

報 文

ゼオライトを用いた簡便迅速なプラスミド調製法の開発

Development of simple and rapid preparation method of plasmid using zeolite.

永田 善明*

ゼオライトの陽イオン交換作用を応用し、大腸菌からのプラスミド調製操作を大幅に簡略化・迅速化する方法(ゼオライト法)を開発した。ゼオライト法は、大腸菌をNaOH-SDS溶液により溶解してライセートとした後、ドデシル硫酸と反応して不溶性沈殿を生じる陽イオン(M^{n+})および H^+ をゼオライトの陽イオン交換作用により供給し、大腸菌ライセートのSDS除去と中和を行うことを原理とする。ゼオライト法に用いる M^{n+} およびゼオライト種について検討を行った結果、 Ba^{2+} 型島根県産硬質モルデナイトと H^+ 型島根県産硬質モルデナイトの組み合わせ、または Ba^{2+} 型島根県産精製クリノプチロライトと H^+ 型島根県産硬質モルデナイトの組み合わせが適していた。ゼオライト法によりプラスミドを調製したところ、大腸菌ライセートからのSDS除去率は99.5%となり、得られたプラスミドは制限酵素処理、PCR反応に適用可能な品質であった。ゼオライト法の所用時間は、培地からの大腸菌回収操作を含めて15分以内であり、現時点では最速のプラスミド調製法と考えられた。

1. はじめに

プラスミドとは、バクテリア細胞内に存在する数千塩基対の染色体外環状DNAである。プラスミドはバクテリア細胞内で自律的に複製するため、マルチクローニングサイトや薬剤耐性遺伝子の導入等、人為的に改変された種々のプラスミドが開発され、遺伝子のクローニング、タンパク質の発現、DNA塩基配列の決定など、様々な目的に用いられる。通常、プラスミドの増幅は大腸菌を宿主として行うため、大腸菌からのプラスミド調製操作は、遺伝子工学の最も基本的な実験と言える¹⁾。

大腸菌からのプラスミド調製法として広く用いられてい

るのが、アルカリSDS法¹⁾である。アルカリSDS法の操作は、図1-Aの通りである。①プラスミドDNAを保持している大腸菌を培養後、遠心分離によりペレットとして回収する。②大腸菌ペレットを緩衝液に懸濁する。③NaOH-ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate, 以下SDSと略す)溶液を添加し、大腸菌を溶解させてライセートとする。④酢酸-酢酸カリウム溶液を添加する。これにより、ライセート中のドデシル硫酸はクラフト点の高い K^+ 塩となり、沈殿を生じる。また、ライセートの弱酸性化および塩析効果により、大腸菌由来の染色体DNA、タンパク質は凝集し不溶性の沈殿となるが、プラスミドは分子量が小さいために溶液中に留まる。⑤溶液を遠心操作により固液分離

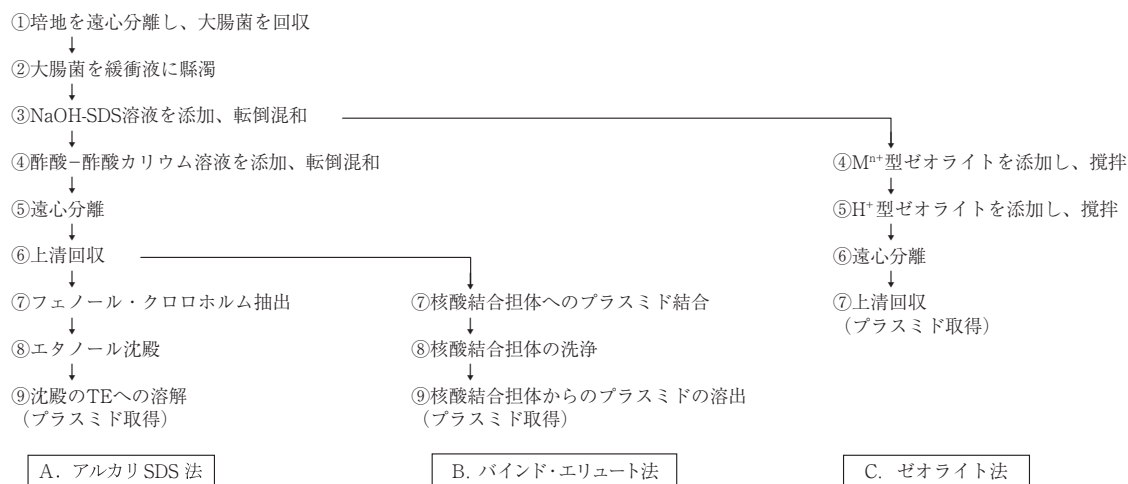


図1 プラスミド調製法の操作の比較

*環境技術グループ

する。⑥プラスミドを含む上清を回収する。⑦上清には不純物としてタンパク質が含まれているため、フェノール・クロロホルム抽出によるタンパク質除去を行う。⑧エタノール沈殿を行う。遠心分離によりプラスミド沈殿をペレットとして回収する。⑨ペレットをTE(Tris-HCl, EDTA 緩衝液)に溶解し、プラスミド溶液とする。このようにアルカリ SDS 法は操作段階が多く煩雑であり、有害物質であるフェノール、クロロホルムを使用する必要がある。そこで、操作の簡略化や有害物質の使用量削減を目的として、DNA 結合担体を用いたバインド・エリユート法(Boom 特許²⁾, Qiagen 特許³⁾など)が開発された。バインド・エリユート法の操作は図1-Bの通りである。バインド・エリユート法は、アルカリ SDS 法における⑥の上清回収以降を核酸結合担体によるプラスミドの選択的結合と洗浄、溶出操作に置き換えたもので、遺伝子導入品質の高純度プラスミドを得ることができる。現在、多くのバイオ試薬メーカーからバインド・エリユート法を採用したプラスミド調製キットが発売されているが、培地からの大腸菌回収からプラスミド取得までの所用時間は短いものでも30-45分であり、多量の試料を処理する必要があるプラスミド構築時のスクリーニング実験においては、さらなる所用時間の短縮と簡便さが望まれている。

