



プラスミド DNA 抽出 Mini キット

# Plasmid DNA Extraction Mini Kit

## 目次

基本データ	3
キットの内容	3
重要事項	4
操作	4
トラブルシューティング	6

\*本製品は研究用です\*





プラスミド DNA 抽出 Mini キットは培養液からプラスミド DNA を経済的かつ迅速に精製します。本キットでは、カオトロピック塩存在下で DNA をシリカ膜へ結合させ、エタノールを含んだ Wash Buffer で洗浄します。本キットでは約 25 分で高純度のプラスミドを抽出し、抽出したプラスミド DNA は即、他のアプリケーションに使用できます。

● 基本データ

サンプル	プラスミドサイズ	収量	所要時間
1~5 ml の培養液	<12kb	20-30 $\mu$ g 程度 (High-copy plasmid)	25 分程度

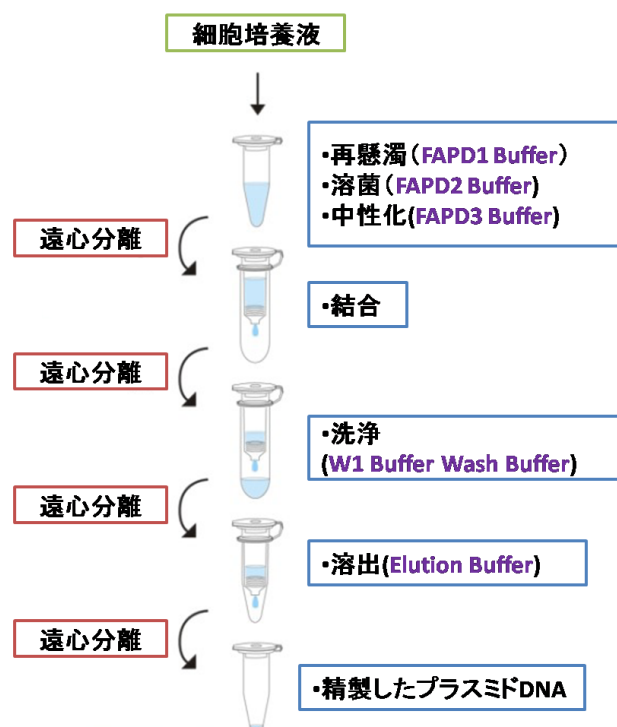
● キットの内容

	FAPDE 001 (100 preps)	FAPDE 001-1 (300 preps)
FAPD1 Buffer	30 ml	90 ml
FAPD2 Buffer	30 ml	90 ml
FAPD3 Buffer	42 ml	120 ml
W1 Buffer (Concentration)	35 ml 開封後、エタノール(96-100%)を 13 ml 加えてください	98 ml 開封後、エタノール(96-100%)を 36 ml 加えてください
Wash Buffer (Concentration)	20 ml 開封後、エタノール(96-100%)を 80 ml 加えてください	50 ml 開封後、エタノール(96-100%)を 200 ml 加えてください
Elution Buffer	15 ml	35 ml
RNase A (50mg/ml)	60 $\mu$ l	180 $\mu$ l
PDE Column	100 pcs	300 pcs
Collection Tube	100 pcs	300 pcs

● **重要事項**

- 1) 本製品の Buffer には刺激物を含んでいるものもあります。取扱時はゴム手袋と白衣を着用してください。
- 2) RNase A を FAPD1 Buffer へ加えるときは、蓋の部分の水滴をスピンドアウンし、1ml の FAPD1 Buffer を RNase A へ加えます。次に RNaseA と FAPD1 Buffer の混合物を FAPD1 Buffer へ加え、添加後は 4°C で保管してください。
- 3) FAPD2 Buffer を使用前に、沈殿物が形成していないか確認してください。沈殿している場合は、55°C で 10 分温めて沈殿物を溶かしてから使用してください。(激しく振らないでください。)
- 4) FAPD2 バッファの酸化を防ぐために、使用後は直ちに密閉してください。
- 5) W1 Buffer (FAPDE 001) へ 13ml のエタノール(96-100%)を加えてください。  
W1 Buffer (FAPDE 001-1) へ 36ml のエタノール(96-100%)を加えてください。
- 6) Wash Buffer (FAPDE 001) へ 80ml のエタノール(96-100%)を加えてください。  
Wash Buffer (FAPDE 001-1) へ 200ml のエタノール(96-100%)を加えてください。
- 7) 特に明記がない場合、遠心分離操作は 14,000rpm または 10,000 × g で行ってください。

