

PureYield™ Plasmid Midiprep System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A2490, A2492, A2495, A2496

注意：本製品を遠心法により使用するとき、スイングローターが必要になります（アングルローターでの DNA 溶出はできません。）
ご使用前に、Endotoxin Removal Wash には、イソプロパノール、Column Wash には、エタノールを所定の量（下表）を添加してください。
添加後は、しっかりと蓋を閉めアルコール成分が揮発しないようにご注意ください。
すべての操作は、室温（22～25℃）行ってください。

Endotoxin Removal Wash	イソプロパノール
4 preps system (A2490)	10ml
25 preps system (A2492)	57ml
100 preps system (A2495)	210ml
300 preps system (A2496)	210ml

Column Wash	95% エタノール
4 preps system (A2490)	55ml
25 preps system (A2492)	350ml
100 preps system (A2495)	635ml
300 preps system (A2496)	635ml

プロトコル共通（遠心法、吸引法）

大腸菌クリアライゼートの調製	大腸菌培養液	
	50-100ml	101-250ml
1. 培養液を遠心（5,000×g）し大腸菌を沈殿させ、培地を取り除く。	10分	10分
2. 大腸菌を Cell Resuspension Solution に懸濁する。	3ml	6ml
3. Cell Lysis Solution を添加し転倒混和後、 室温で3分間インキュベーションする。	3ml	6ml
4. Neutralization Solution を添加し転倒混和させる。	5ml	10ml
5. 遠心（15,000×g 室温）（または、遠心（7,000×g 室温））し 上清（大腸菌クリアライゼート）を取得する。	15分（30分）	15分（30分）

このステップでの遠心はアングルローターを利用してください。

遠心法プロトコル（スイングローター^注）

<カラムへの吸着>

- 50ml の遠心チューブに PureYield™ Clearing Column（青色；以下 Clearing Column）を挿入する。
大腸菌クリアライゼートを Clearing Column に注ぎ、2分間インキュベートする。
注）細胞残渣が少ない場合は、すぐにステップ2を行うことができます。
- 遠心（1,500×g, 5分間, 室温）する。もし、大腸菌クリアライゼートが Clearing Column 上に残っていれば再度遠心を繰り返す。
- 新しい 50ml 遠心チューブに PureYield™ Binding Column（白色；以下 Binding Column）を挿入する。
ステップ2で得た大腸菌ライゼートを Binding Column へ注ぎ、遠心（1,500×g, 3分間, 室温）する。

<洗浄>

- 5ml の Endotoxin Removal Wash（イソプロパノール添加済）を Binding Column に加え、遠心（1,500×g, 3分間, 室温）する。
50ml 遠心チューブから Binding Column をはずし、溶液を捨てたのち、再度 Binding Column をセットする。
- 20ml の Column Wash Solution（エタノール添加済）を Binding Column に加え、遠心（1,500×g, 3分間, 室温）する。
50ml 遠心チューブから Binding Column をはずし、溶液を捨てたのち、再度 Binding Column をセットする。
- 遠心（1,500×g, 10分間, 室温）し、メンブレン上に残っている Column Wash Solution を完全に取り除く。

<遠心による溶出 >

- Binding Column を新しい 50ml の遠心チューブに挿入する。
 - 600μl の Nuclease-Free Water を Binding Column 内のメンブレンにしみ込ませるように加え、1分間静置させる。
 - 遠心（1,500×g, 5分間, 室温）する（約 400μl が溶出されます。）。
- * 長鎖（10kb 以上）のプラスミドを溶出させる場合、あらかじめ 65℃ に加温した Nuclease-Free Water を用いることでメンブレンから核酸の解離を促進することができます。

注）アングルローターは、溶液がカラムに残存するため利用はできません。



PureYield™ Plasmid Midiprep System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A2490, A2492, A2495, A2496