このような既存法の欠点を解消するため、ゼオライトの持つ陽イオン交換作用を応用し、アルカリ SDS 法の操作を大幅に簡略化するとともに、所用時間約15分でプラスミドを調製する方法(以下ゼオライト法と称す)を開発した。ゼオライト法の操作は図1-Cの通りである。①から③の操作はアルカリ SDS 法と同様である。③では、大腸菌ライセート中には大腸菌由来の染色体 DNA、プラスミド、タンパク質、緩衝液に含まれるグルコース、Tris-HCl, EDTA、および大腸菌溶解液に含まれる NaOH、SDS が含まれている。④大腸菌ライセートに、ドデシル硫酸と反応して不溶性の沈殿を生成する陽イオン(以下 M^{n+} と称す)を交換性陽イオンとして保持するゼオライト(以下 M^{n+} 型ゼオライトと称す)を添加する。これにより、大腸菌ライセート中の SDS および NaOH に由来する Na^+ がゼオライト中の M^{n+} と交換してライセート中に溶出し、 M^{n+} がドデシル硫酸と反応して沈殿を形成することで大腸菌ライセートより除去される。⑤ H^+ を交換性陽イオンとして保持するゼオライト(以下 H^+ 型ゼオライトと称する)を添加する。これにより、工程④において大腸菌ライセート中のドデシル硫酸と反応しなかった M^{n+} が H^+ と交換し、大腸菌ライセートの中和、 M^{n+} の除去が行われる。工程④⑤により、大腸菌ライセートに含まれる変性状態の染色体 DNA およびタンパク質は凝集不溶化し、ゼオライト粒子間に捕捉される。また、ゼオライトによるタンパク質の吸着もおこる。⑥遠心分離により固液分離を行う。⑦プラスミドを含む上清を回収する。

アルカリ SDS 法では、図1-A ④の段階において、それま

でに添加した溶液に含まれる塩がほぼそのまま残存するため、⑧エタノール沈殿による溶液交換と脱塩をしない限り各種反応に用いることはできない。一方ゼオライト法では、 M^{n+} および H^+ をイオン交換により大腸菌ライセートに供給するため、最終的に得られるプラスミド試料には、原理上②の緩衝液由来の成分以外は残存しないこととなり、これらは特に阻害成分とはならないので、そのまま各種反応に供することができる。

このゼオライト法について、プラスミド調製条件を最適化するためにゼオライト種、交換性陽イオン種を検討するとともに、得られたプラスミドの品質を各種酵素処理などにより検証したので報告する。

2. 試料および方法

2.1 ゼオライト試料

試験には、島根県産硬質モルデナイト(以下モルデナイトと称す)、島根県産精製クリノプチロライト(以下クリノプチロライトと称す)、合成 A 型ゼオライト A-3(以下ゼオライト A と称す)、合成 X 型ゼオライト F-9(以下ゼオライト X と称す)の4種を用いた。

モルデナイトは、粒径2-5mmの粗砕試料を遊星ボールミル(FRITSCH 製 P-5, 250mL メノウポット, ϕ 10mm メノウボール)を用いて湿式粉碎し、目開き32 μ mのふるい通過分を水篩して平均粒径が10-30 μ mとなるよう分級したものを試料とした。クリノプチロライトは、粉末状のものを入手時の状態で試料とした。ゼオライト A およびゼオライト X は、東ソー製の粉末を入手時の状態で試料とした。

2.2 ゼオライトの陽イオン交換処理

3.2項に記載のモルデナイトの陽イオン交換処理は、次の方法で行った。0.1N の KCl, RbCl, $CaCl_2$, $SrCl_2$, $BaCl_2$, HCl 各溶液 1L に各々モルデナイト 25g を入れ 80 $^{\circ}C$, 16 時間浸漬し、陽イオン交換を行った。陽イオン交換終了後、各モルデナイトを超純水約 1L で 5 回洗浄した後 110 $^{\circ}C$ で乾燥させ、試験に供した。

3.3項に記載のゼオライトの陽イオン交換処理は、次の方法で行った。0.1N の KCl, $SrCl_2$, $BaCl_2$, HCl 各溶液 1L に各々ゼオライト試料 50g を入れ 80 $^{\circ}C$, 24 時間浸漬する処理を 1 サイクルとし、1 サイクル毎に新たに調製した各溶液に交換しながら、この操作を 12 回繰り返した。また、陽イオン交換の進行状況をモニターする目的で、24 時間浸漬後の各溶液中の Na, K (KCl 溶液によるイオン交換試料を除く), Mg, Ca の濃度を、偏光ゼーマン原子吸光光度計(日立製 Z-6000)により測定した。陽イオン交換終了後、各ゼオライトを超純水約 1L で 5 回洗浄した後 110 $^{\circ}C$ で乾燥させ、試験に供した。

2.3 モルデナイトの陽イオン交換率の測定

3.1項に記載のモルデナイトの陽イオン交換率は、次の方法で求めた。まず、陽イオン交換処理を行っていないモル

デナイト試料約2.5gを1N $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 溶液1Lに80℃、16時間浸漬した後、 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 溶液に溶出したNa、K、Mg、Caの濃度を偏光ゼーマン原子吸光度計(日立製Z-6000)により測定した。4種の陽イオンの溶出量(当量)を合計し、陽イオン交換容量1.373meq/gを算出した。次に、2.2項に記載の陽イオン交換処理終了後、浸漬に用いた塩溶液中に含まれるNa、K、Mg、Caの各濃度を、同様に測定した。なお、KCl溶液による陽イオン交換では、 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 溶液による溶出K量を、陽イオン交換前のモルデナイト中に保持されている交換性 K^+ 量とした。また、 CaCl_2 溶液による陽イオン交換では、 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 溶液による溶出Ca量を、陽イオン交換前のモルデナイト中に保持されている交換性 Ca^{2+} 量とした。各陽イオンの溶出量(当量)の合計値を陽イオン交換容量1.373meq/gで除し、陽イオン交換率とした。