● **操作**



1. 1-5ml の細菌培養液をマイクロ遠心チューブ(お客さまでご用意ください)へ移します。
2. 1-2 分間遠心分離し、上清を捨てます。
3. 250 $\mu$  l の FAPD1 Buffer を上記のマイクロ遠心チューブに加え、ピペティングでペレットを再懸濁します。
  - \* FAPD1 Buffer を最初に開封した時に、RNase A を加えてください。
  - \* ペレットを完全に溶解させてください。
4. 250 $\mu$  l の FAPD2 Buffer を加え、5 回転倒混和し、細菌を溶菌します。その後、2 分程度室温で静置します。
  - \* ボルテックスするとゲノム DNA が切断されるのでボルテックスしないでください。必要な場合は、細胞溶解液が透明になるまで転倒混和してください。
  - \* 5 分以上ステップ 4 を継続しないでください。
5. 350 $\mu$  l の FAPD3 Buffer を加え、直ちに 5 回転倒混和し完全に混合します。  
(激しく振らないでください)
  - \* 沈殿が局在化するのを防ぐために FAPD3 Buffer 添加後直ぐに、溶液を混和します。
6. 10 分間遠心分離します。この間に FAPD Column を Collection Tube へ取り付けてください。
7. 上清を FAPD Column へアプライし、1 分間遠心分離し、ろ液を捨ててください。
  - \* ペレットをカラムへ混入させないでください。
8. 400 $\mu$  l の W1 Buffer を FAPD Column へ加えます。1 分間遠心分離し、ろ液を捨ててください。
  - \* W1 Buffer には使用前にエタノール(96-100%)を加えてください。
9. 750 $\mu$  l の Wash Buffer を FAPD Column へ加えてください。1 分間遠心分離し、ろ液を捨ててください。
  - \* Wash Buffer には使用前にエタノール(96-100%)を加えてください。
10. 3 分間遠心分離し、カラムを乾燥させます。
  - \* この操作は酵素処理を阻害する物質を取り除くための重要なステップです。
11. FAPD Column を 1.5ml の新しいチューブ(お客様でご用意ください)へ取り付けます。

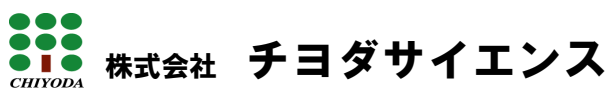
12. 50～100 $\mu$  l の Elution Buffer また ddH<sub>2</sub>O(pH7.0-8.5)を FAPD Column の中央へアプライし、1分間静置させます。  
 \* 効率よく溶出させるために重要なステップです。Elution Buffer をカラム膜中央へ加え、完全に吸着させてください。  
**重要事項:** 50 $\mu$  l より少量で溶出した場合、収量が低下する恐れがあります。
13. 1 分間遠心分離し、プラスミド DNA を溶出します。
14. プラスミド DNA は 4°Cか-20°Cで保管してください。

● **トラブルシューティング**

トラブル	原因	解法
DNA の収量が少ない	細菌細胞が完全に溶菌していない	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 細菌量が多すぎる(OD<sub>600</sub>&gt;10)ため、サンプルを複数のチューブ(3 本)に分けて処理してください。</li> <li>● FAPD3 Buffer を添加後、転倒混和で沈殿物を溶解すると収量を改善できます。</li> </ul>
	細菌の培養時間が長い	● 培養時間は 16 時間以内
	細菌細胞量が十分でない	● 最適な細菌濃度は OD <sub>600</sub> >1 です。
	DNA の溶出ステップに問題がある	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Elution Buffer をカラム基質に十分吸収させたか確認してください。</li> <li>● 10kb より大きな DNA 断片の場合は、Elution Buffer を 60-70°C程度に温めてから使用すると溶出効率が上がります。</li> </ul>
	Wash Buffer に不備がある。	● 最初に Wash Buffer を使用する際、エタノール(96-100%)を加えてください。

精製したプラスミドが他のアプリケーションで良い結果を出せない	エタノール残留物の混入	<ul style="list-style-type: none"> <li>● DNAを溶出する前に再度5分間遠心分離をおこなう、又は60°Cで5分間インキュベートしてカラムを乾燥させてください。</li> </ul>
ゲノム DNA が混入してしまう	細胞を適切に溶菌していない	<ul style="list-style-type: none"> <li>● FAPD2 Buffer を加えた後は激しく攪拌せず、チューブをゆっくり転倒させ混和します。また、5分間以上インキュベートしないでください。</li> <li>● 最適な細菌濃度を超えたサンプル量を使用しないでください。</li> </ul>
プラスミド DNA に RNA が混入してしまう	FAPD1 Buffer 中の RNase A が長期保管のために劣化	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 使用前に、FAPD1 Buffer へ RNase A を加えたことを確認してください。また RNase A を加えた FAPD1 Buffer が使用期限を過ぎている場合は、RNase A を FAPD1 Buffer へ 50µg/ml になるように追加し、4°Cに保管してください。</li> </ul>
	細菌濃度が高濃度	<ul style="list-style-type: none"> <li>● サンプル量を減らしてください。</li> </ul>
プラスミド DNA が変性している	ヌクレアーゼの混入	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 宿主細胞が endA<sup>+</sup>株のようにヌクレアーゼ活性が高い場合は、ヌクレアーゼ残留物を取り除くために、ステップ 8 で 400µl の W1 Buffer を FAPD Column へ加えた後、2分間室温でインキュベートしてください。その後、30秒間 14,000rpm または 10,000 × g で遠心分離し、ステップ 9 の洗浄ステップを続けてください。</li> </ul>
酵素処理に十分なプラスミド DNA が得られない	溶出したプラスミド DNA がエタノール残留物を含む	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Wash Buffer で洗浄後、ろ液を捨て(ステップ 9)、3分間遠心分離してください。</li> </ul>
電気泳動時、変性したプラスミド DNA が先に泳動してしまう	FAPD2 Buffer でのインキュベーション時間が長すぎる	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ステップ 4 で、5分以上 FAPD2 Buffer でインキュベートを行わないでください。</li> </ul>

日本総代理店



〒101-0032 東京都千代田区岩本町 2-13-11 TEL: 03(3864)7701 FAX: 03(3864)7752

E-mail: [technical@chiyoda-s.jp](mailto:technical@chiyoda-s.jp)

vol.0910

---

<http://www.chiyoda-s.jp>