取扱説明書 シカジーニアス® プラスミドプレップキット2
Cica Geneus® Plasmid Prep Kit2

1. はじめに
本製品は、細菌培養液から簡便・迅速にプラスミド DNA を調製するためのキットです。本製品は、20 kb 以下のサイズのプラスミドを効率よく単離・精製することができます。
本キットでは、EzClear Filter を用いて最大 3 mL の培養液から約 10 分で完了する迅速プロトコール、最大 5 mL の培養液から約 25 分で完了する通常プロトコール、10 mL の培養液を使用する Low-copy プラスミド用プロトコールの 3 種類が選択可能です。本製品を用いて調製されたプラスミドは、PCR やクローニング、シークエンシングなど、様々なアプリケーションに適用可能です。

2. 原理
本製品は、アルカリ抽出法をベースに、シリカベースのメンブレンのスピンカラムを組み合わせることでプラスミドを調製するキットです。本製品はまずアルカリ処理によって菌体からプラスミド DNA を抽出し、RNase によりライセート中の RNA を分解した後、ライセート中に含まれる細胞破片や塩析沈殿物等を EzClear Filter 処理や遠心操作により除去します。その後、ライセート中に含まれるプラスミド DNA を SV Column type Q に結合させ、カラムを洗浄し菌体由来の不純物を除去します。最終的にカラムに結合したプラスミド DNA を溶出バッファーで溶出します。この方法によって、有機溶媒を使用することなくプラスミド DNA を調製することができます。

3. 製品形態

製品名	シカジーニアス® プラスミドプレップキット 2 (Cica Geneus® Plasmid Prep Kit2)
製品番号	08140-97
容量	200 回分
保管温度	室温(15 ℃～25 ℃)

4. 構成試薬 (200 回)

個別名称	容量	用途
SV Column type Q (カラム:黄色) (コレクションチューブ付)	50 個×4	プラスミド結合
EzClear Filter (カラム:紫色)	50 個×4	細胞片、塩沈殿物の除去
①Buffer S1 ※3	60 mL×1	サンプル懸濁
②Buffer S2	60 mL×1	サンプル溶解
③Buffer G3	90 mL×1	細胞破片の沈殿
④Buffer AW ※1	69 mL×1	カラム洗浄
⑤Buffer PW ※2	50 mL×1	カラム洗浄
⑥Buffer EB	30 mL×1	プラスミド溶出
⑦RNase A (20 mg/mL) ※3	300 μL×1	RNA 分解

5. 製品仕様

製品タイプ	スピンカラム
最大サンプル量	10 mL
SV Column type Q への最大ローディング量	800 μL
EzClear Filter への最大ローディング量	600 μL
最小溶出液量	40 μL
カラムの最大 DNA 結合量	30 μg

6. 使用上の注意
②Buffer S2 と③Buffer 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。
本製品は、皮膚や眼、気道に対して有害な刺激物を含んでいます。本製品を扱う際は十分に注意し、手袋や保護メガネを着用して下さい。万が一試薬が付着した場合は、速やかに大量の水で洗い、医師の診察を受けて下さい。
③Buffer G3 と④Buffer AW はカオトロピック塩を含んでいます。カオトロピック塩は漂白剤と混ざると反応性の高い化合物を生じる可能性があります。本製品に漂白剤や酸性溶液が混ざらないように十分注意して下さい。

7. 必要な機器類
100 %エタノール、2 mL チューブ用遠心機、マイクロピペット、ピペット用チップ、1.5 mL チューブ、2 mL チューブ

8. サンプルについて
プラスミド DNA の収量はプラスミドコピー数、細菌株、培養液のタイプなど様々な要因に依存します。
プラスミドのコピー数は、通常の生育条件下で 1 つの細菌細胞が持つプラスミドの数と定義されています。プラスミドは複製起点(レプリコン)とプラスミド DNA のサイズに由来した固有のコピー数を持ちます。プラスミドには 30 以上の異なるレプリコンがあります(表 1)。高コピー数のプラスミドを用いる場合、収量は多くなりますが、サイズが大きいプラスミドや厳密に複製を制御されているプラスミドは低コピー数であることが多く、収量は少なくなります。
本製品は高コピー数のプラスミドに最適化されておりますので、低コピー数のプラスミドを調製する際には、「Low-copy プラスミド用プロトコール」を選択下さい。

表 1 様々なプラスミドベクター

プラスミド	サイズ (bp)	コピー数	レプリコン
pUC シリーズ	2,686	500～700	pMB1
pBluescript シリーズ	～3,000	300～500	ColE1
pGEM シリーズ	～3,000	300～400	pMB1
pMK16	～4,500	>15	ColE1
pBR322	4,362	15～20	pMB1
pACYC	～4,000	18～22	p15A
pSC101	9,263	～5	pSC101
pRK353	～11,100	～15	R6K