Quick
PROTOCOL

吸引法プロトコール

1. PureYield™ Binding Column(白色; 以下 Binding Column)の上に PureYield™ Clearing Column (青色; 以下 Clearing Column) を挿入する (下の写真(A)を参照)。
2. 大腸菌クリアーセントを Clearing Column に注ぐ。
3. 吸引を開始する。溶液が、Clearing Column および Binding Column を完全に通過するまで吸引を続ける。
4. コックを開めたのち、ゆっくりと Clearing Column を取り除く。
* Binding Column 内のメンブレンが、底面から外れたら滅菌したチップ (ピペットを接続する側) で元の位置に押し込んでください。

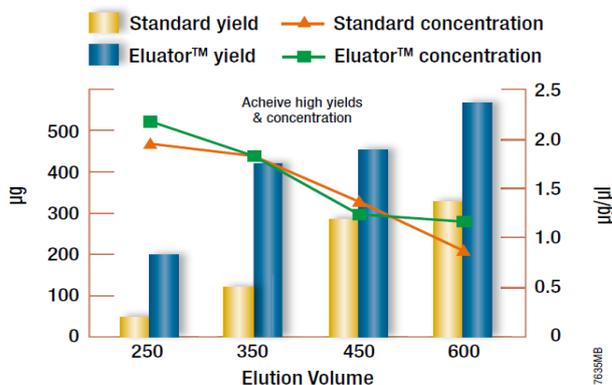
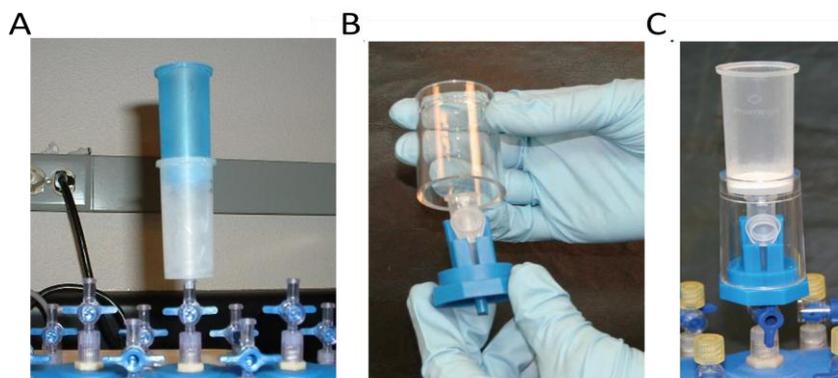
<洗浄>

5. 5ml の Endotoxin Removal Wash (イソプロパノール添加済) を Binding Column に加えたのち、コックを開けて吸引を開始する。溶液が Binding Column を完全に通過するまで続けたのち、コックを閉める。
6. 20ml の Column Wash Solution (エタノール添加済) を Binding Column に加え、コックを開けて吸引を開始する。
7. 溶液が Binding Column を完全に通過したのち、さらに空の状態、30~60 秒間吸引し続け、メンブレン上に残っている試薬を完全に取り除く。終了後、吸引を停止する。

<Eluator™を用いた溶出 >

8. Eluator™ Vacuum Elution Device の base unit に、滅菌した 1.5ml チューブをセットしチューブキャップをセットする (下の写真(B)を参照)。
9. Vac-Man® Manifold から、Binding Column を取り外し、チップの先の残液をペーパータオル等で拭き取る。Binding Column を、Eluator™ Vacuum Elution Device にセットする (写真(C)を参照)。
10. 400~600µl の Nuclease-Free Water を Binding Column 内のメンブレンにしみ込ませるように加え、1 分間静置させたのち、吸引を 1 分間行う。
11. 吸引を停止し、溶出したプラスミドを含む 1.5ml チューブを回収する。

* 長鎖 (10kb 以上) のプラスミドを溶出させる場合、あらかじめ 65℃ に加温した Nuclease-Free Water を用いることでメンブレンから核酸の解離を促進することができます。



標準法と Eluator™ を用いた吸引法との収量および濃度の比較
PureYield™ Midiprep を用いて一昼夜菌体培養液 (ハイコピープラスミド) 50ml からプラスミドを精製した際の収量比較。標準法は遠心による溶出を行った。Eluator™ Vacuum Elution Device を用いれば、1.5ml チューブに直接溶出が可能です。



Promega