位置を特定することで測定し、アルカリ抽出条件の最適化が行われたのである。

プラスミドの不可逆変性状態が形成される程の高いpH条件を回避しつつ、同時に染色体DNAを変性させるのには充分なアルカリ条件を、pHメーターなどを用いることなく設定するように工夫する事が、極めて重要である。

図2eに示しているのは、標準的な方法で取得した抽出物の電気泳動結果である。ccc状態のプラスミドであるバンド4の下に、不可逆変性物が見える (バンド5)、混在している染色体DNAの位置が、バンド1である。また、大量の小分子量のRNAに相当するのがバンド6である。oc DNAは、バンド3であり、ccc-dimer DNAが、バンド2である。

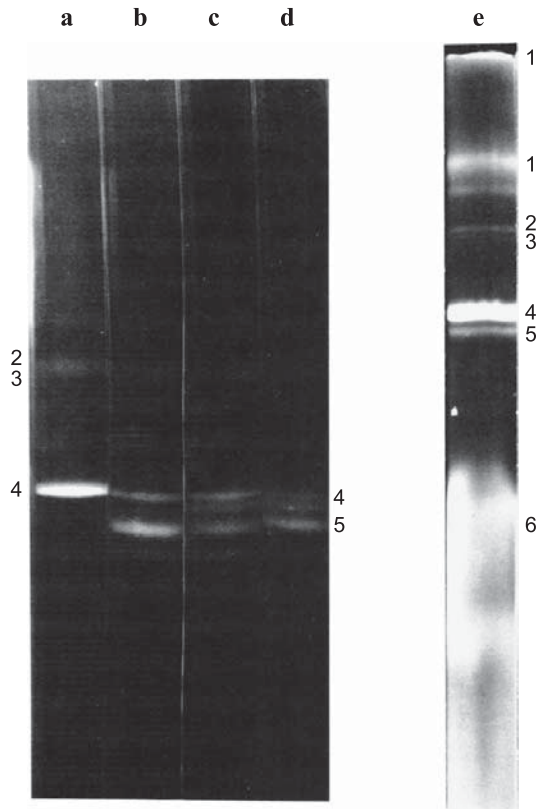


図2. プラスミドDNAのアルカリ処理および、プラスミドを含む細胞抽出液を電気泳動したアガロースゲル。a: 塩化セシウム超遠心法により調製したプラスミドpBR322の電気泳動結果。b: aのプラスミドに対して、0.1N NaOHで5分間室温で処理したサンプルの電気泳動結果。c: bの操作において、アルカリで処理する前に、S1ヌクレアーゼで15分間処理したサンプルの電気泳動結果。d: cの操作において、ヌクレアーゼ処理時間を30分にしたサンプルの電気泳動結果。e: プラスミドpBR322を保持する *Escherichia coli* HB101からのアルカリ抽出サンプルの電気泳動結果 (各バンドを明確に観察するために長時間泳動している)。バンド1は、染色体DNA、バンド2は、pBR322の2量体、バンド3は、pBR322のoc、バンド4は、pBR322のccc、バンド5は、pBR322の不可逆変性状態 (irreversibly denatured form)、バンド6は、小分子量のRNAである。

今ではあまり興味を持たれないかも知れないが、RNaseや制限酵素で処理する前のプラスミド抽出サンプルは、このような状態なのである。自分のサンプルについて、それぞれの状態に相当するDNAの位置を知っておくのは、今でも電気泳動結果を解釈するのに大いに役立つのではないと思う。ちなみに腕の良い(抽出作業が上手い)人が作業を行うとcccの割合が高くなる。

その他の抽出法

DNAを変性させる要因としては、アルカリ条件(高pH)と、高温条件がある。実際、高温処理をプラスミド抽出に用いる方法は、Boiling Methodとして確立し

ている。細胞を回収し、ショ糖、界面活性剤(Triton X-100)、EDTAを含む液に懸濁し、リゾチームで処理した後、沸騰水中に40秒間つけて染色体DNAを変性させ、プラスミドDNAを含む遠心上澄を回収する方法である。操作は確かに極めて簡単なのだが、純度・回収率はあまり高くないので、やはりアルカリ抽出法を採用している研究者が多いのが実状である。

最後に

アルカリ抽出法を中心に、プラスミド抽出の原理について、「今さら」のような説明をさせて頂いた。生物系の実験では、多くの操作がキット化、マニュアル化され、便利になっている反面、背景や原理が分からないまま、作業となっているケースは多いのではないかと。プラスミド抽出に限らず、ふだん何気なく使っているキットやマニュアルのそれぞれの溶液や実験操作に、どのような科学的な根拠があるのかに目を向けるのは、最初にこの実験に関わった人達の苦勞を理解する事に繋がるであろうし、トラブルが起こったときに、適切な対処ができるようになるであろうし、何と云っても科学に携わる者として、実験操作の意味について考えるのは、当然の態度ではないだろうか？

ここで紹介したBirboimとDolyらの論文には、以下の記載がある。

A rack holding 60 Eppendorf tubes speeds up handling of larger numbers of samples. Several racks can be prepared by stacking 5 sheets of 2 mm-thick aluminum (or other metal) and drilling 11 mm-dia. holes at 15 mm spacing through all simultaneously; the edges of each sheet are folded as legs.

読めば分かる通り、何とご丁寧にチューブラックの作り方まで説明している。30年前の論文に見つけた、どこか心が和む記述でもある。

文 献

- 1) Birboim, H. C. and Doly, J.: *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513 (1979).
- 2) 藤原伸介: *生物工学*, **89**, 200 (2011).
- 3) 日本生物工学会編: *生物工学実験書改訂版*, p.167, 培風館 (2002).
- 4) Clewell, D. and Helinski, D. R.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **62**, 1159 (1969).
- 5) Jansz, H. S. *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta.*, **123**, 626 (1966).
- 6) Maniatis, T. *et al.*: *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)* p.368, Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
- 7) Holmes, D. S. and Quigley, M.: *Anal. Biochem.*, **114**, 193 (1981).