



エンドトキシンフリー プラスミド DNA 抽出 Midi キット

# Endotoxin-Free Plasmid DNA Extraction Midi 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	7

\* 本製品は研究用です \*





エンドトキシンフリープラスミド DNA 抽出 Midi キットは 50～100 ml の細胞培養液から高純度のプラスミド DNA を経済的にかつ迅速に精製します。本キットでは、アルカリ溶解溶液と陰イオン交換樹脂を充填したカラムから構成されています。細菌を溶菌後、プラスミド DNA はカラムに吸着し、夾雑物は Wash Buffer で洗い流します。抽出したプラスミド DNA は即、トランスフェクション、in vitro 転写、翻訳、各種酵素処理などに使用できます。

#### 🚦 基本データ

サンプル	収量
60 ml の培養液 (high-copy number )	650 $\mu$ g まで
120 ml の培養液 (Low-copy number)	

#### 🚦 キットの内容

	FAPDE 002 -EF-1 (10 preps)	FAPDE 002 -EF (25 preps)
PEQ Buffer	60 ml	135 ml
PM1 Buffer	85 ml	215 ml
PM2 Buffer	85 ml	215 ml
PM3 Buffer	85 ml	215 ml
PTR Buffer	25 ml	55 ml
PW Buffer	135 ml	165 ml $\times$ 2
PEL Buffer	85 ml	215 ml
PM Midi Column	10 pcs	25 pcs
RNase A (50mg/ml)	170 $\mu$ l	430 $\mu$ l

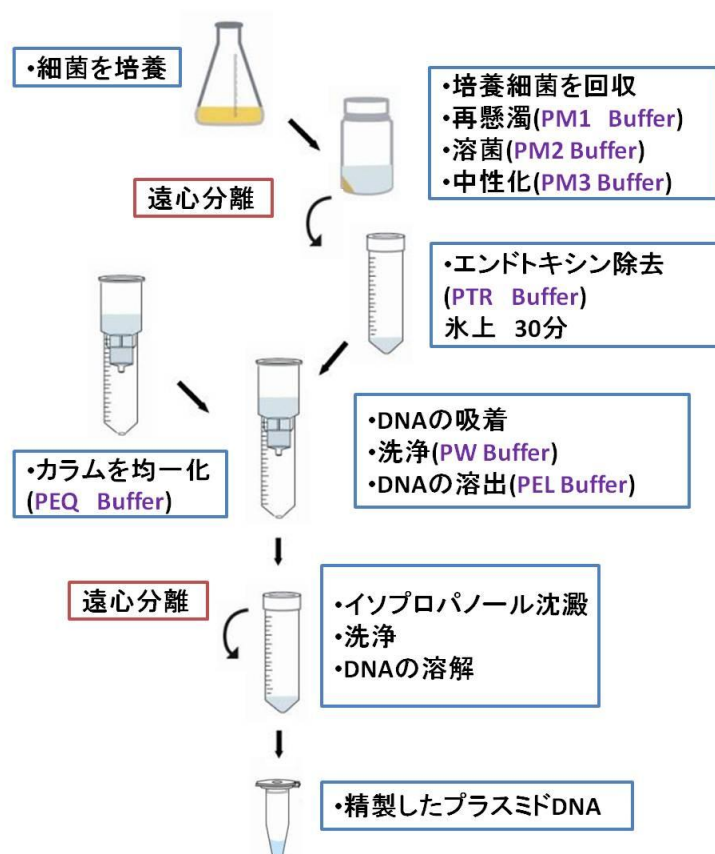
## 🌈 重要事項

- 1) RNase A を PM1 Buffer へ加えるときは、蓋の部分の水滴をスピンドウンしてから加え、その後は 4°C で保管してください。
- 2) PM2 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、37°C で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。)

