

PureYield™ Plasmid Miniprep System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1220, A1221, A1222, A1223

Quick
PROTOCOL

備考:すべての遠心操作は、11,000~16,000×g(室温)で行う。

Neutralization Solution は、開封後 4-8 °C で保存する。

Cell Lysis Buffer は、保存状態により、沈殿が生じる場合があるため、使用前に沈殿がないか確認してから使用する。(もし、沈殿が見られたら、30~37°Cの恒温槽で30分間、加温し、完全に溶かしてから使用する。)

使用前に、95% エタノール(A1220 4ml, A1221 24ml, A1222 100ml, A1223 36ml)を Column Wash Solution に加え、よく混和させておく。

* 詳細は、Technical Bulletin Part# TB374 の3ページに記載されています。

遠心法プロトコール

クリアライセートの調製

1. 一晚培養した大腸菌 600μl を 1.5ml チューブに加える。
*培養した大腸菌 600μl 以上(3ml まで)からプラスミドを精製するときもしくは、より高純度のプラスミドを精製したいときは、改変プロトコールを参照する。
2. 100μl Cell Lysis Buffer (青色)をサンプルに加え、6回転倒混和。
3. 350μl Neutralization Solution (4-8°C保存)をサンプルに加えたのち、青色の色素が黄色に変化するまで転倒混和。
*ステップ3は、ステップ2を行なったのち2分以内に行う。
4. トップスピードで室温、3分間遠心。

プラスミド DNA の結合

5. Collection TubeにPureYield™ Minicolumnをセットする。
6. PureYield™ Minicolumnにクリアライセート全量(約900μl)を加える。
7. トップスピードで室温、15秒間遠心。通過した溶液を破棄したのち、PureYield™ Minicolumnを再度 Collection Tube にセットする。

カラムの洗浄

8. 200μl Endotoxin Removal Washを加え、トップスピードで室温、15秒間遠心。通過した溶液を破棄したのち、PureYield™ Minicolumnを再度Collection Tubeにセットする。
9. 400μl Column Wash Solution を加えトップスピードで室温、30秒間遠心。

溶出

10. PureYield™ minicolumnを新しい1.5mlチューブへセットする。
11. 30μl Elution Buffer もしくは、Nuclease-Free Water を加え、1分間静置。
12. トップスピードで室温、15秒間遠心し、プラスミド DNA を溶出させる。

吸引法プロトコール

1. 一晚培養した大腸菌 1.5ml を 1.5ml チューブに入れたのち、トップスピードで室温、30秒、遠心したのち、培地を取り除き、水もしくはTE 600μlを加え、大腸菌ペレットを完全に懸濁させる。
2. 100μl Cell Lysis Buffer (青色)をサンプルに加え、6回転倒混和。
3. 350μl Neutralization Solution (4-8°C保存)をサンプルに加えてのち、青色の色素が黄色に変化するまで転倒混和。
*ステップ3は、ステップ2を行なったのち2分以内に行う。
4. トップスピードで室温、3分間遠心

プラスミド DNA の結合

5. PureYield™ MinicolumnをVac-Man®のadapterに直接装着。
6. PureYield™ Minicolumnにクリアライセート全量(900μl)を加え、吸引を開始し、溶液がすべてColumnを通過したら、吸引を停止。
7. 200μl Endotoxin Removal Wash を加え、吸引により溶液を Column に通過させる。
8. 400μl Column Wash Solution を加え、吸引により溶液を Column に通過させる。
9. PureYield™ Minicolumn を 2ml Collection Tubeにセットし、トップスピードで室温、1分間遠心 (*吸引では取り除くことができない溶液を取り除くため必要です。)

溶出

10. PureYield™ minicolumnを新しい1.5mlチューブへセットする。
11. 30μl Elution Buffer もしくは、Nuclease-Free Water を加え、1分間静置。
12. トップスピードで室温、15秒間遠心して、プラスミド DNA を溶出させる。

一晚培養した大腸菌



100μl Cell Lysis Buffer (アルカリ溶解)
350μl Neutralization Solution (中和)



遠心 (トップスピード、室温、3分間)



クリアライセートをカラムへアプライする。
(約900μl)



