

FavorPrep™ Endotoxin-Free Plasmid Extraction Maxi Kit

Cat: FAPDE 000-Maxi-EF (2 回分) / FAPDE 003-EF (10 回分)

本製品は研究用です

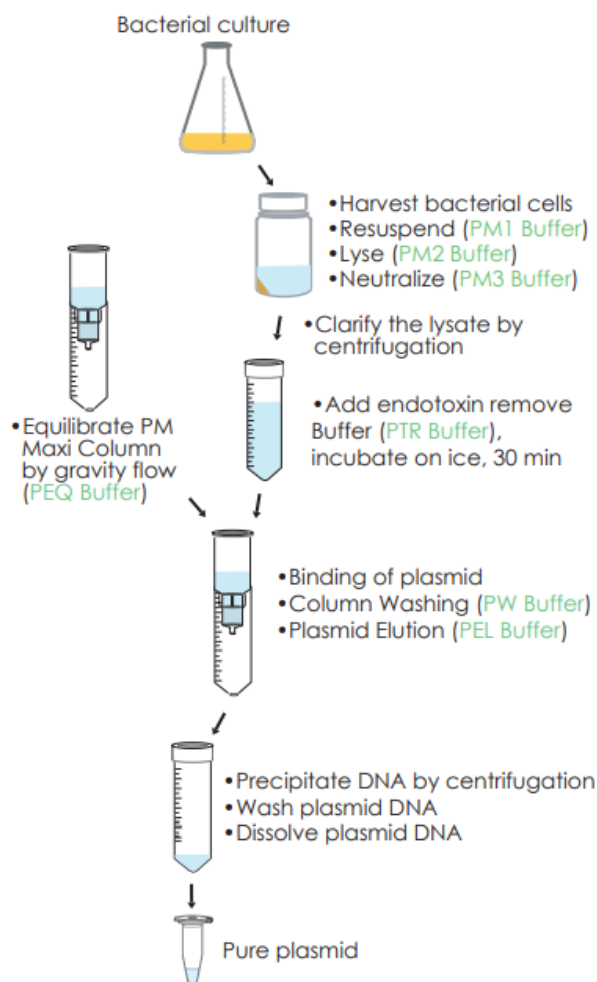
v 221122

📌 キットの内容

	FAPDE 000-Maxi-EF (2 preps_sample)	FAPDE 003-EF (10 preps)
PEQ Buffer	30 ml	135 ml
PM1 Buffer	42 ml	215 ml
PM2 Buffer	42 ml	215 ml
PM3 Buffer	42 ml	215 ml
PTR Buffer	12 ml	55 ml
PW Buffer	65 ml	270 ml+60 ml
PEL Buffer	32 ml	215 ml
RNase A (lyophilized)	4.2 mg	21.5 mg
PM Maxi Column	2 pcs	10 pcs

📌 基本情報

構成	陰イオン交換樹脂カラム
ライセートの清澄化	遠心法
サンプル量	120 ml 培養液 (High-copy number) 240 ml 培養液 (Low-copy number)
処理可能な プラスミドサイズ	3 kbp ~ 150 kbp
結合量	1.5 mg



📌 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) 0.5 ml の PM1 Buffer を RNase A のチューブに加え、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 を添加後は PM1 Buffer は 4°Cで保管してください。
- 3) PM2 Buffer に沈殿物が見られる場合、37°Cの湯せんで Buffer を温めて沈殿物を溶かしてください。
- 4) 操作を始める前に PM3 Buffer を 4°Cに冷やしてください。

🚦 その他用意するもの

- 1) 50 ml 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 Maxi Column の平衡化

