

112-150
112-102

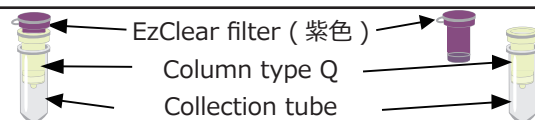
GeneAll Hybrid-Q Plasmid Rapidprep

実験を行う前に…

- ・初回使用時に規定量のエタノールを Buffer AW、Buffer PW に加えて下さい。
- ・初回使用時に全量の RNase A を Buffer S1 に加えて下さい。RNase A を添加した Buffer S1 は 4℃ で保管して下さい。
- ・Buffer S2 と Buffer G3 に沈殿が生じた場合には 37℃ でインキュベートし、沈殿をよく溶かしてからご使用下さい。

※迅速プロトコルでは、EzClear Filter は Column type Q にセットして使用します。

迅速プロトコル以外の方法では EzClear Filter を使用しません。



培地使用量 ~ 3 mL

【迅速プロトコル】

- 1) サンプル : 1 ~ 3 mL
遠心, 13,000×g, 室温, 1分間
: 上清を捨て菌体を回収
(サンプル量に応じて回数を調整)
- 2) Buffer S1 : 170 µL
懸濁 ピペッティング
- 3) Buffer S2 : 170 µL
転倒混和3~4回
- 4) Buffer G3 : 250 µL
転倒混和4~5回
- 5) EzClear FilterをColumn type Qに重ね、
Collection tubeをセット
上清を EzClear Filterに移す
遠心 10,000×g, 室温,
30~60秒間
- EzClear Filterを捨て、
ろ液を捨てColumn type Q
を再セット
- 6) Buffer AW : 500 µL
遠心 10,000×g, 室温, 30秒間
ろ液を捨てカラムを再セット
※ホストがendA+株の場合実施
- 7) Buffer PW : 700 µL
遠心 10,000×g, 室温, 30秒間
ろ液を捨てカラムを再セット
- 8) 遠心 10,000×g, 室温, 1分間
1.5 mLチューブにカラムをセット
- 9) Buffer EB : 50 µL
静置 室温, 1分間
遠心 10,000×g以上, 室温, 1分間

プラスミドDNA溶液

培地使用量 ~ 5 mL

【通常プロトコル】

- 1) サンプル : 5 mL
遠心, 10,000×g, 室温, 5分間
: 上清を捨て菌体を回収
(チューブに応じて時間・回数を調整)
- 2) Buffer S1 : 250 µL
懸濁 ピペッティング
- 3) Buffer S2 : 250 µL
転倒混和4回
- 4) Buffer G3 : 350 µL
転倒混和4~6回
- 5) 遠心 10,000×g, 室温, 10分間
- 6) 上清をColumn type Qに移す
遠心 10,000×g, 室温, 30秒間
ろ液を捨てカラムを再セット
- 7) Buffer AW : 500 µL
遠心 10,000×g, 室温, 30秒間
ろ液を捨てカラムを再セット
※ホストがendA+株の場合実施
- 8) Buffer PW : 700 µL
遠心 10,000×g, 室温, 30秒間
ろ液を捨てカラムを再セット
- 9) 遠心 10,000×g, 室温, 1分間
1.5 mLチューブにカラムをセット
- 10) Buffer EB : 50 µL
静置 室温, 1分間
遠心 10,000×g以上, 室温, 1分間

