

## FavorPrep™ 96-Well Plasmid Kit

Cat: FAPWE 96001 (1 回分) / FAPWE 96002 (2 回分) / FAPWE 96004 (4 回分)

本製品は研究用です

v 221117

### 📦 キットの内容

	FAPWE 96001 (1 prep)	FAPWE 96002 (2 preps)	FAPWE 96004 (4 preps)
FAPD1 Buffer	30 ml	65 ml	130 ml
FAPD2 Buffer	30 ml	65 ml	130 ml
FAPD3 Buffer	40 ml	85 ml	175 ml
Wash Buffer (concentrated)*	15 ml	35 ml	35 ml × 2
Elution Buffer	15 ml	30 ml	65 ml
RNase A (lyophilized)	3 mg	6.5 mg	13 mg
Filter Plate (96-Well Plasmid Binding Plate)	1 plate	2 plates	4 plates
Collection Plate (96-Well 2ml Plate)	3 plates	6 plates	12 plates
Elution Plate (96-Well PCR Plate)	1 plate	2 plates	4 plates
Adhesive Film	4 pcs	8 pcs	16 pcs
<b>*添加する 96-100%エタノール量</b>			
Wash Buffer (concentrated)	60 ml	140 ml	140 ml × 2

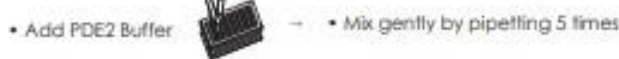
### 📦 基本情報

構成	シリカメンブレン (フィルタープレート)
サンプル量	1-5 ml /preparation
所要時間	60 分以内 /96 preparations
結合量	最大 60 $\mu$ g /well
溶出量	50-75 $\mu$ l
方法	遠心法 もしくは 吸引法

• **STEP 1. Collect bacterial cells and resuspend the cells**



• **STEP 2. Lysis**



• **STEP 3. Neutralization**



• **STEP 4. Clarify lysate**



• **STEP 5. Bind plasmid to Filter Plate:**

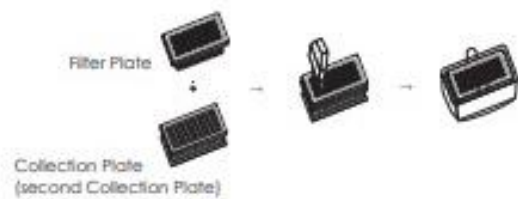
**Vacuum processing**

- Transfer the supernatant to Filter plate.
- Apply -12 inches Hg vacuum until the wells have emptied.



**Centrifuge processing**

- Transfer the supernatant to Filter plate.
- Centrifuge at 4,500 ~ 6,000 x g for 2 min.



• **STEP 6. Wash the Filter Plate and dry the membrane of the Filter Plate**

- Add Wash Buffer.
- Apply vacuum at -12 inches Hg for 2 min.
- Tap the Filter Plate lips on paper towel
- Return the Filter Plate and the Collection Plate to the manifold.
- Apply vacuum at -12 inches Hg for an additional **10 min**.

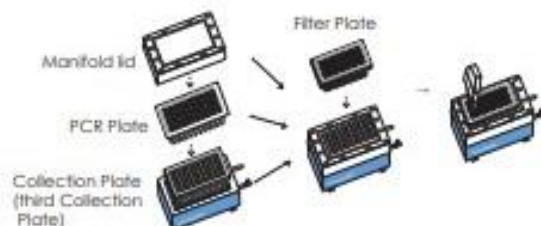


- Add Wash Buffer.
- Centrifuge at 5,600 ~ 6,000 x g for **10 min**
- Stand the Filter plate on a clean paper towel at room temperature for **5 min**.

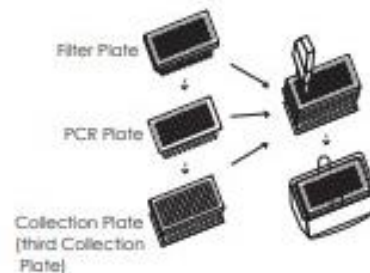


• **STEP 7. Plasmid Elution:**

- Add Elution Buffer or ddH<sub>2</sub>O to the Filter Plate. Stand for 3 min.
- Close the manifold valve. Turn on the vacuum source to build up a vacuum to -12 inches Hg.
- Open the manifold valve to apply vacuum to elute plasmid.
- Alternative:** If the consistent volume of elutes are recommend, use centrifuge protocol to process this elution step. (STEP 7-A ~7-D).



- Add Elution Buffer or ddH<sub>2</sub>O to the Filter Plate. Stand for 3 min.
- Centrifuge to elute plasmid.