2.4 ゼオライトの陽イオン保持量の測定

3.2項に記載の M^{n+} 型ゼオライトが保持する K^+ 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 量は、次の方法で求めた。2.2項に記載の陽イオン交換終了後のゼオライト試料約0.5gを1N NH_4NO_3 溶液50mLに80℃、16時間浸漬した。次に、遠心機(日立製CT5DL)により3000rpm、10分遠心分離し、上清を回収した。この上清について、Kは偏光ゼーマン原子吸光度計(日立製Z-6000)により、Sr、BaはICP発光分光光度計(島津製作所製ICPS-7500)により溶出量(当量)を測定し、各陽イオンの保持量を算出した。

3.2項に記載の H^+ 型ゼオライトの H^+ 保持量は、次の方法で求めた。ゼオライト試料約0.5gを1N KCl溶液100mLに80℃16時間浸漬した。次に、遠心機(日立製CT5DL)により3000rpm、10分遠心分離し、上清を回収した。この上清について、pH7.0を終点として0.1N NaOH溶液で滴定し、滴定に要したNaOH溶液量から H^+ 保持量を算出した。

2.5 SDS除去に用いる陽イオン種の検討

陽イオン溶液は各無機塩を超純水に溶解し、1M水溶液とした。SDSと反応して不溶性沈殿を生じる陽イオンの判定は、大腸菌懸濁に用いる緩衝液(0.9%グルコース、10mM Tris-HCl(pH8.0)、5mM EDTA)1mL、1% SDS 2mLを試験管に分注し、ここに各陽イオン溶液0.1mL加えて攪拌し、沈殿生成を目視により確認した。水酸化物沈殿を生じる陽イオンの判定は、前記と同一組成の緩衝液1mL、0.2M NaOH 2mLを試験管に分注し、ここに各陽イオン溶液0.1mL加えて攪拌し、沈殿生成を目視により確認した。試験は室温(22℃)で行った。

2.6 プラスミド調製試験

2.6.1 大腸菌試料

プラスミド調製試験用の大腸菌にはDH5 α (東洋紡製)を用いた。この大腸菌にプラスミドpBluescript II SK+(STRATAGENE社製)を導入し、グリセリンストックとした。試験の前日にグリセリンストックをLB培地3mLに

植菌し、37℃16時間震盪培養したものを試験に供した。

2.6.2 アルカリSDS法によるプラスミド調製試験

アルカリSDS法によるプラスミド調製試験は、文献¹⁾に記載のアルカリ-mini prep法を参考に、次の方法で行った。なお遠心分離操作には、全てクボタ製小型冷却遠心機3700を用いた。大腸菌培養液1mLを1.5mLサンプルチューブに分注し、15000rpm、4℃、1分遠心分離した。遠心後上清を取り除き、2.5項と同一組成の大腸菌懸濁用緩衝液100 μL を添加し、ボルテックスミキサーで十分に攪拌した。次に、NaOH-SDS溶液(0.2M NaOH、1% SDS)200 μL を添加し、静かに転倒混和し、氷上で2分静置した。次に、大腸菌ライセート中和液(3M CH_3COOK 、11.5%(v/v) CH_3COOH)150 μL を添加し、転倒混和して氷上に5分静置した。次に、15000rpm、4℃、10分遠心分離し、上清を新しい1.5mLサンプルチューブに移した。この上清に400 μL のイソプロパノールを加えて転倒混和し、室温で20分静置した。次に15000rpm、20℃、10分遠心分離し、上清を取り除いた。サンプルチューブ内のペレットを70%エタノールで2回洗浄した後乾燥させ、300 μL の1/10TE(1mM Tris-HCl pH8.0、0.1mM EDTA)に溶解してプラスミド試料とした。

2.6.3 ゼオライト法によるプラスミド調製試験

ゼオライト法によるプラスミド調製試験は、次の方法で行った。遠心分離操作には、全てクボタ製小型冷却遠心機3700を用いた。大腸菌培養液1mLを1.5mLサンプルチューブに分注し、15000rpm、4℃、1分遠心分離した。遠心後上清を取り除き、2.5項と同一組成の大腸菌懸濁用緩衝液100 μL を添加し、ボルテックスミキサーで十分に攪拌した。次に、NaOH-SDS溶液(0.2M NaOH、1% SDS)200 μL を添加し、静かに転倒混和し、氷上で2分静置した。この大腸菌ライセートに、2.2項で調製した M^{n+} 型ゼオライト0.2gを添加し、攪拌した。次に、2.2項で調製した H^+ 型ゼオライト0.2gを添加し、攪拌した。次に、15000rpm、4℃、1分遠心分離し、上清を新しい1.5mLサンプルチューブに移した。これを再度15000rpm、4℃、1分遠心分離し、上清を新しい1.5mLサンプルチューブに移し、プラスミド試料とした。

2.7 プラスミド試料に含まれるSDS濃度の測定

プラスミド試料に含まれるSDS濃度の測定は、メチレンブルー吸光度法⁴⁾により行った。

2.8 プラスミド試料の制限酵素処理

プラスミド試料の制限酵素処理は、次の方法で行った。制限酵素はSibEnzyme社製のものをを用いた。酵素反応条件はメーカー推奨条件に従った。反応溶液は、プラスミド試料15 μL 、酵素添付の10 $\times$ バッファー2 μL 、制限酵素1Uとし、超純水で合計20 μL とした。この反応溶液をメーカー推奨温度で1時間反応させた後、1%アガロースによる電気泳動、臭化エチジウム染色を行ってプラスミド消化の有無を確認した。

