

プラスミドキットⅡ編

QuickGene Plasmid kit SⅡ (PL-S2)



このシートは、組換え大腸菌からプラスミドDNAを抽出する手順を、キットハンドブック・取扱説明書からダイジェストしたものです。ご使用前には、キットハンドブック・取扱説明書をよく読み、正しくご使用ください。



適切な保護手袋、および保護めがねを着用して作業を行ってください。

step1 準備

目的のプラスミドDNA抽出を行うために、下記のものをご準備ください。

1 準備

QuickGene-810

プラスミドキット
(PL-S2)

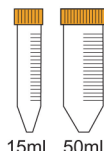


マイクロピペット



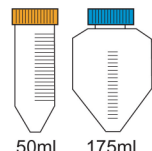
遠沈管

～16サンプルの場合



15ml 50ml

～72サンプルの場合



50ml 175ml

特級エタノール (>99%)

マイクロチューブ



マイクロ遠心機

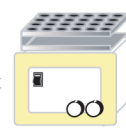
簡易卓上遠心機

手袋

チューブミキサー



または



2 試薬の準備

◆ 酵素 (EDP-01)

2～8℃の冷蔵庫で保存してください。

◆ 分散液 (RDP)

未開封のRDPボトルにEDP-01を全量添加・混合してください。

酵素添加後のRDPは、2～8℃の冷蔵庫で保存し、6ヵ月以内にお使いください。

◆ アルカリ溶液 (ADP)

使用前に混和してください。激しく振ると泡立ちますのでご注意ください。

析出物が生じた場合は、37℃で溶解してください。

使用後は、直ちにフタをしっかりと閉めてください。開放したまま放置すると活性が低下します。

◆ 中和液 (NDP)

使用前に十分に混和してください。

◆ 溶解液 (LDP)

未開封のLDPボトルに特級エタノール (>99%) を44ml添加・混合してください。

激しく振ると泡立ちますのでご注意ください。

◆ 洗浄液 (WDP)

未開封のWDPボトルに特級エタノール (>99%) を256ml添加・混合してください。

エタノール添加後は、直ちにフタをしっかりと閉めて室温で保存してください。

◆ 回収液 (CDP)

プラスミドDNA溶出時には、必ずCDPを使用してください。

続いてstep2 プロトコールを行います。

step2 プロトコール

目的の収量を得るため、必ず下記の手順で作業を行ってください。

本キットは、組換え大腸菌のLB培地1~2mlの培養液からのハイコピープラスミドDNAの抽出に対応しています。

1 組換え大腸菌ペレット調製

- 1) 組換え大腸菌を2ml程度のLB培地で12~16時間カルチャーします。
- 2) 培養液1~2mlを1.5mlマイクロチューブへ分注し、マイクロ遠心機で集菌 (3,300×g (6,000rpm) にて10分程度を目安) し、ペレット化します。

強くペレット化しすぎると、再分散が難しくなります。

- 3) 培地を除去します。

2 RDP (EDP-01 添加済み) 添加

組換え大腸菌ペレットにRDP (EDP-01添加済み) を100 μ l添加し、ボルテックスで激しく攪拌し、確実に分散させます。

その後、数秒間軽くスピンドウンします。

分散が充分でないと、プラスミドDNAの収量が低下します。

3 ADP添加

ADPを100 μ l添加し、直ちにゆっくりと5回転倒混和してください。(添加すると粘性のある液に変わります。) 振らないでゆっくりとかつ確実に液が混合するように混ぜます。その後、数秒間軽くスピンドウンします。

- ・激しく混合すると多くのゲノムDNAが共に精製されます。
- ・ゆっくり過ぎて液の混合が不十分ですと、プラスミドDNAの収量が低下します。
- ・室温で5分以上放置しないでください。プラスミドDNAが変性することがあります。

4 NDP添加

NDPを140 μ l添加し、直ちにゆっくりと5回転倒混和してください。(添加すると沈殿が生成されます。) 振らないでゆっくりとかつ確実に液が混合するように混ぜます。

- ・激しく混合すると多くのゲノムDNAが共に精製されます。
- ・ゆっくり過ぎて液の混合が不十分ですと、プラスミドDNAの収量が低下します。

5 遠心分離 (18,000×g (14,100rpm) 、10分、室温)

マイクロ遠心機で沈殿と上清を分離します。

遠心の間に、「7 LDP添加」の1)を行います。

6 別紙1 洗浄液、回収液の必要量

別紙1を参照し、必要な洗浄液、および回収液を遠沈管に注入し、セットします。

7 LDP（特級エタノール添加済み）添加

- 1) LDP（特級エタノール添加済み）320 μ lを新しい1.5mlマイクロチューブへ分注したものをサンプル数分準備しておきます。
- 2) 「5 遠心分離」後の1.5mlマイクロチューブから沈殿物を吸わないように上清（およそ330 μ l）をピペットで回収し、1)の1.5mlマイクロチューブへ添加します。

