

プラスミドDNA分離 クイックガイド

プラスミドキット II 編

QuickGene Plasmid kit S II (PL-S2)



このシートは、組換え大腸菌からプラスミドDNAを分離する手順を、キットハンドブック・取扱説明書から抜粋したものです。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分離を行うために、下記のものをご準備ください。

1 準備

QuickGene-Mini480

プラスミドキット (PL-S2)



特級エタノール (>99%)

遠心分離機

手袋

保護めがね

マイクロチューブ

(1.5ml)



マイクロピペット

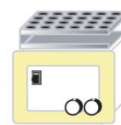
(P-200, P-1000など)



チューブミキサー



または



2 試薬の準備

◆ 酵素 (EDP-01)

2~8°Cの冷蔵庫で保存してください。

◆ 分散液 (RDP)

使用前の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°Cの冷蔵庫で保存し、6ヶ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°C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、組換え大腸菌培養液1~2ml (LB培地) からのハイコピープラスミドDNAの分離に対応しています。

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時間培養します。
- 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、**ポ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アウンします。

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アウンします。

- ・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。(添加すると沈澱が生成されます。) 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澱と上清を分離します。

遠心の間に、次項「6 LDP添加」の1)を行います。

6 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、溶液を十分に混合します。**

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ます。

7 ライセート完成

全量をカートリッジへ添加します。

ライセート完成後、30分以内に分離を行ってください。

続いてstep3 分離を行います。

step3 分離

QuickGene-Mini480を使って、プラスミドDNAを分離します。

1 QuickGene-Mini480分離フロー

分離フロー中の加圧マークは下記操作を意味しています。

- ① ウェイストチューブホルダまたはコレクションチューブホルダ (カートリッジホルダセット済み) をQuickGene-Mini480にセットし、カートリッジの1列目が加圧ノズルの真下にくる位置まで押し込む
- ② 加圧スイッチをONの位置に回して加圧する
- ③ カートリッジ内に液が残っていないことを確認してから加圧スイッチをOFFの位置に戻す
- ④ サンプルがセットされている列数に応じてホルダを押し込み、②と③を繰り返す
- ⑤ ウェイストチューブホルダまたはコレクションチューブホルダ (カートリッジホルダセット済み) をQuickGene-Mini480から取り出す