2.9 プラスミド試料を鋳型としたPCR

プラスミド試料を鋳型としたPCRは、次の方法で行った。PCR用耐熱性DNAポリメラーゼはBIOLINE社製HybriPol DNAポリメラーゼを用いた。PCR用反応液は、HybriPol DNAポリメラーゼ1U、DNAポリメラーゼ添付の10×リアクションバッファー2μL、2.5mM MgCl₂、10mM dNTP Mix、M13プライマー(TGTAAAACGACGGCCAGT)10pmol、Reverseプライマー(GGAAACAGCTATGACCATG)10pmol、プラスミド試料1μLとし、超純水で計20μLとした。反応溶液をサーマルサイクラー(アステック製プログラムテンプコントロールシステムPC-812)にセットし、温度プログラム94℃ 15秒、55℃ 10秒、72℃ 60秒を1サイクルとして35サイクルの増幅反応を行った。反応終了後、1%アガロースに

よる電気泳動、臭化エチジウム染色を行ってDNA増幅の有無を確認した。

3. 結 果

3.1 SDS除去に用いる陽イオン種の検討

アルカリSDS法では、大腸菌ライセートのSDS除去に酢酸カリウム由来のK⁺を用いる。ゼオライト法では、(1)SDSと反応して不溶性沈殿を生成する、(2)大腸菌ライセートはpH12.5のアルカリ性であるため、この条件下で水酸化物沈殿を生じない、これら2つの条件を満たせばMⁿ⁺は

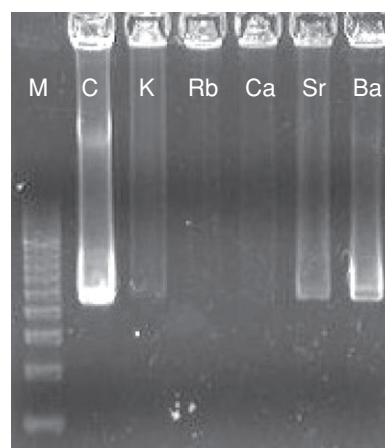


図2 K⁺, Rb⁺, Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺型モルデナイトとH⁺型モルデナイトによるプラスミド調製結果(ゼオライト法)

M:500bps ラダー, C:アルカリSDS法, K:K⁺型モルデナイト, Rb:Rb⁺型モルデナイト, Ca:Ca²⁺型モルデナイト, Sr:Sr²⁺型モルデナイト, Ba:Ba²⁺型モルデナイト。

表3 プラスミド試料のSDS濃度およびSDS除去率

M ⁿ⁺	SDS 濃度(mg/L)	SDS 除去率(%)
K ⁺	4842	27.4
Rb ⁺	5880	11.9
Ca ²⁺	6650	0.3
Sr ²⁺	1760	73.6
Ba ²⁺	194	97.1
アルカリ SDS 法	48	99.3

表1 SDS溶液への添加により沈殿を生じる陽イオン

塩	陽イオン種	SDS 沈殿	水酸化物沈殿
LiCl	Li ⁺	-	-
NaCl	Na ⁺	-	-
KCl	K ⁺	+	-
RbCl	Rb ⁺	+	-
CsCl	Cs ⁺	-	-
MgCl ₂	Mg ²⁺	-	+
CaCl ₂	Ca ²⁺	+	-
SrCl ₂	Sr ²⁺	+	-
BaCl ₂	Ba ²⁺	+	-
LaCl ₃	La ³⁺	+	+
Ce(NO ₃) ₃	Ce ³⁺	+	+
MnSO ₄	Mn ²⁺	-	+
FeCl ₃	Fe ³⁺	+	+
CoCl ₂	Co ²⁺	-	+
NiCl ₂	Ni ²⁺	-	+
CuSO ₄	Cu ²⁺	-	+
AgNO ₃	Ag ⁺	-	+
ZnSO ₄	Zn ²⁺	-	+
AlCl ₃	Al ³⁺	+	+
SnCl ₂	Sn ²⁺	-	+

*Tris-HCl に由来する AgCl が含まれる。

表2 モルデナイトの陽イオン交換率

交換液	溶出イオン(meq/g)				溶出イオン合計(meq/g)	交換率(%)
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺		
1N CH ₃ COONH ₄	0.897	0.351	0.053	0.198	1.373	100
0.1N KCl	0.765	(0.351)	0.066	0.115	1.206	87.8
0.1N RbCl	0.802	0.250	0.042	0.028	1.087	79.1
0.1N CaCl ₂	0.422	0.087	0.023	(0.198)	0.620	45.1
0.1N SrCl ₂	0.532	0.098	0.022	0.092	0.687	50.0
0.1N BaCl ₂	0.601	0.137	0.026	0.096	0.799	58.2
0.1N HCl	0.544	0.113	0.003	0.008	0.662	60.9

K⁺である必要はない。そこで、この2条件を満たす陽イオンを検討するため、20種の金属イオンについて2.5項に記載の試験を行い、結果を表1に示した。試験の結果、K⁺、Rb⁺、Ca²⁺、Sr²⁺、Ba²⁺がSDS除去に用いるMⁿ⁺として使用できる可能性が示唆された。Ca²⁺、Sr²⁺は通常アルカリ条件下では水酸化物沈殿を生じるが、本試験で沈殿を生じなかった理由として、検液に含まれるTris-HCl、EDTAが影響をおよぼした可能性がある。