遠心(トップスピード、室温、15秒)



200μl Endotoxin Removal Wash



遠心(トップスピード、室温、15秒)



400μl Column Wash Solution



遠心 (トップスピード、室温、15秒)



30μl Elution Buffer



遠心 (トップスピード、室温、15秒)

プラスミドDNA



Promega

技術的なお問合せは:

e-mail: prometec@jp.promega.com • Tel: 03-3669-7980 • Fax: 03-3669-7982

Revised 12/09

PureYield™ Plasmid Miniprep System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1220, A1221, A1222, A1223

改変プロトコル（600μl 以上 3ml 以下大腸菌培養液から精製する場合。）

1. 一晚培養した大腸菌 1ml を 1.5ml チューブに入れたのち、トップスピードで室温、30 秒、遠心
2. 培地を完全に取り除く。
3. 新たに、一晚培養した大腸菌を 1.5ml チューブに入れたのち、ステップ 1 と 2 の操作を繰り返す。
4. 600μl TE もしくは、Nuclease-Free Water を加え、大腸菌ペレットを完全に懸濁させる。
5. 遠心・吸引法プロトコルのステップ 2 から行なう。

Q&A

Q1) 推奨する大腸菌の培養条件はありますか？

A1) 弊社では、LB 培地 (0.6~3ml) に植菌し、37°C、12~16 時間培養した (A600=2~4) 大腸菌からプラスミド精製を行なうことを推奨します。LB 培地以外の利用や、長時間培養した高密度の大腸菌を利用すると、A260/A230 値の低下やカラムの目詰まりなどの原因になります。

Q2) PureYield™ Midiprep, Maxiprep System に含まれる Endotoxin Removal Wash では、イソプロパノールを使用前に加える必要がありましたか？ PureYield™ Miniprep System では加えなくてよいのですか？

A2) PureYield™ Miniprep System では、あらかじめ試薬の中にイソプロパノールが含まれておりますので新たに加える必要はありません。

Q3) PureYield™ Miniprep System に、従来の PureYield™ Midiprep, Maxiprep System に含まれる試薬を使用することができますか？

A3) 試薬の組成が異なるため、使用することはできません。

Q4) カラムの最大結合容量はどれくらいですか？

A4) カラム 1 つに約 25μg のプラスミド DNA を結合させることができます。

Q5) プラスミド DNA の収量は、どのくらいですか？

A5) 下記、図 1 を参考にしてください。

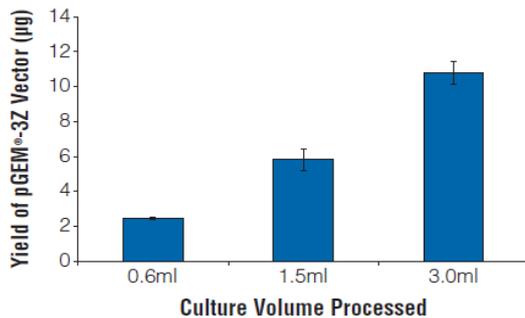


図.1 プラスミドDNAの回収量

Q6) Elution Buffer は、どのくらいの量を入れますか？

A6) 標準的なプロトコルでは、30μl となっております。100μl まで増やすと若干回収量が増加しますが、プラスミド濃度が低下します。100μl 以上加えても、回収量が増加することはありません。また、30μl 以下は、回収率が大きく減少すると考えられますので、お勧めしません。

Q7) 10kbp 以上のプラスミドを精製したい、可能ですか？

A7) 可能です。しかし、プラスミド DNA がカラムから溶出されにくいので、50°C に加温した Elution Buffer 50μl をカラムに加え、室温で 5~10 分静置したのち、溶出操作を行ってください。

Q8) 吸引法で精製したプラスミド DNA の制限酵素処理や、シーケンス反応がうまくできません、改善策はありますか？

A8) 吸引法プロトコルステップ 9 を行ないましたか？吸引法では、カラムに残存した Column Wash Bufferなどを完全に取り除くことができません。そのため、塩やエタノールが溶出したプラスミド DNA に含まれ、酵素反応を阻害していることが考えられます。