## 🌈 その他 必要なもの

50ml チューブ  
イソプロパノール  
70%エタノール

## 🌈 操作



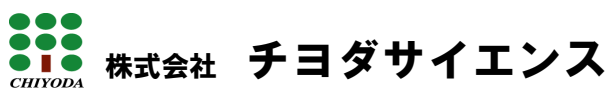
1. PM Midi Column を 50 ml の遠心用チューブに取り付け、PEQ Buffer を 5ml 加え、カラムが空になるまで静置流出して平衡化します。ろ液は捨ててください。
2. 培養液から細菌を  $6,000 \times g$  で 15 分遠心分離して回収します。
3. 8ml の PM1 Buffer (必ず RNase A を使用前に加えてください) を加え、細胞をピペティングかボルテックスで再懸濁させます。
4. 8ml の PM2 Buffer を加え、15 回ほど転倒混和します。このとき、ボルテックスはしないでください(DNA の剪断を防ぎます)。
5. 細胞溶解液が透明になるまで室温で約 3 分間インキュベートします。
6. 8ml の PM3 Buffer を加え、10 回ほど転倒混和します(ボルテックスはしないでください)。
7.  $4^{\circ}\text{C}$   $15,000 \times g$  で 20 分間遠心分離します。  
\* 遠心分離は、 $15,000 \times g$  以下で行わないでください。
8. 上清を新しい 50ml チューブへ移し、2ml の PTR Buffer を加え、10 回ほど転倒混和します。
9. 30 分間、氷上でインキュベートします。(インキュベート後のサンプルは、透明になります。)
10. サンプル溶液を平衡化した PM Midi Column へアプライします。サンプル溶液は自然落下させ、ろ液を捨てます。
11. 12ml の PW Buffer を PM Midi Column へ加え、自然落下させてろ液を捨てます。
12. PM Midi Column を新しい 50ml の遠心用チューブ(お客様でご用意ください)に装着し、8ml の PEL Buffer を加えて DNA を溶出します。
13. 6 ml のイソプロパノールを加えて DNA を沈殿させます。10 回ほどよく転倒混和します。
14.  $4^{\circ}\text{C}$   $20,000 \times g$  で 30 分間遠心分離します。  
\* 遠心分離は、 $20,000 \times g$  以下で行わないでください。
15. 上清を取り除き、DNA ペレットに 5 ml の 70%エタノール(室温)を加えます。

16. 4°C 20,000 × g で 10 分間遠心分離します。  
\* 遠心分離は、20,000 × g 以下で行わないでください。
17. 上清を取り除き、チューブが完全に乾燥するまで DNA ペレットを風乾させます。  
(または、70°Cで 10 分間インキュベートします。)
18. DNA ペレットを適量(300μ l 程度)の TE Buffer か ddH<sub>2</sub>O に溶解させます。

✚ 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>菌の濃度が濃すぎる。</li> <li>PM3 Buffer を添加後、転倒混和で沈殿物を溶解すると回収量を改善できます。</li> <li>イソプロパノール沈殿で、DNA がよく沈殿していない、または沈殿後、よく回収されていない。</li> <li>DNA ペレットが少量で溶解するのに不十分。</li> </ul>
精製したプラスミドがその後のアプリケーションで良い結果を出せない	RNA が混入している	<ul style="list-style-type: none"> <li>RNase A を PM1 Buffer に加えてください。RNase A を加えてから半年以上経過している場合は、RNaseA を追加してください。</li> <li>過剰の細胞を使用しないでください。</li> </ul>
	ゲノム DNA が混入している	<ul style="list-style-type: none"> <li>過剰の細胞を使用しないでください。</li> <li>PM2 Buffer や PM3 Buffer を加えた後は、ボルテックスせずに混和してください。</li> <li>溶菌は 5 分以上行わないでください。</li> </ul>
	DNA ペレットに過剰の塩が含まれる	<ul style="list-style-type: none"> <li>DNA ペレットを 70%のエタノールで 2 回洗浄してください</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.1005-1

---

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