

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 202309

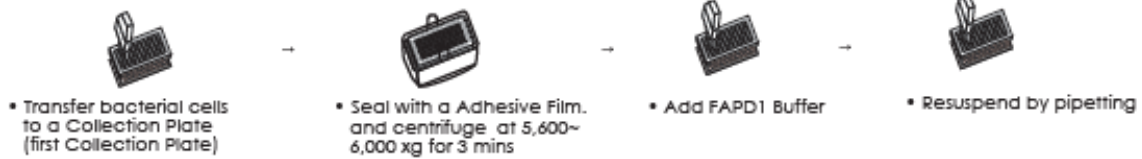
📦 キットの内容

	FAPWE 96001 (1 plate)	FAPWE 96002 (2 plates)	FAPWE 96004 (4 plates)
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* (concentrate)	15 ml	35 ml	35 ml × 2
Elution Buffer	15 ml	30 ml	65 ml
RNase A Solution	75 μl	170 μl	170 μl × 2
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
*添加する 96-100%エタノール量			
Wash Buffer	60 ml	140 ml	140 ml
**添加する RNase A 量			
FAPD1 Buffer	60 μl	130 μl	260 μl

📦 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 μg/well
溶出量	50~75 μl
方法	遠心法 もしくは 吸引法

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



• **STEP 2. Lysis**

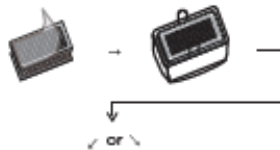


• **STEP 3. Neutralization**



• **STEP 4. Clarify lysate**

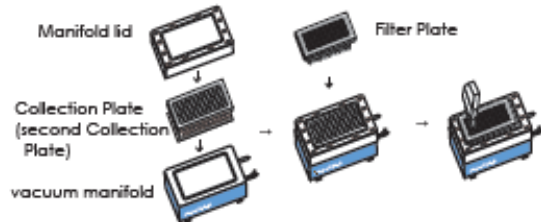
- Seal with a Adhesive Film.
- Centrifuge at 5,600~6,000 xg for 10 mins



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

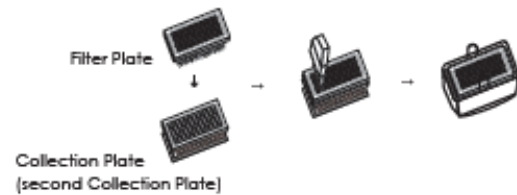
Vacuum processing

- 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 5,600~6,000 xg for 2 mins.



• **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 mins.
- Tap the Filter Plate tips on paper towel.
- Return the Filter Plate and the Collection Plate to the manifold.
- Apply vacuum at -12 inches Hg for an additional 10 mins.

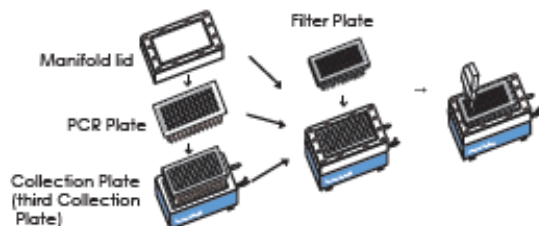


- Add Wash Buffer.
- Centrifuge at 5,600~6,000 xg for 10 mins.
- Stand the Filter plate on a clean paper towel at room temperature for 5 mins.

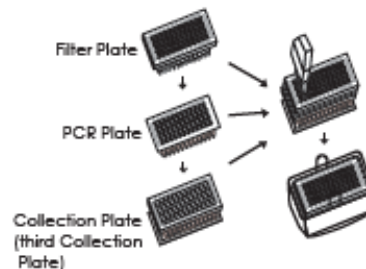


• **STEP 7. Plasmid Elution**

- Add Elution Buffer or ddH₂O to the Filter Plate. Stand for 3 mins.
- 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 ddH₂O to the Filter Plate. Stand for 3 mins.
- Centrifuge to elute plasmid.



🚩 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. 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°C の湯せんで5分温めてください。
5. FAPD1 Buffer 開封時に RNase A Solution を加えてください。十分に混和し、 $4\sim 8^{\circ}\text{C}$ で保管してください。
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) 5,600～6,000 × 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、 -12inHg 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、5,600～6,000 × 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. 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 ddH₂O 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 ddH₂O で溶出しないでください。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 ddH₂O 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、5,600~6,000 × 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 ddH₂O 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 ddH₂O 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 ddH₂O 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"> ・菌濃度が濃すぎる場合があります。 ・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。
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"> ・Elution Buffer または ddH₂O 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。 ・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 ddH₂O を使用してください。
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"> ・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。 ・培養しすぎた細菌は使用しないでください。
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"> ・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 Solution は-20°Cで保管してください。 ・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。