プラスミド DNA の複製にはホストとして *E. coli* 株がよく用いられます(表 2)。*E. coli* の多くの *endA*$^+$ 株は *endA* 遺伝子によってコードされるエンドヌクレアーゼ I を産生します。エンドヌクレアーゼ I は二本鎖 DNA を切断するため、プラスミド調製時に完全に除去できなかった場合、プラスミド DNA は Mg^{2+} 存在下で分解されます。この問題を避けるためには、DH5α や XL1-Blue 等の *endA*$^-$ 株(*endA1*)を用いるか、(オプション: ホストが *endA*$^+$ 株の場合)の操作を行なって下さい。

表 2 *E. coli* 株の遺伝子型

endA$^+$ 株	*endA*$^-$ 株
BL21 (DE3), CJ236, HB101, JM83, JM101, JM110, LE392, MC1061, NM シリーズ, P2392, PR シリーズ, RR1, TB1, TG1, BMH71-18, ES1301, wild-type	DH1, DH20, DH21, DH5α, JM103, JM105, JM106, JM107, JM108, JM109, MM294, SK1590, SRB, XL1-Blue, XLO

9. プロトコール
【重要】 実験を始める前の注意事項
※1:④Buffer AW は、初回使用前にエタノール(分子生物学用)(別売)を 41 mL 加え、合計 110 mL としてからご使用下さい。
※2:⑤Buffer PW は、初回使用前にエタノール(分子生物学用)(別売)を 200 mL 加え、合計 250 mL としてからご使用下さい。
※3:初回使用時に全量の⑦RNase A を①Buffer S1 に加えて下さい。⑦RNase A を添加した①Buffer S1 は 4 ℃で保管して下さい。

*特に記述が無い限り、遠心操作は室温・最高速度(10,000×*g* 以上または 10,000 rpm～14,000 rpm)で行なって下さい。
*最終ステップのプラスミド DNA の溶出に使用する⑥Buffer EB もしくは脱イオン水は 200 μL まで増やすことができますが、プラスミド DNA 溶液の濃度は低下します。高濃度のプラスミド DNA 溶液が必要な場合、添加量を 40 μL まで減らすことができます。
*10 kb 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、SV 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⑥Buffer 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。

取扱説明書 シカジーニアス® プラスミドプレップキット2
Cica Geneus® Plasmid Prep Kit2

【迅速プロトコール】

*本プロトコールは、EzClear Filter と SV Column type Q を組み合わせて使用し、ライセート中の不純物の除去と SV Column type Q へのプラスミド DNA の結合を同時に行なうプロトコールです。

*本プロトコールは、3 mL までの培養液にて使用可能です。それ以上の培養液や Low-copy プラスミド等を保有する検体は、通常プロトコールまたは Low-copy プラスミド用プロトコールにて実施して下さい。

1) 1.5 mL チューブ(別売)または 2 mL チューブ(別売)に 1 mL～3 mL の培養液を 1.5 mL または 2 mL ずつ加え、数回に分けて室温で 1 分間 13,000×*g* で遠心し、上清を捨て菌を回収します。
2) 170 μL の①Buffer S1 を 1) のチューブに加え、ゆっくりとペレットを懸濁します。懸濁液を 1.5 mL チューブ(別売)に移します。
   *1)で 1.5 mL チューブを用いた場合は懸濁液を新しいチューブに移す必要はありません。
3) 170 μL の②Buffer S2 を加え、転倒混和します(3～4 回)。
   *ボルテックスミキサーを使用しないで下さい。
   *懸濁液が透明で粘調な液体になるまで静置しますが、5 分以上静置しないで下さい。
4) 250 μL の③Buffer G3 を加え、すぐに転倒混和します(4～5 回)。
   *ボルテックスミキサーを使用しないで下さい。
5) SV Column type Q(カラム:黄色)の上に EzClear Filter(カラム:紫色)を重ね、コレクションチューブにセットします。上清をピペットで EzClear Filter に移し、30～60 秒間遠心します。その後、EzClear Filter を捨て、SV Column type Q を外し、ろ液を捨て、同じチューブに SV Column type Q のみをセットします。
6) (オプション: ホストが *endA*⁺株の場合)500 μL の④Buffer AW を SV Column type Q に加え、30 秒間遠心します。ろ液を捨て同じチューブに SV Column type Q をセットします。
7) 700 μL の⑤Buffer PW を SV Column type Q に加え、30 秒間遠心します。ろ液を捨て同じチューブに SV Column type Q をセットします。
8) 1 分間遠心し、⑤Buffer PW を完全に除去した後、SV Column type Q を新しい 1.5 mL チューブ(別売)にセットします。
   *⑤Buffer PW が残存すると後のステップに影響します。カラムに付着しないように十分注意して下さい。
9) SV Column type Q のメンブレンの中心に 50 μL の⑥Buffer EB もしくは脱イオン水を加え、室温で 1 分間静置します。1 分間遠心し、プラスミド DNA 溶液を回収します。

