

FavorPrep™ Endotoxin Free Plasmid Extraction Midi Kit

Cat. No. : FAPD2040 (2 回分) / FAPD2042 (25 回分)

本製品は研究用です v 202505

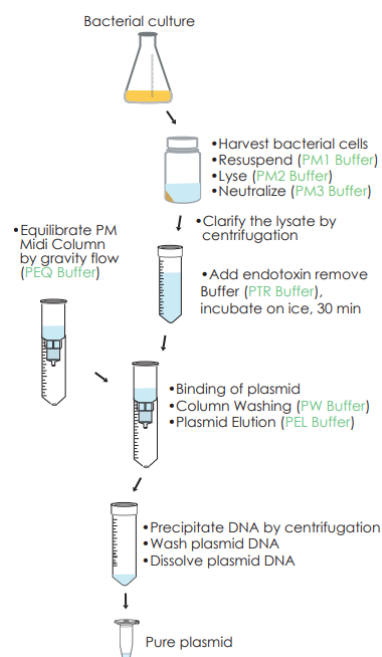
※本取扱説明書は RNase A 付属量の変更後の製品に対応しています。(2025 年 5 月以降順次切り替え)
必ず、お手元にある製品の RNase A Solution の容量をご確認ください。
下表と異なる場合は型番とロット番号をご記載の上、メール (technical@chiyoda-s.jp) にてご請求ください。

● キットの内容

	FAPD2040 (FAPDE 000-Midi-EF) (2 preps)	FAPD2042 (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 μ l	900 μ l
PM Midi Columns	2 pcs	25 pcs
*添加する RNase A Solution 量		
PM1 Buffer	80 μ l	860 μ l

● 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 μ g/Midi Column



● 重要事項

1. RNase A Solution は受け取り次第、 -20°C で保管してください。
2. PM1 Buffer に RNase A Solution を加え、十分に混和し、 4°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°C の湯せんで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°C に冷やしてください。

● 用意するもの

- 1) 50 ml チューブ
- 2) 冷却機能付き高速遠心機 ($\geq 5,000 \times g$) と適合する遠心チューブ
- 3) イソプロパノール
- 4) 70%エタノール
- 5) TE Buffer もしくは 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 、 $4,500 \sim 6,000 \times g$ で 10 分間遠心分離し、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、ろ液を捨てます。

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、細胞をピペッティングまたは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 回転倒混和します。(ボルテックスはしないでください)
 - ・ ライセートが最適な濃度が確認してください。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和してください。

ライセートの清澄化およびエンドトキシンの除去

8. 4℃、 $\geq 5,000 \times g$ で 20 分間遠心分離します。(4℃、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、ピペティングで優しく混和します。氷上で 30 分間インキュベートし、混合液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. 混合液を平衡化した PM Midi Column に移します。自然落下させ、ろ液を捨てます。

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、ろ液を捨てます。

プラスミド DNA の溶出

13. PM Midi Column を新しい 50 ml チューブ (非付属品) 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 倍量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℃、 $\geq 5,000 \times g$ で 30 分間遠心分離します。(4℃、15,000～20,000 $\times g$ で 20 分間が望ましい)
 - ・ 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に 5 ml の室温の 70% エタノールを加えます。
17. 4℃、 $\geq 5,000 \times g$ で 10 分間遠心分離します。
18. 上清を慎重に取り除き、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。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℃ で 10 分間インキュベート) します。
19. ペレット化したプラスミドを適量 ($\geq 300 \mu l$) の TE または ddH₂O に溶解させます。
 - ・ 上清を取り除く際、DNA ペレットを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	・ 使用する細菌細胞の数が多すぎる。 ・ PM3 Buffer の添加後は、転倒混和で沈殿物を溶解してください。 ・ 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 ペレットの再溶解が不十分。
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	・ PM1 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℃で保管してください。 ・ 細菌が高濃度の場合、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	・ 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、ゲノム DNA の切断を防ぐため、穏やかに混和してください。 ・ 5 分以上、溶解(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	・ 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。