3.2 陽イオン種がプラスミド調製に及ぼす影響の検討

3.1項の結果を基に、K⁺、Rb⁺、Ca²⁺、Sr²⁺、Ba²⁺を交換性陽イオンとして保持するMⁿ⁺型モルデナイトおよびH⁺型モルデナイトを調製し、これらを用いてゼオライト法によるプラスミド調製試験を行った。表2に試験に用いた各モルデナイトの陽イオン交換率を、図2に各モルデナイトを用いたプラスミド調製試験によるプラスミド試料のアガロース電気泳動像を、表3に各プラスミド試料中のSDS濃度とSDS除去率を示した。調製したプラスミドpBluescript II SK+は2961bpsのプラスミドだが、調製直後はスーパーコイル構造をとっているためにアガロース電気泳動では早く泳動され、約2300bpsのバンドとして検出される。

図2に示したように、K⁺、Sr²⁺、Ba²⁺をMⁿ⁺として保持

表4 ゼオライトの陽イオン保持量

ゼオライト試料	保持量(meq/g)
K ⁺ 型モルデナイト	1.718
Sr ²⁺ 型モルデナイト	1.214
Ba ²⁺ 型モルデナイト	1.348
K ⁺ 型クリノプチロライト	2.204
Sr ²⁺ 型クリノプチロライト	1.746
Ba ²⁺ 型クリノプチロライト	1.816
K ⁺ 型ゼオライト A	4.430
K ⁺ 型ゼオライト X	4.032
H ⁺ 型モルデナイト	0.905

表5 ゼオライト種とSDS除去量およびSDS除去率

ゼオライト試料	残存 SDS 濃度(mg/L)	SDS 除去率(%)
K ⁺ 型モルデナイト	4720	29.2
Sr ²⁺ 型モルデナイト	162	97.6
Ba ²⁺ 型モルデナイト	31.4	99.5
K ⁺ 型クリノプチロライト	5700	37.3
Sr ²⁺ 型クリノプチロライト	159	98.3
Ba ²⁺ 型クリノプチロライト	46.2	99.5
K ⁺ 型ゼオライト A	731	92.0
K ⁺ 型ゼオライト X	472	94.8
アルカリ SDS 法	39.1	99.5

するモルデナイトを用いた試験では、コントロールのアルカリ SDS 法による場合と同一位置にバンドが確認され、プラスミドを調製できることが分かった。プラスミド調製量は、K⁺型<<Sr²⁺型<Ba²⁺型<アルカリ SDS 法であった。これは、表3に示したSDS除去率の順位と一致しており、SDS除去率が高いほどプラスミド調製量が多くなる傾向が見られた。SDS除去率が低いRb⁺、Ca²⁺をMⁿ⁺としたモルデナイトではプラスミドが得られなかった。

3.3 ゼオライト種がプラスミド調製に及ぼす影響の検討

3.2項の結果をふまえて、K⁺、Sr²⁺、Ba²⁺を交換性陽イオンとして保持するMⁿ⁺型モルデナイトおよびクリノプチロライト、K⁺を交換性陽イオンとして保持するMⁿ⁺型ゼオライト A およびゼオライト X、H⁺型モルデナイトを新規に調製し、プラスミド調製試験を行った。表4に試験に用いた各ゼオライト試料のMⁿ⁺またはH⁺保持量を、図3にプラスミド調製試験によるプラスミド試料のアガロース電気泳動像を、表5に各プラスミド試料中のSDS濃度とSDS除去率を示した。

図3レーン1から6に示したように、Mⁿ⁺型ゼオライトにモルデナイト、クリノプチロライトを用いた試験ではK⁺型<Sr²⁺型=Ba²⁺型<アルカリ SDS 法の順にプラスミド調製量が多かった。これは表5に示したように、前項と同様SDS除去率の順位にほぼ一致していた。Mⁿ⁺が同一であれば、モルデナイト、クリノプチロライトの間で調製量の差は見られなかった。

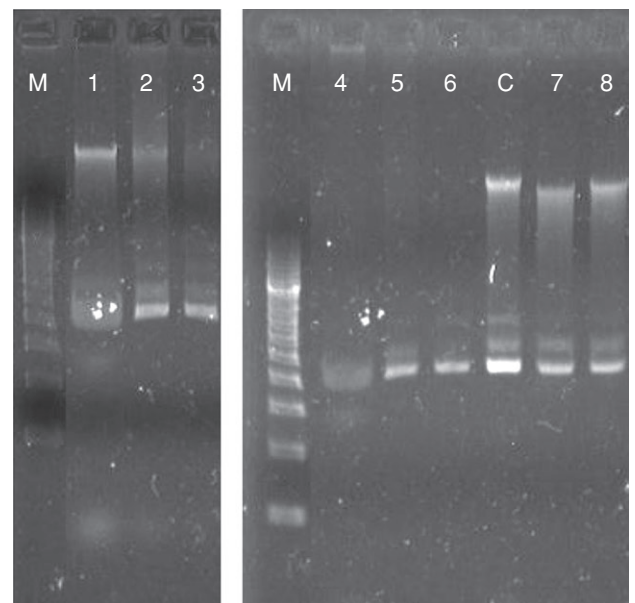


図3 ゼオライト種がプラスミド調製に与える影響

M:500bps ラダー、1:K⁺型モルデナイト、2:Sr²⁺型モルデナイト、3:Ba²⁺型モルデナイト、4:K⁺型クリノプチロライト、5:Sr²⁺型クリノプチロライト、6:Ba²⁺型クリノプチロライト、C:アルカリ SDS 法、7: K⁺型ゼオライト A、8:K⁺型ゼオライト X。

