

プラスミドDNA抽出 クイックガイド

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-Mini80

プラスミドキット (PL-S2)



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

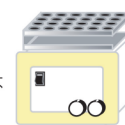
マイクロピペット



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、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。

7 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。

続いてstep3 抽出を行います。

step3 抽出

QuickGene-Mini80を使って、プラスミドDNAを抽出します。

1 QuickGene-Mini80抽出フロー

抽出フロー中の加圧マークは下記操作を意味しています。

- ① チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQuickGene-Mini80にセットする
- ② 加圧スイッチを手前に回して加圧開始
- ③ カートリッジ（CA）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元の位置に戻す
- ④ チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQuickGene-Mini80から取り出す

