

## 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 202504

※本取扱説明書は RNase A 付属量の変更後の製品に対応しています。(2025 年 5 月以降順次切り替え)

必ず、お手元にある製品の RNase A Solution の容量をご確認ください。

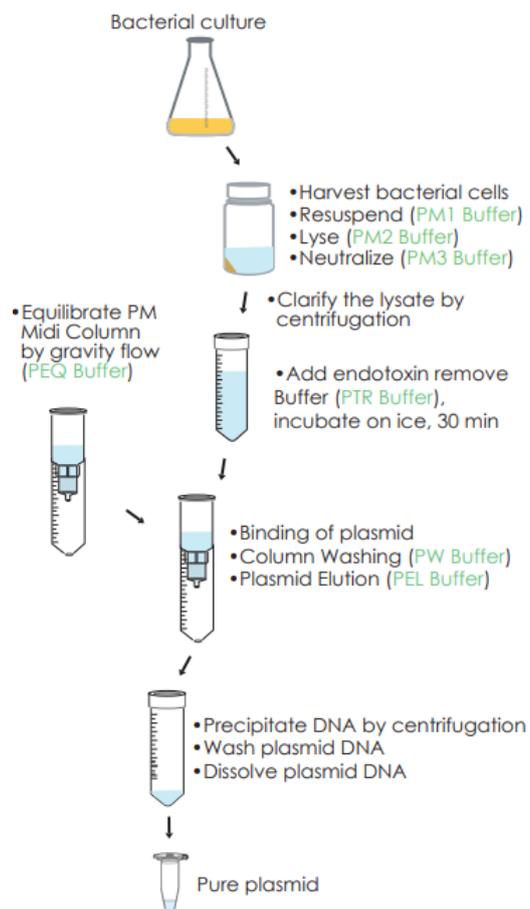
下表と異なる場合は型番とロット番号をご記載の上、メール(technical@chiyoda-s.jp)にてご請求ください。

### ● キットの内容

	FAPDE 000-Midi-EF (2 preps)	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 Solution	100 μl	900 μl
PM Midi Column	2 pcs	25 pcs
<b>*添加する RNase A 量</b>		
PM1 Buffer	80 μl	860 μl

### ● 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	60~120 ml (high-copy number/low-copy number)
プラスミドサイズ	3 kbp~150 kbp
結合量	650 μg/Midi Column



● **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。  
※RNase A (lyophilized) は調製が必要です。対応する取扱説明書をご確認ください。
- 2) PM1 Buffer に RNase A を加えてください。十分に混和し、PM1 Buffer を  $4^{\circ}\text{C}$ で保管してください。
- 3) PM2 Buffer に沈殿物が見られる場合、 $37^{\circ}\text{C}$ の湯せんで Buffer を温めて沈殿物を溶かしてください。
- 4) 操作を始める前に PM3 Buffer を  $4^{\circ}\text{C}$ 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 ( $\geq 5,000 \times g$ ) と遠心チューブ
- 3) イソプロパノール
- 4) 70%エタノール
- 5) TE Buffer もしくは ddH<sub>2</sub>O

● **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.  $4^{\circ}\text{C}$ 、 $4,500 \sim 6,000 \times g$  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。

細胞溶解とライセートの中和

4. 8 ml の PM1 Buffer (RNase A 添加) を加え、細胞をピペティングかボルテックスで再懸濁させます。
5. 8 ml の PM2 Buffer を加え、5 回ほど転倒混和します。  
\* 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)

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

120~240ml の細菌を処理する場合は、PM1, PM2, PM3 Buffer を別途購入してください。

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、 $\geq 5,000 \times g$  で 20 分間遠心分離します。(15,000~20,000  $\times g$  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 に移します。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 に加えます。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 ( $\geq 300 \mu\text{l}$ ) の TE または ddH<sub>2</sub>O 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>・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。</li> <li>・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。</li> <li>・DNA ペレットが少量で溶解するのに不十分。</li> </ul>
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"> <li>・PM1 Buffer に RNase A が添加されている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>
ゲノム DNA が混入している	<ul style="list-style-type: none"> <li>・過剰の細胞を使用しないでください。</li> <li>・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。</li> <li>・5 分以上、溶解（ステップ 6）を行わないでください。</li> </ul>
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"> <li>・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。</li> </ul>