プラスミドDNA溶液

培地使用量 10 mL

【Low-copy 用プロトコル】

- 1) サンプル : 10 mL
遠心, 10,000×g, 室温, 5分間
: 上清を捨て菌体を回収
(チューブに応じて時間・回数を調整)
- 2) Buffer S1 : 400 µL
懸濁 ピペッティング
- 3) Buffer S2 : 400 µL
転倒混和4回
- 4) Buffer G3 : 600 µL
転倒混和4~6回
- 5) 遠心 10,000×g, 室温, 10分間
- 6) 上清を2 mLチューブに移す
7) 700 µLを上清を
Column type Qに移す
遠心 10,000×g, 室温, 30秒間
8) 上澄がなくなるまで繰り返す
- ろ液を捨てカラムを再セット
- 9) Buffer AW : 500 µL
遠心 10,000×g, 室温, 30秒間
ろ液を捨てカラムを再セット
- 10) Buffer PW : 700 µL
遠心 10,000×g, 室温, 30秒間
ろ液を捨てカラムを再セット
- 11) 遠心 10,000×g, 室温, 1分間
1.5 mLチューブにカラムをセット
- 12) Buffer EB : 50 µL
静置 室温, 1分間
遠心 10,000×g以上, 室温, 1分間

プラスミドDNA溶液

*10kb 以上の大きなプラスミドの場合、最終ステップのプラスミド DNA の溶出には、Column type Q のメンブレンの中心に予め70℃ に加熱した必要分のBuffer EB もしくは脱イオン水を加え、室温で2分間静置してから遠心し、プラスミドDNA溶液を回収して下さい。

112-150
112-102

GeneAll Hybrid-Q Plasmid Rapidprep

トラブルシューティング

現象	考えられる原因	対策
プラスミド DNA の回収量が少ない	サンプル中の細胞数が多すぎる	サンプルは抗生物質を加えた培地で 16 ～ 21 時間培養したものを使用し、適宜サンプル量を減らして下さい。特に、リッチ培地（TB や 2×YT）で培養すると、細胞密度が高すぎる場合がありますので注意して下さい。
	低コピー数プラスミドを使用している	低コピー数プラスミドは、5 mL の 16 ～ 21 時間培養した培養液をサンプルとして使用しても 0.5 µg 程度しか回収できない場合があります。サンプル量を増やすか、可能ならばリッチ培地で培養したサンプルを使用して下さい。
	ペレットの懸濁が不十分	Buffer S1 にて、ペレットを完全に懸濁して下さい。
	RNase 処理が不十分	RNA が過剰に混入していると Column type Q へのプラスミド DNA の結合が阻害されます。RNase A を加えた Buffer S1 は 4 °C で保存して下さい。
純度が低い	沈殿物が混入している	Column type Q に上清を移す際に、沈殿物を吸わないように注意して下さい。
ゲノム DNA が混入している	Buffer G3 を加えて激しく混和している	Buffer S3 を加えた後に激しくボルテックスを行うと、染色体 DNA が切断され、染色体 DNA の混入が生じる可能性があります。Buffer G3 を加えた後は穏やかに混和して下さい。
プラスミド DNA を電気泳動すると、バンドがスミアになる	溶解時間が長い	Buffer S2 において、溶解時間は 5 分を超えないようにして下さい。
	Buffer S2 を加えて激しく混和している	Buffer S2 を加えた後に激しく混和を行うと、プラスミド DNA の不可逆変性が生じる可能性があります。Buffer S2 を加えた後は穏やかに混和して下さい。
溶出液の塩濃度が高い	洗浄ステップが不十分	Buffer PW を加えた後に 5 分間室温で静置してから遠心して下さい。
プラスミド DNA を電気泳動する際、アガロースゲルに入らない	エタノールが完全に除去できていない	Buffer PW を加えた後に洗浄ステップが適切に行われ、Buffer EB を加える前に Column type Q を完全に乾燥させる必要があります。
プラスミド DNA の酵素処理がうまくいかない	溶出液の塩濃度が高すぎる	洗浄工程がプロトコール通りに行われたことを確認してください。洗浄ステップを繰り返すことで、溶出液中の高濃度の塩を除去できる場合があります。
	エタノールが完全に除去できていない	Buffer PW を加えた後に洗浄ステップが適切に行われ、Buffer EB を加える前に Column type Q を完全に乾燥させる必要があります。