

FavorPrep™ Endotoxin-Free Plasmid Extraction Midi Kit

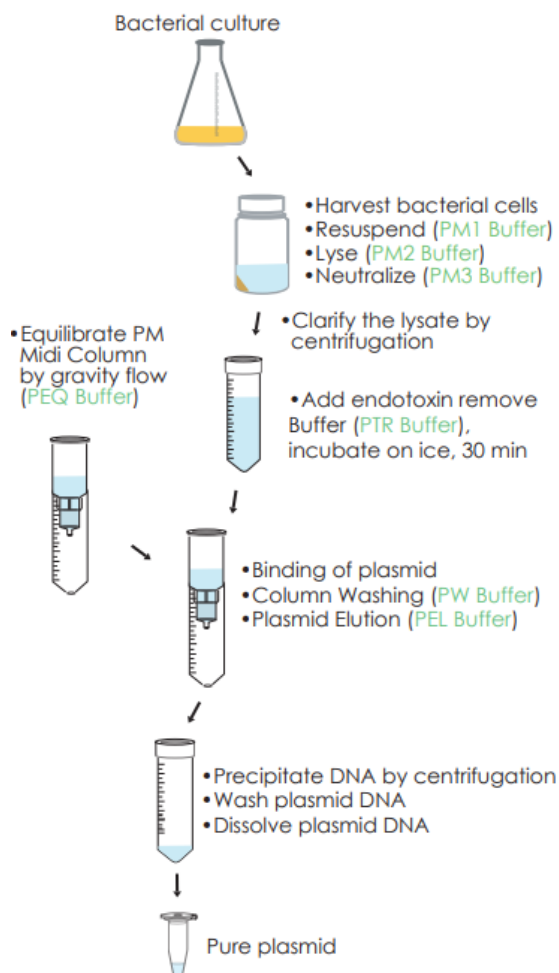
Cat: FAPDE 000-Midi-EF (2 回分) / FAPDE 002-EF (25 回分)

本製品は研究用です

v 221122

📌 キットの内容

	FAPDE 000-Midi-EF (2 preps_sample)	FAPDE 002-EF (25 preps)
PEQ Buffer	12 ml	135 ml
PM1 Buffer	20 ml	215 ml
PM2 Buffer	20 ml	215 ml
PM3 Buffer	20 ml	215 ml
PTR Buffer	6 ml	65 ml
PW Buffer	30 ml	270 ml+60 ml
PEL Buffer	20 ml	215 ml
RNase A (lyophilized)	2 mg	21.5 mg
PM Midi Column	2 pcs	25 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	60 ml 培養液 (High-copy number) 120 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	650 μg

📌 重要事項

- 1) RNase A はお客様の手元に届き次第、-20℃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 添加後は PM1 Buffer は 4℃で保管してください。
- 3) PM2 Buffer に沈殿物が見られる場合、37℃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℃に冷やしてください。

その他必要なもの

- 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、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 チューブに取り付けます。
3. 5 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. 8 ml の PM1 Buffer (RNase A 添加) を加え、細胞をピペッ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. 8 ml 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
* 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. 8 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 の量はステップ 7 のメモ参照

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 60～120ml : PM1 8 ml, PM2 8 ml, PM3 8 ml

培養液量 120～240ml : PM1 16 ml, PM2 16 ml, PM3 16 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. 2.5 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. サンプル混合物を平衡化した PM Midi Column へ移します。自然落下させ、ろ液は捨てます。

PM Midi Column の洗浄

12. 12.5 ml の PW Buffer を PM Midi Column へ加えます。自然落下させ、ろ液は捨てます。

プラスミド DNA の溶出

13. PM Midi 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。8 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

14. 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) 8 ml の溶出液に 6 ml のイソプロパノールを加える
15. 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

16. 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。
17. 4°C、 $\geq 5,000 \times g$ で 10 分間遠心分離します。
18. 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。
19. 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。