

## FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit

Cat: FAPDE 000 Mini (4 回分) / FAPDE 001 (100 回分) / FAPDE 001-1 (300 回分)

本製品は研究用です

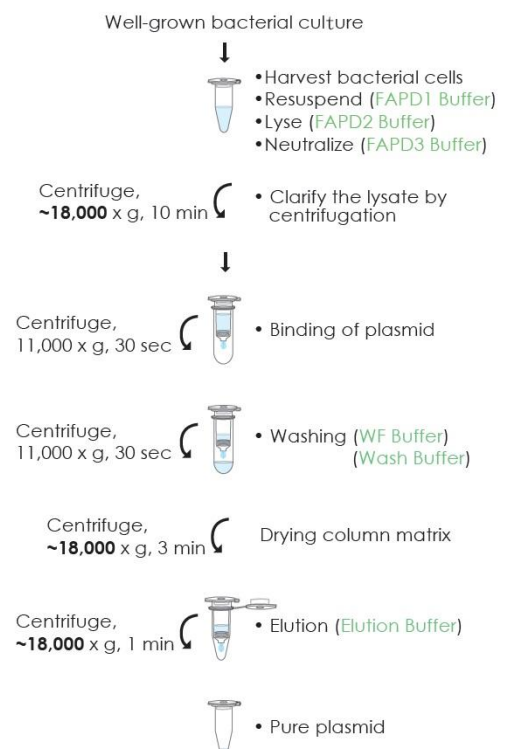
v 202309

### 📦 キットの内容

	FAPDE 000-Mini (4 preps)	FAPDE 001 (100 preps)	FAPDE 001-1 (300 preps)
FAPD1 Buffer**	1.5 ml	30 ml	90 ml
FAPD2 Buffer	1.5 ml	30 ml	90 ml
FAPD3 Buffer	1.5 ml	40 ml	120 ml
WF Buffer*	1.3 ml	35 ml	98 ml
Wash Buffer*	1.0 ml	20 ml	50 ml
Elution Buffer	0.5 ml	15 ml	35 ml
FAPD Column	4 pcs	100 pcs	300 pcs
Collection Tube	4 pcs	100 pcs	300 pcs
RNase A Solution	10 $\mu$ l	75 $\mu$ l	200 $\mu$ l
<b>*添加する 96~100%エタノール量</b>			
WF Buffer	0.5 ml	13 ml	36 ml
Wash Buffer	4 ml	80 ml	200 ml
<b>**添加する RNase A 量</b>			
FAPD1 Buffer	3 $\mu$ l	60 $\mu$ l	180 $\mu$ l

### 📦 基本情報

構成	Mini スピニングカラム(シリカメンブレン)
サンプル量	1~5 ml
プラスミドサイズ	< 15 Kb
所要時間	< 25 分
収量	25~40 $\mu$ g
結合量	60 $\mu$ g/column
方法	遠心法 もしくは 吸引法



### 🚩 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) FAPD1 Buffer に RNase A を加えてください。十分に混和し、FAPD1 Buffer を  $4^{\circ}\text{C}$ で保管してください。
- 3) FAPD2 Buffer に沈殿物が見られる場合、 $37^{\circ}\text{C}$ の湯せんで Buffer を温めて沈殿物を溶かしてください。
- 4) WF Buffer と Wash Buffer は開封時に 96~100%エタノール(お客様でご用意ください)を添加してください。
- 5) 遠心分離は  $11,000\sim 18,000 \times g$ で行ってください。

### 🚩 操作 ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

1. 1~5 ml の細菌培養液を 1.5 ml チューブ(お客さまでご用意ください)へ移します。
2.  $11,000 \times g$ で1分間遠心分離し、上清を捨てます。
3. 250  $\mu\text{l}$  の FAPD1 Buffer (RNase A 添加)を加え、ピペティングでペレットを再懸濁します。
  - \* FAPD1 Buffer に RNase A が添加されていることを確認してください。
  - \* 再懸濁ではペレットを完全に溶解させてください。
4. 250  $\mu\text{l}$  の FAPD2 Buffer を加えます。5~10 回転倒混和し、細菌を溶解します。その後、2~5 分程度室温で静置します。
  - \* ゲノム DNA が切断されるため、ボルテックスしないでください。必要な場合は、サンプル混合液が透明になるまで転倒混和し続けてください。
  - \* 5 分以上ステップ 4 を継続しないでください。
5. 350  $\mu\text{l}$  の FAPD3 Buffer を加えます。直ちに 5~10 回転倒混和し、完全に中和します。
  - \* 沈殿が局在化するのを防ぐため、FAPD3 Buffer 添加後は直ちに混和してください。
6. 最大速度( $\sim 18,000 \times g$ )で10分間遠心分離します。この間に FAPD Column を Collection Tube へ取り付けてください。
7. 上清を FAPD Column へ加え、 $11,000 \times g$ で30秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FAPD Column を Collection Tube に戻します。
  - \* ペレットを混入させないでください。
8. 400  $\mu\text{l}$  の WF Buffer を FAPD Column へ加え、 $11,000 \times g$ で30秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FAPD Column を Collection Tube に戻します。
  - \* WF Buffer にエタノール(96~100%)が添加されていることを確認してください。