【通常プロトコール】

*本プロトコールでは EzClear Filter(カラム:紫色)を使用しません。

1) 遠心チューブ(別売)に 5 mL までの培養液を加え、遠心機を用いて室温で 5 分間 10,000×*g* で遠心し、上清を捨て菌を回収します。1.5 mL チューブ(別売)を用いる場合は数回に分けて 1 分間遠心し、上清を捨て菌を回収します。
2) 250 μL の①Buffer S1 を 1) のチューブに加え、ゆっくりとペレットを懸濁します。懸濁液を 1.5 mL チューブ(別売)に移します。
   *1)で 1.5 mL チューブを用いた場合は懸濁液を新しいチューブに移す必要はありません。
3) 250 μL の②Buffer S2 を加え、転倒混和します(4 回)。
   *ボルテックスミキサーを使用しないで下さい。
   *懸濁液が透明で粘調な液体になるまで静置しますが、5 分以上静置しないで下さい。
4) 350 μL の③Buffer G3 を加え、すぐに転倒混和します(4～6 回)。
   *ボルテックスミキサーを使用しないで下さい。
5) 10 分間遠心します。
6) 上清をピペットで SV Column type Q(カラム:黄色)に移し、30 秒間遠心します。ろ液を捨て、同じチューブに SV Column type Q をセットします。
   *白色の沈殿物を吸わないように注意して下さい。
7) (オプション: ホストが *endA*⁺株の場合)500 μL の④Buffer AW を SV Column type Q に加え、30 秒間遠心します。ろ液を捨て同じチューブに SV Column type Q をセットします。
8) 700 μL の⑤Buffer PW を SV Column type Q に加え、30 秒間遠心します。ろ液を捨て同じチューブに SV Column type Q をセットします。
9) 1 分間遠心し、⑤Buffer PW を完全に除去した後、SV Column type Q を新しい 1.5 mL チューブ(別売)にセットします。
   *⑤Buffer PW が残存すると後のステップに影響します。カラムに付着しないように十分注意して下さい。
10) SV Column type Q のメンブレンの中心に 50 μL の⑥Buffer EB もしくは脱イオン水を加え、室温で 1 分間静置します。1 分間遠心し、プラスミド DNA 溶液を回収します。

【Low-copy プラスミド用プロトコール】

*本プロトコールでは EzClear Filter(カラム:紫色)を使用しません。

1) 遠心チューブ(別売)に 10 mL の培養液を加え、遠心機を用いて室温で 5 分間 10,000×*g* で遠心し、上清を捨て菌を回収します。2 mL チューブ(別売)を用いる場合は数回に分けて 1 分間遠心し、上清を捨て菌を回収します。
2) 400 μL の①Buffer S1 を 1) のチューブに加え、ゆっくりとペレットを懸濁します。懸濁液を 2 mL チューブに移します。
   *1)で 2 mL チューブを用いた場合は懸濁液を新しいチューブに移す必要はありません。
3) 400 μL の②Buffer S2 を加え、転倒混和します(4 回)。
   *ボルテックスミキサーを使用しないで下さい。
   *懸濁液が透明で粘調な液体になるまで静置しますが、5 分以上静置しないで下さい。
4) 600 μL の③Buffer G3 を加え、すぐに転倒混和します(4～6 回)。
   *ボルテックスミキサーを使用しないで下さい。
5) 10 分間遠心します。
6) 上清をピペットで 2 mL チューブ(別売)に移します。
7) 700 μL の上清を SV Column type Q(カラム:黄色)に移し、30 秒間遠心します。ろ液を捨て、同じチューブに SV Column type Q をセットします。
   *白色の沈殿物を吸わないように注意して下さい。
8) 上清がなくなるまで、7)の動作を繰り返します。
9) 500 μL の④Buffer AW を SV Column type Q に加え、30 秒間遠心します。ろ液を捨て同じチューブに SV Column type Q をセットします。
10) 700 μL の⑤Buffer PW を SV Column type Q に加え、30 秒間遠心します。ろ液を捨て同じチューブに SV Column type Q をセットします。
11) 1 分間遠心し、⑤Buffer PW を完全に除去した後、SV Column type Q を新しい 1.5 mL チューブ(別売)にセットします。
   *⑤Buffer PW が残存すると後のステップに影響します。カラムに付着しないように十分注意して下さい。
12) SV Column type Q のメンブレンの中心に 50 μL の⑥Buffer EB もしくは脱イオン水を加え、室温で 1 分間静置します。1 分間遠心し、プラスミド DNA 溶液を回収します。

◇本取扱説明書の補足資料として、本製品の操作方法を簡潔にまとめたプロトコールシートを当社 HP にて公開しております。こちらの資料もご活用下さい。

https://products.kanto.co.jp/uploads/pj46_m_pdf/765/pdf1.pdf

10. その他

1) 本製品は試験研究用です。医療や臨床診断の目的には使用しないで下さい。
2) 試薬及び器具等を廃棄する場合には、関係法令に従って処理して下さい。

関東化学株式会社 試薬事業本部 〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 (03)6214-1090 https://www.kanto.co.jp