### 🌈 重要事項

1. RNase A はお客様の手元に届き次第、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存してください。
2. 作業はゴム手袋、白衣を着用して行ってください。
3. Buffer を安全に取り扱うために、手順を開始する前に安全情報（製品付属の英語版プロトコール）をお読みください。
4. FAPD2 Buffer に沈殿物が形成されていたら、 $60^{\circ}\text{C}$ の湯せんで5分温めてください。
5. FAPD1 Buffer は使用前に以下の手順で調製してください。  
0.5 ml の FAPD1 Buffer を RNase A チューブに加え、ボルテックスで十分に溶解します。その後 RNase A 溶液を FAPD1 Buffer 全量に添加し、 $4\sim 8^{\circ}\text{C}$ で保管します。
6. Wash Buffer 開封時にエタノール（96～100%）を添加してください。

### 🌈 用意するもの

全プロトコール共通

- 1) 滅菌済みのピペット、ピペットチップ
- 2) エタノール（96-100%）
- 3)  $5,600\sim 6,000 \times g$  に到達可能なスイングバケット式遠心機、96-Well Plate 対応のアダプター  
吸引法を用いる場合
- 4) 96-Well Plate 対応のバキュームマニホールド、 $-12\text{inHg}$  に到達可能な真空ポンプ

### 🌈 操作 ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

<吸引法>

STEP 1. サンプルの採集と再懸濁

- 1-1. 最大 2 ml のサンプルを Collection Plate（キットに付属）の各ウェルに移します。
- 1-2. Adhesive Film（キットに付属）で封をし、 $5,600\sim 6,000 \times g$  で3分間遠心分離します。2 ml 以上のサンプルを使用する場合は複数回に分けて 1-1 と 1-2 を再度繰り返します。  
メモ：サンプル量は 5 ml を超えないよう調整してください。
- 1-3.  $250 \mu\text{l}$  の FAPD1 Buffer（RNase A 添加）を加え、ピペッティングでペレットを再懸濁します。  
\* 再懸濁ではペレットを完全に溶解させてください。

STEP 2. 溶解

- 2-1.  $250 \mu\text{l}$  の FAPD2 Buffer を加え、直ちにピペッティングで5回混和します。
- 2-2. その後、ライセートが透明になるまで室温で3～5分間静置します。

STEP 3. 中和

- 3-1.  $350 \mu\text{l}$  の FAPD3 Buffer を加え、直ちにピペッティングで混和します。  
\* サンプル混合物が完全に混ざっていることを確認してください。

#### STEP 4. ライセートの清澄化

4-1. 新しい Adhesive Film (キットに付属) で封をし、4,500~6,000 × g で 10 分間遠心分離します。

#### STEP 5. プラスミドの吸着

5-1. 新しい Collection Plate (キットに付属、2 枚目) をバキュームマニホールドに取り付け、カバーで固定します。

その上に Filter Plate (キットに付属) を取り付けます。

5-2. サンプル混合物を Filter Plate に移し、1 枚目の Collection Plate を捨てます。

5-3. ウェルが空になるまで-12inHg で真空引きをします。

5-4. バキュームマニホールドを真空から解放します。

5-5. ろ液を捨て、Filter Plate と Collection Plate をバキュームマニホールドに戻します。

#### STEP 6. Filter Plate の洗浄と乾燥

6-1. Filter Plate の各ウェルに 650 μl の Wash Buffer (エタノール添加) を加えます。

6-2. -12inHg で 2 分間真空引きをします。

6-3. バキュームマニホールドを真空から解放し、ろ液を捨てます。Filter Plate と Collection Plate をバキュームマニホールドに戻します。

6-4. Filter Plate の先端を清潔なペーパータオルで軽くたたき、残った液体を取り除きます。Filter Plate を Collection Plate に戻します

6-5. さらに 10 分間、-12inHg で真空引きをします。

6-6. バキュームマニホールドを真空から解放し、ろ液と 2 枚目の Collection Plate を捨てます。

#### STEP 7. プラスミドの溶出

代替方法: 一定量の溶出液が推奨される場合は、<遠心法>の 7-A~7-D の方法で溶出してください。

7-1. Elution Plate (キットに付属) を新しい Collection Plate (キットに付属、3 枚目) に取り付けます。バキュームマニホールドにカバーで固定し、その上に Filter Plate を取り付けます。(上: Filter Plate 中: Elution Plate 下: Collection Plate)

7-2. 50~75 μl の Elution Buffer または ddH<sub>2</sub>O を Filter Plate の膜中央に加え、3 分間静置します。

メモ: 溶出液は Elution Buffer の添加量よりも平均で約 25 μl 少なくなります。

例) 50 μl の Elution Buffer に対して~25 μl の溶出液が回収できます。

メモ: 50 μl 以下の Elution Buffer または ddH<sub>2</sub>O で溶出ししないでください。収量が減少する恐れがあります。

メモ: 効果的な溶出のため、Elution Buffer または ddH<sub>2</sub>O が完全に吸着したことを確認してください。

7-3. バキュームマニホールドのバルブを閉じ、-12inHg で真空引きをします。

7-4. バルブを開き、DNA を溶出します。

7-5. バキュームマニホールドを真空から解放します。

7-6. Elution Plate を取り出し、Adhesive Film (キットに付属) で封をします。精製後のプラスミドは-20°Cで保管します。

### <遠心法>

#### STEP 1. サンプルの採集と再懸濁

1-1. 最大 2 ml のサンプルを Collection Plate (キットに付属) の各ウェルに移します。

1-2. Adhesive Film で封をし、5,600~6,000 × g で 3 分間遠心分離します。2 ml 以上のサンプルを使用する場合は複数回に分けて 1-1 と 1-2 を再度繰り返します。