本試験ではSDS除去率が3.2項の試験結果と比較して向上しており、 M^{n+} が Ba^{2+} の場合、モルデナイト、クリノプチロライトともに除去率99.5%でアルカリSDS法と同等、 Sr^{2+} の場合、モルデナイトが97.6%、クリノプチロライトが98.3%の除去率であった。これは、 M^{n+} 型ゼオライトの調製時に溶液交換を12回行い、 M^{n+} 保持量を高めているために M^{n+} 供給量が増加したためと考えられた。一方、 M^{n+} が K^+ の場合は、モルデナイトの場合1.718meq/g、クリノプチロライトの場合2.204meq/gと Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 型のゼオライトより保持量が高いにもかかわらず、SDS除去率は低かった。これを反映するように、図3レーン1、レーン4に見られるバンドは薄く、プラスミド調製量が少ないことが分かる。これは、モルデナイト、クリノプチロライトともに K^+ に対する選択性が Na^+ よりも高く、大腸菌ライセート中の Na^+ と十分交換されなかったために、SDS除去に十分な量の K^+ が供給されなかったためと考えられた。

次に、アルカリSDS法と、 M^{n+} を Ba^{2+} とするゼオライト法について、プラスミド調製量とSDS除去率を比較した。SDS除去率は両法ともに99.5%で同程度であるにもかかわらず、図3に示したようにプラスミド調製量はアルカリSDS法が多い。これは、ゼオライト法による調製操作中に、プラスミドの一部が失われたためと考えられる。試験に用いた天然ゼオライトは、粘土分をできるだけ除くよう水簸等で高度に精製されている。しかし、本試験のゼオライト法では、大腸菌ライセート300 μ Lに対してゼオライトを合計0.4g添加するため、わずかに残る粘土分によりプラスミドが吸着されたと考えられる。

合成ゼオライトを用いた試験については、図3レーン7に K^+ 型ゼオライトAを、レーン8に K^+ 型ゼオライトXを用いた場合のプラスミド調製量を示した。ゼオライトA、ゼオライトXの陽イオン選択性はともに $K^+ < Na^+$ とされて

おり⁵⁾、また表4に示すように K^+ 保持量は約4meq/gであることから、 K^+ 型ゼオライトA及び K^+ 型ゼオライトXをプラスミド調製に用いた場合、高いSDS除去率が期待された。しかし、プラスミド調製量では Sr^{2+} 型、 Ba^{2+} 型天然ゼオライトによる試験と同程度の結果が得られたが、SDS除去率は Sr^{2+} 型、 Ba^{2+} 型天然ゼオライトによる試験およびアルカリSDS法に及ばなかった。

3.4 得られたプラスミドの制限酵素処理への適用

3.3項においてSDS除去率の高かった Ba^{2+} 型モルデナイトおよび Ba^{2+} 型クリノプチロライトを用いて調製したプラスミドについて、制限酵素処理を行った。表6に処理に用いた7種の制限酵素とその反応溶液組成を、図4に制限酵素処理後のプラスミドのアガロース電気泳動像を示した。

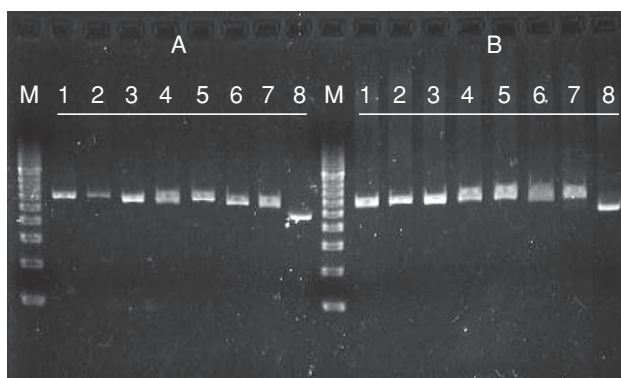


図4 Ba^{2+} 型ゼオライト+ H^+ 型モルデナイトにより調製したプラスミド試料の制限酵素処理結果

A: Ba^{2+} 型モルデナイト+ H^+ 型モルデナイト
B: Ba^{2+} 型クリノプチロライト+ H^+ 型モルデナイト
M: 500bps ラダーマーカー, 1: Kpn I, 2: BamH I, 3: Psp124B I, 4: Pst I, 5: Xba I, 6: Apa I, 7: EcoR I, 8: コントロール(未処理, スーパーコイル型)。

表6 制限酵素および反応溶液組成

制限酵素	反応溶液組成
Kpn I	10mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM $MgCl_2$, 1mM DTT
BamH I, Psp124B I	10mM Tris-HCl (pH7.6), 50mM NaCl, 1mM DTT
Pst I, Xba I	50mM Tris-HCl (pH7.6), 100mM NaCl, 10mM $MgCl_2$, 1mM DTT
Apa I	33mM Tris-Acetate (pH7.9), 66mM K-Acetate, 10mM Mg-Acetate, 1mM DTT
EcoR I	100mM Tris-HCl (pH7.6), 50mM NaCl, 10mM $MgCl_2$, 1mM DTT

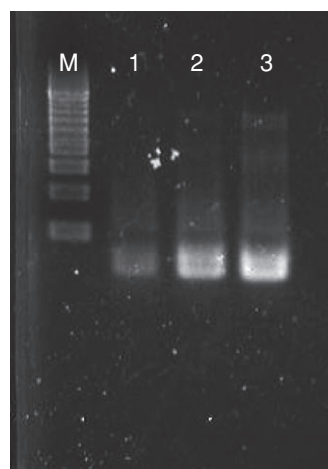


図5 Ba^{2+} 型ゼオライト+ H^+ 型モルデナイトにより調製したプラスミド試料のPCR増幅結果

M: 500bps ラダーマーカー, 1: Ba^{2+} 型モルデナイト+ H^+ 型モルデナイト, 2: Ba^{2+} 型クリノプチロライト+ H^+ 型モルデナイト, 3: アルカリSDS法。