9. 700  $\mu$ l の Wash Buffer を FAPD Column へ加え、11,000  $\times$  g で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FAPD Column を Collection Tube へ戻します。  
\* Wash Buffer にエタノール (96~100%) が添加されていることを確認してください。
10. 最大速度 (~18,000  $\times$  g) でさらに 3 分間遠心分離し、カラムを乾燥させます。  
重要ステップ! : この操作は酵素処理を阻害する物質を取り除くために必要です。
11. FAPD Column を新しい 1.5 ml チューブ (お客様でご用意ください) へ取り付けます。
12. 50~100  $\mu$ l の Elution Buffer または ddH<sub>2</sub>O を FAPD Column の膜中央へ加え、1 分間静置します。  
重要ステップ! : 効率よく溶出させるため、Elution Buffer が完全に吸着したことを確認してください。  
メモ: 50  $\mu$ l より少量で溶出しないでください。収量が低下する恐れがあります。
13. 最大速度 (~18,000  $\times$  g) で 1 分間遠心分離します。溶出したプラスミド DNA は -20°C で保管してください。

#### ✚ 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"> <li>・OD<sub>600</sub>&gt;10 の場合は、サンプルを複数のチューブに分けて処理してください。</li> <li>・FAPD3 Buffer を添加後、転倒混和で沈殿物を溶解すると収量を改善できます。</li> </ul>
細菌の培養時間が長い	培養時間は 16 時間以内にしてください。
サンプル量が十分でない	最適な細菌濃度は OD <sub>600</sub> >1 です。
DNA の溶出操作が不適切	Elution Buffer をカラムの膜中心に十分に吸着させてください。
DNA の溶出が不完全	10 kb より大きな DNA 断片の場合は、Elution Buffer を 60~70°C 程度に温めてから使用すると溶出効率が上がります。
WF Buffer と Wash Buffer に不備がある	WF Buffer と Wash Buffer の使用前に加えるエタノール (96~100%) 量が正しいことを確認してください。
精製したプラスミドが他のアプリケーションで良い結果を出せない	
エタノールが残留している	DNA を溶出する前に再度、最大速度 (~18,000 $\times$ g) で 5 分間遠心分離を行う、もしくは 60°C で 5 分間インキュベートしてカラムを乾燥させてください。
ゲノム DNA が混入してしまう	
細胞を適切に溶菌していない	<ul style="list-style-type: none"> <li>・FAPD2 Buffer を加えた後はゆるやか転倒混和します。</li> <li>また、5 分以上インキュベートしないでください。</li> <li>・最適な細菌濃度を超えたサンプル量を使用しないでください。</li> </ul>

RNA が混入してしまう	
FAPD1 Buffer 中の RNase A が長期保管のために劣化	<ul style="list-style-type: none"> <li>・FAPD1 Buffer へ RNase A を加えたことを確認してください。</li> <li>・RNase A Solution は-20°Cで保管してください。</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>
プラスミド DNA が変性している	
ヌクレアーゼの混入	<p>宿主細胞が endA<sup>+</sup>株のようにヌクレアーゼ活性が高い場合は、ヌクレアーゼ残留物を取り除くために、追加で下記の洗浄ステップを実施してください。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>a) ステップ 8 で 400 μl の WF Buffer を FAPD Column へ加えた後、2 分間室温でインキュベートしてください。</li> <li>b) その後、~18,000 × g で 30 秒間遠心分離します。</li> <li>c) ステップ 9 の洗浄ステップを続けてください。</li> </ol>
酵素処理に十分なプラスミド DNA が得られない	
溶出したプラスミド DNA がエタノール残留物を含む	ステップ 9 でろ液を捨てた後、ステップ 10 で 3 分間遠心分離してください。
電気泳動時、変性したプラスミド DNA が先に泳動してしまう	
FAPD2 Buffer でのインキュベーション時間が長すぎる	5 分以上 FAPD2 Buffer でインキュベートを行わないでください。