

Endotoxin-Free Plasmid DNA Extraction Midi Kit

Cat: FAPDE 000Midi-EF(2 回分)/FAPDE 002-EF(25 回分)

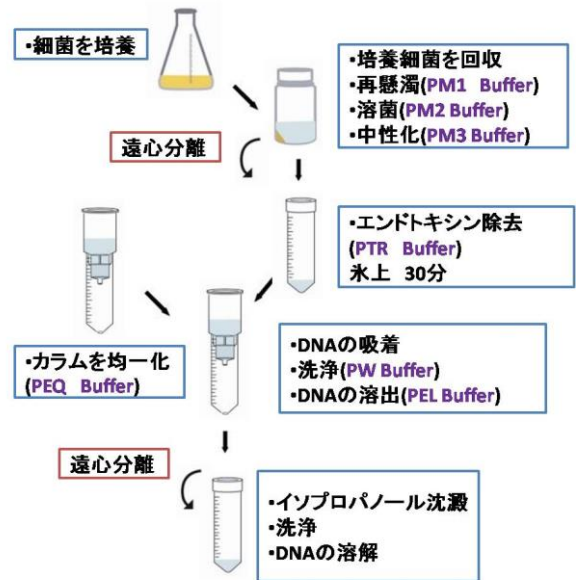
本製品は研究用です

Vol.0914

📌 キットの内容

	FAPDE 000-Midi-EF (2preps_sample)	FAPDE 002-EF (25preps)
PEQ Buffer	12ml	135ml
PM1 Buffer	20ml	215ml
PM2 Buffer	20ml	215ml
PM3 Buffer	20ml	215ml
PTR Buffer	6ml	65ml
PW Buffer	30ml	270ml+60ml
PEL Buffer	20ml	215ml
RNase A(lyophilized)	2mg	21.5mg
PM Midi Column	2 pcs	25pcs

※PM1 Buffer には RNase A を加えます。



📌 基本情報

構成	陰イオン交換樹脂カラム
サンプル量	60ml 培養液 (High-copy number) 120ml 培養液 (Low-copy number)
処理可能な プラスミドサイズ	3kbp~150kbp
結合量	650 μ g 程度
所要時間	2 時間程度

🚩 重要事項

- 1) RNase A はお客様の手元に届き次第、-20°Cで保存してください。
- 2) 0.5ml の PM1 Buffer を RNase A チューブに加え、ボルテックスで RNase A を溶解します。RNase A 溶液を全量 PM1 Buffer に添加し、再度ボルテックスします。RNase A 添加後は PM1 Buffer は 4°Cで保管してください。
- 3) PM2 Buffer に沈殿物が形成されていたら、37°Cの湯せんで Buffer を温めて沈殿物を溶かします。
- 4) 操作を始める前に PM3 Buffer を 4°Cに冷やしてください。

🚩 その他必要なもの

- 1) 50ml チューブ
- 2) 冷却機能付き高速遠心機
- 3) イソプロパノール
- 4) 70%エタノール
- 5) TE Buffer もしくはddH₂O

🚩 操作 ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

培養細菌の回収

1. 4°C 4,500~6,000 × gで 10 分遠心分離して培養細菌を回収します。上清を捨てます。

PM Midi Column の平衡化

2. PM Midi Column を 50 ml の遠心用チューブに取り付けます。
3. PEQ Buffer を 10ml 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。

溶菌と中性化

4. 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。

※PM1 Buffer の量はステップ 7 のメモ参照

5. 8ml の PM2 Buffer を加え、5 回ほど転倒混和します。

※PM2 Buffer の量はステップ 7 のメモ参照

※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。

- 細胞溶解液が透明になるまで室温で約 5 分間インキュベートします。
- 8ml の PM3 Buffer を加え、10~15 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)。

※PM3 Buffer の量はステップ 7 のメモ参照

メモ:

・培養細菌が最適な濃度か確認してください。PM1、PM2、PM3 Buffer の量は培養液量によって増やす必要があります。

例) 培養液量 60~120ml : PM1 8ml、PM2 8ml、PM3 8ml

培養液量 120~240ml : PM1 16ml、PM2 16ml、PM3 16ml

- ・PM1 Buffer 中でペレットが完全に懸濁されていることを確認してください。
- ・PM2 Buffer と PM3 Buffer を添加したらサンプル溶液をよく混ぜてください。

培養液の清澄化とエンドトキシンの除去

- 4℃ 15,000~20,000 × g で 15 分間もしくは 4℃ 5,000 × g 以上で 20 分間で遠心分離します。
※上清に懸濁物が残っている場合は、上清を遠心チューブに移しこの操作を繰り返してください。
- 上清を 50ml チューブに移します。
- 5ml の PTR Buffer を加えてピペッティングで完全に混ぜます。サンプル溶液を 30 分間氷上でインキュベートさせます。インキュベートした後、サンプルは透明になります。

プラスミド DNA の吸着

- サンプル溶液を PEQ Buffer で平衡化した PM Midi Column へアプライし、自然落下させます。ろ液は捨てます。

PM Midi Column の洗浄

- 12.5ml の PW Buffer を PM Midi Column へ加え自然落下させ、ろ液を捨てます。

プラスミド DNA の溶出

- 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 を加えてプラスミド DNA を自然落下で溶出します。

プラスミド DNA の沈殿

- 6 ml の室温のイソプロパノール(サンプルの 0.75 倍量)を加えて DNA を沈殿させます。10 回ほど転倒混和します。(ex:8ml のサンプル液に対して 6ml のイソプロパノールを加える。)

15. 4℃ 15,000~20,000×g で 15 分間もしくは 4℃ 5,000×g 以上で 20 分間で遠心分離します。
メモ:遠心分離する前に、イソプロパノールが完全に混ざっていることを確認してください。

プラスミド DNA の洗浄と溶解

16. 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。
17. 4℃ 5,000×g 以上で 10 分間遠心分離します。
18. 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℃で 10 分インキュベートします。
19. DNA ペレットを適量(300 μl 程度)の TE Buffer や ddH₂O に溶解させます。
メモ:
・上清を取り除くときに DNA ペレットを一緒に取り除かないでください。
・DNA ペレットがコレクションチューブに付着していることを確認してください。
・DNA ペレットをチューブから取り除いてしまった場合、プラスミド DNA を沈殿させる工程(ステップ 14~)を繰り返してください。
・濃度を測定する前に DNA が完全に溶解されているか確認してください。

DNA の収量が少ない	
細菌が完全に溶菌していない	<ul style="list-style-type: none"> ・過剰の細胞を使用しないでください。 ・PM3 Buffer を使用後、転倒攪拌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。 ・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"> ・PM1 Buffer 開封時に RNase A が添加されていることを確認してください。RNase A を添加し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。 ・細菌濃度が高濃度の場合、サンプル量を減らしてください。
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。 ・5 分以上、溶菌(ステップ 6)を行わないでください。
DNA ペレットに過剰な塩が含まれている	<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。