沈殿物を吸うと多くのゲノムDNAが共に精製されますので、注意してください。

- 3) **最大回転数で30秒以上ボルテックスを行い、溶液を良く混合してください。**

混合が不十分ですと溶解が進まず、プラスミドDNAの収量が低下します。

- 4) 軽くスピンドウンしてください。

8 ライセート完成

全量をカートリッジへ添加してください。

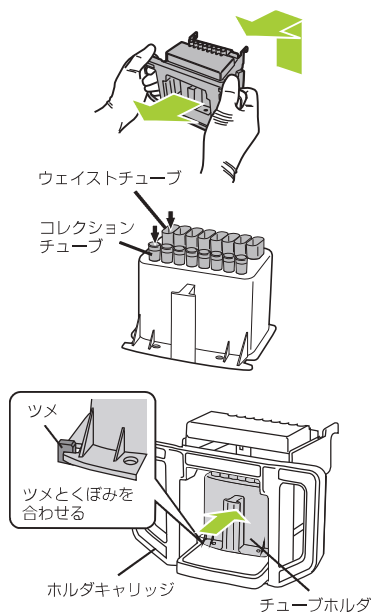
ライセート完成後、30分以内に抽出を行ってください。

9 step3 抽出 ~ step5 後処理

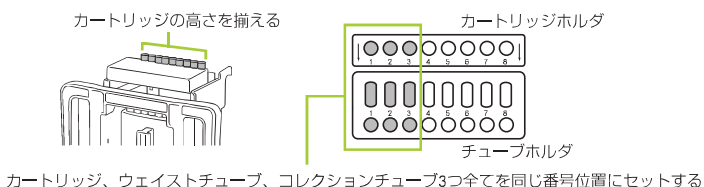
QuickGene-810を使って、プラスミドDNAを抽出します。

step3 抽出

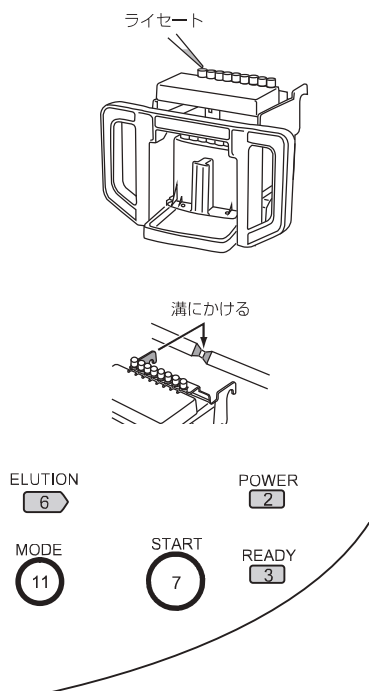
1 消耗品のセット (チューブホルダへのセット)



- 1 フロントカバーを開け、ホルダキャリアッジを取り外します。ホルダキャリアッジからチューブホルダを取り外します。
- 2 チューブホルダに、ウェイトチューブ、コレクションチューブをセットします。
- 3 チューブホルダをホルダキャリアッジにセットします。
- 4 カートリッジホルダに専用カートリッジをセットします。



2 サンプル抽出



- 1 カートリッジに、ライセートを、マイクロピペットを用いて全量アプライします。
- 2 ホルダキャリアッジを装置へセットします。
- 3 オペレーションパネルに目的の抽出モードが表示されるまで、〔MODE〕ボタンを数回押します。
- 4 〔START〕ボタンを押します。

プラスミドキット (PL-S2)	PLASMID
------------------	---------

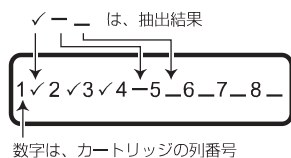
抽出処理中にフロントカバーを開いた場合、装置が一旦停止状態となりますが、抽出処理を再開することができます。詳細は、取扱説明書をご参照ください。

続いてstep4 回収を行います。

step4 回収

3 抽出結果確認

抽出結果の表示例



例では、 1～3列目：正常
4列目：不良
5～8列目：カートリッジセットなし

- 1 ピピーッと音が鳴れば抽出終了です。オペレーションパネルに抽出結果が表示されます。

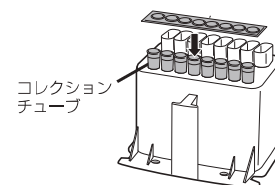
表示	意味
✓ (チェック)	正常終了
- (ハイフン)	抽出不良 (カートリッジのつまり)
- (アンダーバー)	カートリッジがセットされていない、または抽出前にエラーが発生

4 サンプル回収

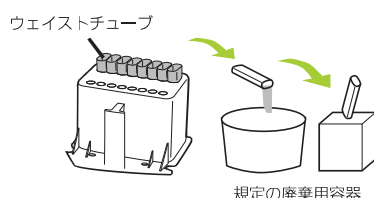
- 1 装置が完全に停止していることを確認した後、フロントカバーを開け、チューブホルダを取り外します。
- 2 コレクションチューブにキャップを付け、取り出し、保存します。

すぐにDNAを使用しない場合は、 -20°C で保存します。

回収液量の初期値は、 $50\mu\text{l}$ です。



5 廃棄・消耗品の処分



- 1 ウェイトチューブを取り出し、廃液は規定に従って廃棄し、ウェイトチューブも廃棄してください。
- 2 ホルダキャリアを取り外します。
- 3 カートリッジホルダを取り外し、カートリッジを処分します。

カートリッジホルダの上部をスライドさせ、カートリッジを下に落とし、処分します。



バイオハザード

感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用後廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので、関連する法に従い、焼却、溶融、滅菌、消毒などの処理をしてください。また、委託して行う場合は、特別管理産業廃棄物処分業の免許を持った業者に、特別管理産業廃棄物管理票（マニフェスト）を添えて処理依頼をしてください。

続いてstep5 後処理を行います。

step5 後処理

6 後処理

- 1 ディスチャージトレイを確認します。廃液が溜まっていれば、廃棄します。
 - ・キットを変える場合 ⇒ 別紙2（キット変更時のディスチャージ）
 - ・終了して1週間以上、装置を使用しない場合 ⇒ 別紙2（1週間以上使わない場合のディスチャージ）
 - ・続けて作業する場合 ⇒ 下記2以降
- 2 ホルダキャリッジにカートリッジホルダ、チューブホルダをセットし、装置に戻します。
- 3 フロントカバーを閉じ、step2からの作業を行います。

7 作業終了