今回用いた制限酵素は、いずれも pBluescript II SK+ を一ヶ所のみ切断する酵素である。制限酵素処理を行っていないプラスミドはスーパーコイル構造をとっているため、レーン8に見られるように約2300bpsのバンドとして観察される。一方、制限酵素処理により切断されたプラスミドはリニア型となるため、本来の長さである約3000bpsにバンドが観察される。図4に示したように、全ての酵素処理においてバンドが約3000bpsに観察され、プラスミドが切断されていることが確認できた。制限酵素は種類によって反応溶液の組成が異なり、特にKpn Iのような低塩濃度条件を必要とする酵素の場合、プラスミド試料からの持ち込み塩類が酵素活性に大きな影響を与える。本試験では反応液の75%までプラスミド試料を持ち込んでも酵素反応に影響を与えないことが示され、ゼオライト法で調製したプラスミドが制限酵素処理に適用可能な精製度であることが示された。

3.5 得られたプラスミドのPCRへの適用

次に、3.4項で用いたプラスミド試料を鋳型としてPCRを行った。PCR産物のアガロース電気泳動像を図5に示した。今回増幅したのは、pBluescript II SK+のマルチクローニングサイトをM13プライマー、Reverseプライマーではさんだ領域約200bpsである。PCRは、反応液中の界面活性剤、イオン強度、イオン種、pHに影響を受ける。図5に示したように、 Ba^{2+} 型モルデナイト、 Ba^{2+} 型クリノプチロライトともに増幅が確認できたが、増幅産物量はモルデナイト<クリノプチロライト=アルカリSDS法であった。今回反応液に持ち込んだプラスミド試料は5%だが、 Ba^{2+} 型モルデナイトで増幅量が少なかったことから、モルデナイトにより調製した試料はPCRに適用するためには精製度が低いことが示唆された。一方、 Ba^{2+} 型クリノプチロライトの増幅量はアルカリSDS法と同等であり、プラスミドはPCR適用に十分な精製度で調製されていると考えられた。

4. 考 察

4.1 ゼオライト法と市販プラスミド調製キットとの比較

現在市販されているプラスミド調製キットは、そのほとんどが核酸結合担体を用いたバインド・エリユート法によるものである。各製品とも、核酸結合担体を充填したカラムや試薬をパッケージ化することで、プラスミド調製に要する時間の短縮を図ろうとしており、所用時間の短いものとしてキアゲン社のHiSpeed Plasmid Midi kit(45分)、プロメガ社のPureYield Plasmid Midiprep System(30分)があげられる。しかし、バインド・エリユート法はその原理上、図1-Bに示した操作ステップを省略することはできず、これ以上の所用時間短縮の余地は極めて少ない。ゼオライト法では、大腸菌ライセートからの染色体DNA除去、SDS除去、タンパク質除去、脱塩、中和をゼオライト添加により1ステップで完了できるため、実質的な所用時間は菌体回収3分、菌体溶解2分、ゼオライトとの接触撹拌5分、遠

心による固液分離5分の合計15分である。これは、現在市販されているプラスミド調製キットと比較した場合、最速と考えられる。

ゼオライト法と操作性が類似するプラスミド調製キットとして、nexttec社のクリーンカラムがある。このキットは疎水性基を付与した担体により不純物を吸着除去する方法⁶⁾であり、実操作時間は約15分でゼオライト法と同等である。しかし、非常に高価であり、特殊な溶液を使用するために吸光法によるDNA濃度測定ができないという問題がある。ゼオライト法では、 M^{n+} に Ba^{2+} を使用する場合、必要な材料は天然ゼオライト、陽イオン交換に要する $BaCl_2$ 、HClのみである。また調製操作において吸光法によるDNA濃度測定に影響を与える試薬は使用しない。よって、nexttec社のキットよりもコスト的、プラスミド試料の濃度評価の面で有利であると考えられる。

ゼオライト法の操作は、本報告では大腸菌ライセートにゼオライトを直接添加する方法をとった。しかし、より簡単に操作するためにはゼオライト充填カラムの開発が望まれる。ゼオライト法は、大腸菌ライセートにまず M^{n+} 型ゼオライトを接触させ、次いで H^+ 型ゼオライトを接触させるという2段階方式をとる必要がある。従って、カラム操作を行う場合、大腸菌ライセートをまず M^{n+} 型ゼオライトカラムに通液し、次にフロースルーを H^+ 型ゼオライトカラムに通液することになる。

4.2 ゼオライトの陽イオン選択性がプラスミド調製に与える影響

ゼオライト法では、大腸菌ライセートのSDS除去および中和を、まずゼオライト中の M^{n+} と大腸菌ライセート中の Na^+ が交換することでライセート中に M^{n+} が溶出しSDSを沈殿させる。続いて大腸菌ライセート中に溶出した余剰の M^{n+} がゼオライト中の H^+ と交換し、ライセートを中和するという2段階の工程で行う。従って、大腸菌ライセートにおける陽イオン交換率を可能な限り高め、最終的に得られるプラスミド試料の精製度を高いものとするためには、使用するゼオライトの陽イオン選択性と M^{n+} の組み合わせが重要となる。ゼオライト法におけるゼオライトの理想的な陽イオン選択順位は、 $H^+ < M^{n+} < Na^+$ である。

モルデナイトでは、大森らの研究により多くの陽イオンに対する選択性が明らかとなっており、 $Mg^{2+} < Ca^{2+} < Na^+ < Sr^{2+} < Ba^{2+} < K^+ < Rb^+ < Cs^+$ である^{7)~10)}。モルデナイトの H^+ 選択順位は明らかとなっていないが、文献¹⁰⁾および予備試験から $Na^+ < Sr^{2+} < H^+ < Ba^{2+}$ と考えられる。このことから、 Ba^{2+} 型モルデナイトと H^+ 型モルデナイトの組み合わせによるプラスミド調製では、使用する陽イオンの選択順位 $Na^+ < H^+ < Ba^{2+}$ により、プラスミド試料中に Na^+ が残留する結果となる。実際にプラスミド試料で10-20mM程度のNaを検出している。この濃度は3.4項に示したように、制限酵素処理には影響を与えないことが分かった。しかし、3.5