メモ: サンプル量は 5 ml を超えないよう調整してください。

1-3. 250 μl の FAPD1 Buffer (RNase A 添加) を加え、ピペッティングでペレットを再懸濁します。

\* 再懸濁ではペレットを完全に溶解させてください。

#### STEP 2. 溶解

2-1. 250 μl の FAPD2 Buffer を加え、直ちにピペッティングで 5 回混和します。

2-2. その後、ライセートが透明になるまで室温で 3~5 分間静置します。

#### STEP 3. 中和

3-1. 350 μl の FAPD3 Buffer を加え、直ちにピペッティングで混和します。

\* サンプル混合物が完全に混ざっていることを確認してください。

#### STEP 4. ライセートの清澄化

4-1. 新しい Adhesive Film (キットに付属) で封をし、4,500~6,000 × g で 10 分間遠心分離します。

#### STEP 5. プラスミドの吸着

5-1. Filter Plate (キットに付属) を新しい Collection Plate (キットに付属、2 枚目) に取り付けます。

5-2. サンプル混合物を Filter Plate に移し、1 枚目の Collection Plate を捨てます。

5-3. 組み合わせたプレートを 5,600~6,000 × g で 2 分間遠心分離します。

5-4. ろ液を捨て、Filter Plate を Collection Plate に戻します。

#### STEP 6. Filter Plate の洗浄と乾燥

6-1. Filter Plate の各ウェルに 650 μl の Wash Buffer (エタノール添加) を加えます。

6-2. 組み合わせたプレートを 5,600~6,000 × g で 10 分間遠心分離します。

6-3. Filter Plate を清潔なペーパータオルの上に置き、室温で 5 分間静置します。

#### STEP 7. プラスミドの溶出

7-A. Elution Plate (キットに付属) を新しい Collection Plate (キットに付属、3 枚目) に取り付け、その上に Filter Plate を取り付けます。(上: Filter Plate 中: Elution Plate 下: Collection Plate)

7-B. 50~75 μl の Elution Buffer または ddH<sub>2</sub>O を Filter Plate の膜中央に加え、3 分間静置します。

メモ: 溶出液は Elution Buffer の添加量よりも平均で約 25 μl 少なくなります。

例) 50 μl の Elution Buffer に対して ~25 μl の溶出液が回収できます。

メモ: 50 μl 以下の Elution Buffer または ddH<sub>2</sub>O で溶出ししないでください。収量が減少する恐れがあります。

メモ: 効果的な溶出のため、Elution Buffer または ddH<sub>2</sub>O が完全に吸着したことを確認してください。

7-C. 組み合わせたプレートを 5,600~6,000 × g で 5 分間遠心分離します。

7-D. Elution Plate を取り出し、Adhesive Film (キットに付属) で封をします。精製後のプラスミドは-20°Cで保管します。

### ✚ トラブルシューティング

DNA の収量が少ない	
細菌細胞が完全に溶解していない	<ul style="list-style-type: none"> <li>・菌濃度が濃すぎる場合があります。</li> <li>・FAPD3 Buffer を添加後、ピペッティングで沈殿物を溶解すると回収量を改善できます。</li> </ul>
細菌細胞の増殖	インキュベート時間は 16 時間を超えないようにしてください。
菌体の不足	適切な振とうモードで培養した後、細菌細胞が予想される量 (OD600 > 1) まで増殖していることを確認してください。
溶出が不適切	<ul style="list-style-type: none"> <li>・Elution Buffer または ddH<sub>2</sub>O が添加され、Filter Plate の膜中央に吸着していることを確認します。</li> <li>・DNA 断片のサイズが 10 kb より大きい場合、溶出効率を向上させるために、60 ~ 70°C に予熱した Elution Buffer または ddH<sub>2</sub>O を使用してください。</li> </ul>
Wash Buffer の調製が正しくない	使用前に正しい量のエタノール (96-100%) が添加されていることを確認してください。
乾燥が不十分なため、カラムに残留エタノールが存在する	STEP 6 で Filter Plate の乾燥が正しく行われていることを確認してください。
ゲノム DNA が混入している	
ライセートの調製が不適切	<ul style="list-style-type: none"> <li>・STEP 2 で FAPD2 Buffer を加えた後、サンプル混合物を上下に軽くピペッティングして十分に混和し、5 分以上インキュベートしないでください。</li> <li>・培養しすぎた細菌は使用しないでください。</li> </ul>
RNA が混入している	
長期保存による FAPD1 Buffer 中の RNase A の活性不良	<ul style="list-style-type: none"> <li>・FAPD1 Buffer に RNase A が添加されていることを確認してください。RNase A 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。</li> <li>・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。</li> </ul>