



プラスミド DNA 抽出 Midi キット

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	6

本製品は研究用です



プラスミド DNA 抽出 Midi キットは細菌培養液から高純度のプラスミド DNA を迅速に精製します。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	所要時間
60 ml の培養液 (high-copy)	650 μ g まで	2 時間程度
120 ml の培養液(Low-copy)		

* 処理可能なプラスミドサイズは、100bp～10kb です。

🌈 キットの内容

	FAPDE 002 (25 preps)	FAPDE 002-1 (50 preps)
PEQ Buffer	135 ml	135 ml × 2
PM1 Buffer	215 ml	215 ml × 2
PM2 Buffer	215 ml	215 ml × 2
PM3 Buffer	215 ml	215 ml × 2
PW Buffer	165 ml × 2	165ml × 4
PEL Buffer	215 ml	215 ml × 2
RNase A (50mg/ml)	430 μ l	430 μ l × 2
PM Midi Column	25 pcs	50 pcs

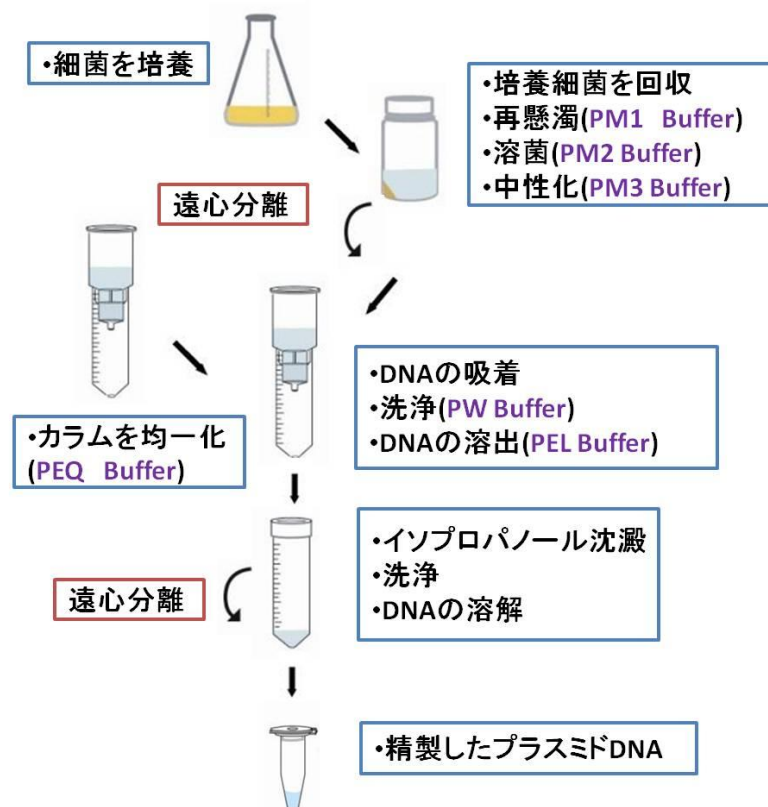
重要事項

- 1) RNase A を PM1Buffer 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、添加後は、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。

その他用意するもの

50ml チューブ
イソプロパノール
70%エタノール

操作



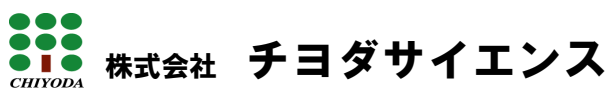
1. PM Midi Column を 50 ml の遠心用チューブに取り付け、PEQ Buffer を 5ml 加え、カラムが空になるまで静置流出して平衡化します。ろ液は捨てます。
2. 培養液から細菌を $6,000 \times g$ で 15 分遠心分離して回収します。
3. 8ml の PM1 Buffer (必ず RNase A を使用前に加えてください) を加え、細胞をピペティングかボルテックスで再懸濁させます。
4. 8ml の PM2 Buffer を加え、15 回ほど転倒混和します。このとき、DNA の剪断を防ぐため、ボルテックスはしないでください。
5. 細胞溶解液が透明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°C $15,000 \times g$ で 20 分間遠心分離します。
* $15,000 \times g$ 以下で遠心分離を行わないでください。
8. 上清を PEQ Buffer で平衡化した PM Midi Column へアプライし、上清は自然落下させ、ろ液を捨てます。
9. 12ml の PW Buffer を加え、自然落下させろ液を捨てます。
10. 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。)へ取り付け、8ml の PEL Buffer を加えて DNA を溶出します。
11. 6 ml のイソプロパノール(サンプルの 0.75 倍量)を加えて DNA を沈澱させます。
10 回ほど転倒混和します。
12. 4°C $20,000 \times g$ で 30 分間遠心分離します。
* $20,000 \times g$ 以下で遠心分離を行わないでください。
13. 上清を取り除き、DNA ペレットに 5 ml の 70%のエタノール(室温)を加えます。
14. 4°C $20,000 \times g$ で 10 分間遠心分離します。
* $20,000 \times g$ 以下で遠心分離を行わないでください

15. 上清を取り除き、チューブが完全に乾燥するまで DNA ペレットを風乾します。または、70°Cで 10 分間インキュベートします。
16. DNA ペレットを適量(300μ l 程度)の TE Buffer や ddH₂O 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"> ● 菌濃度が濃すぎる場合があります。 ● 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。 ● イソプロパノール沈澱で、DNA がよく沈殿していない、または沈澱後、よく回収されていない。 ● DNA ペレットが少量で溶解するのに不十分。
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"> ● 過剰の細胞を使用せずに、サンプル量を減らしてください。 ● 細菌を再懸濁させる時に、RNase A を PM1 Buffer に加える。RNase A を加えてから半年以上経過している場合は、RNase A を追加してください。
	ゲノム DNA が混入している	<ul style="list-style-type: none"> ● 過剰の細胞を使用しないでください。 ● 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。 ● 溶菌は 5 分以上行わないでください。
	DNA ペレットに過剰の塩が含まれる	<ul style="list-style-type: none"> ● DNA ペレットを 70%のエタノールで 2 回洗浄してください。

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

vol.1005-1

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