項のPCRでは増幅量がアルカリSDS法やBa²⁺型クリノプチロライトによるプラスミド試料に比較して少なく、脱塩が不十分であると考えられる。モルデナイトを用いたプラスミド調製における脱塩促進法としては、大腸菌溶解液にNaOHとSDSに代えてCsOHとドデシル硫酸セシウムを使用することが考えられる。この場合、Mⁿ⁺をK⁺とすればH⁺<<K⁺<Cs⁺となり、陽イオン交換が促進される可能性がある。ただし、CsOHは高価であり、ドデシル硫酸セシウムも市販されていないことからコストはかなり上昇すると考えられる。

クリノプチロライトの場合、陽イオン選択性はSr²⁺<Ca²⁺<Mg²⁺<Na⁺<K⁺である^{7)~10)}。クリノプチロライトではBa²⁺の選択順位が不明であるが、表4に示すBa²⁺とSr²⁺保持量の比較からSr²⁺<Ba²⁺、金属イオンの水和半径と交換吸着の強弱の関係⁹⁾からBa²⁺<Na⁺と考えられる。従って、Ba²⁺型クリノプチロライトとH⁺型モルデナイトの組み合わせによるプラスミド調製では、使用する陽イオンの選択順位が1段階目のBa²⁺型クリノプチロライト添加ではBa²⁺<Na⁺、2段階目のH⁺型モルデナイト添加ではH⁺<Ba²⁺となり、理想的な陽イオン交換が起これると考えられる。これは、35項のPCR試験に示したように、Ba²⁺型クリノプチロライトによるプラスミド試料の増幅率がアルカリSDS法の試料とほぼ等しく、Ba²⁺型モルデナイトによるプラスミド試料よりも多いという結果にも反映されている。

合成ゼオライトA、合成ゼオライトXは陽イオン交換容量が3.4meq/gと天然ゼオライトの2倍以上であり、また文献⁵⁾によると陽イオン選択順位は合成ゼオライトAでCs⁺<Li⁺<Rb⁺<K⁺<Na⁺、合成ゼオライトXでLi⁺<Cs⁺<Rb⁺<K⁺<Na⁺であることから、K⁺型合成ゼオライトとH⁺型モルデナイトを組み合わせる使用することにより理想的な陽イオン交換が進行すると考えられた。しかし、今回の試験ではSDS除去率が天然ゼオライトに及ばず、本目的には適さない結果となった。SDS除去が不十分な理由としては、合成ゼオライトからのK⁺の供給不足が考えられるが、仮に合成ゼオライトのNa⁺、K⁺選択性の差が大きくないことが原因であるならば、合成ゼオライトのMⁿ⁺をRb⁺とすることによってSDS除去率が向上する可能性がある。ただし、Rb⁺は陽イオン交換に使用するRbClが非常に高価であるため、ゼオライト法の商品化を考えた場合には使用は難しい。

5. まとめ

(1)ゼオライトの陽イオン交換作用を用いた簡便迅速なプラ

スミド調製法である「ゼオライト法」を開発した。ゼオライト法は、既存法であるアルカリSDS法の大腸菌ライセート中和、除SDS工程をゼオライトとの接触操作に置き換えることにより、操作時間約15分でプラスミドを調製することができる。

(2)ゼオライト法の実施には、Ba²⁺型クリノプチロライトとH⁺型モルデナイトの組み合わせが適していた。これは、ゼオライトの陽イオン選択性が関係しているためと考えられた。

(3)ゼオライト法により調製されたプラスミドは、制限酵素処理、PCRに適用可能な品質であった。

謝 辞

本報告は、平成19年度シーズ発掘試験「イオン交換性鉱物を用いた1step プラスミド調製法の開発」による研究成果の一部である。本研究を支援していただいた、独立行政法人科学技術振興機構に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 藤本明子, 大杉美穂, 山本雅. “核酸の調製”. バイオマニュアルシリーズ1 遺伝子工学の基礎技術. 山本雅 編, 羊土社, 1993, p.19-76.
- 2) Willem R. Boom, Henriëtte M. A. Adriaanse, Tim Kievits, Peter F. Lens. Process for Isolating Nucleic Acid. United States Patent 5234809. 1993-8-10.
- 3) クイアジェン・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング. 核酸の単離及び精製方法並びにその装置. 特許第3527884号. 2004-5-17.
- 4) JIS K 0102:1998. 工場排水試験法. 30.1.1 陰イオン界面活性剤 メチレンブルー吸光度法.
- 5) 上松敬禧. “3.2ゼオライトの化学”. イオン交換 高度分離の基礎. 妹尾学, 阿部光雄, 鈴木喬. 講談社, 1991, p.82-95.
- 6) Robert-Matthias Leiser, Lutz Plobner, Elena Marcovna Yarshevskaya, Vitali Pavlovich Zubov, Dmitry Valerievich Kapustin, Elena Jurievna Yagudaeva. Use of A Composite Polymer-coated Sorbent for Separation, Purification, Desalting and Concentration of Biopolymers. United States Patent 7018538, 2006-3-28.
- 7) 大森保幸. 島根県産ゼオライトの有効利用に関する研究(第1報). 島根県立工業技術センター報告. 1976, vol.13, p.47-54.
- 8) 大森保幸. 島根県産ゼオライトの有効利用に関する研究(第2報). 島根県立工業技術センター報告. 1977, vol.14, p.60-69.
- 9) 大森保幸, 野田修司, 川谷芳弘, 板倉雅之, 赤木和夫. 天然ゼオライトの基礎的性質に関する2, 3の考察. 島根県立工業技術センター研究報告. 1980, vol.17, p.84-88.
- 10) 大森保幸. 島根県産ゼオライトの有効利用に関する研究(第3報). 島根県立工業技術センター研究報告. 1978, vol.15, p.76-81.