2. PM Maxi Column を 50 ml チューブに取り付けます。
3. 10 ml の PEQ Buffer を加えます。カラムが空になるまで静置して平衡化し、ろ液は捨てます。

溶菌とライセートの中和

4. 16 ml の PM1 Buffer (RNase A 添加) 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 量はステップ 7 のメモ参照
5. 16 ml の PM2 Buffer を加え、5 回ほど転倒混和します。
* PM2 Buffer 量はステップ 7 のメモ参照
* DNA の剪断を防ぐため、ボルテックスはしないでください。
6. ライセートが透明になるまで室温で 5 分間インキュベートします。
7. 16 ml の冷やした PM3 Buffer を加え、すぐに 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 量は下記メモ参照

メモ: ライセートが最適な濃度か確認してください。PM1, PM2, PM3 の Buffer 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 120~240 ml : PM1 16 ml, PM2 16 ml, PM3 16 ml

培養液量 240~480 ml : PM1 32 ml, PM2 32 ml, PM3 32 ml

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 の添加後、サンプル溶液を十分に混ぜてください。

ライセートの清澄化 および エンドキシンの除去

8. 4°C、≥5,000 × g で 20 分間遠心分離します。(15,000~20,000 × g で 15 分間が望ましい)
* 上清に浮遊物が残っている場合は、新しい 50 ml チューブに移してこの操作を繰り返してください。
9. 上清を新しい 50 ml チューブに移します。

10. 5 ml の PTR Buffer を加えてピペティングで混和し、氷上で 30 分間インキュベートします。サンプル混合物が透明になったことを確認してください。

プラスミド DNA の結合

11. サンプル混合物の半分を、平衡化した PM Maxi Column へ移します。自然落下させ、ろ液は捨てます。
12. 残りの半分についてもステップ 11 を繰り返します。

PM Maxi Column の洗浄

13. 30 ml の PW Buffer を PM Maxi Column に加えます。自然落下させ、ろ液は捨てます。

溶出

14. PM Maxi Column を新しい 50 ml チューブ(お客様でご用意ください) に取り付けます。15 ml の PEL Buffer を加え、自然落下させてプラスミドを溶出します。

プラスミド DNA の沈殿

15. 溶出液に対し 0.75 倍の室温のイソプロパノールを加え、10 回転倒混和します。
例) 15 ml の溶出液に 11.25 ml のイソプロパノールを加える
16. 4°C、 $\geq 5,000 \times g$ で 30 分間遠心分離します。(15,000~20,000 $\times g$ で 20 分間が望ましい)
メモ:遠心分離前に、溶出液とイソプロパノールが十分に混和し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

17. 上清を取り除き、ペレット化したプラスミドを 5 ml の室温の 70%のエタノールで洗浄します。
18. 4°C、 $\geq 5,000 \times g$ で 10 分間遠心分離します。
19. 上清を取り除き、ペーパータオル上で 3 分間チューブを反転させ、残留エタノールを除去します。その後、完全に乾くまでペレット化したプラスミドを風乾 (もしくは 70°C で 10 分間インキュベート) させます。
20. ペレット化したプラスミドを適量 ($\geq 300 \mu l$) の TE Buffer または ddH₂O に溶解させます。
メモ:上清を取り除く際、DNA ペレットと一緒に取り除かないように注意してください。
ペレット化したプラスミドが遠心チューブに軽く付着していることを確認してください。
ペレット化したプラスミドをチューブから取り除いてしまった場合は、沈殿工程 (ステップ 14 以降) を繰り返してください。
DNA が完全に溶解されていることを確認してから、濃度を測定してください。

✚ トラブルシューティング

DNA の収量が少ない	
培養細菌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。 ・DNA が十分に沈殿していない、または沈殿後十分に回収されていない。 ・DNA ペレットが少量で溶解するのに不十分。
精製した DNA がその後のアプリケーションで正しく機能しない	
RNA が混入している	<ul style="list-style-type: none"> ・PM1 Buffer の開封時に 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 および PM3 Buffer の添加後は、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。
ペレット化したプラスミドに過剰な塩が含まれている	<ul style="list-style-type: none"> ・ペレット化したプラスミドを 70%エタノールで 2 回洗浄してください。