

PrimePrep™ Plasmid DNA Extraction Kit

イントロダクション

PrimePrep Plasmid DNA Extraction Kitは大腸菌からプラスミドDNAを単離するためのシンプルで迅速、かつコスト効率の高い方法を提供します。

このキットは、LB培地で一晚培養した1~5 mlの大腸菌から、最大20 µgの高純度プラスミドDNAを調製するために設計されており、精製したプラスミドDNAはそのまま次のアプリケーションに使用可能です。フェノール抽出やエタノール沈殿は不要で、高品質のプラスミド DNAは少量の溶出バッファーで溶出されます。

キットコンポーネント (製品)

Reagents \ Cat. No.	K-1000 (50 prep.)	K-1002 (200 prep.)
Spin column	50 ea	50 ea x 4
Buffer PR	20 ml	55 ml
Buffer PL	20 ml	55 ml
Buffer PN	20 ml	75 ml
Buffer PO	20 ml	70 ml (35 ml x 2)
Buffer PW	10 ml	30 ml (15 ml x 2)
Buffer PE	10 ml	20 ml
RNase A Solution (10 mg/ml)	200 µl	550 µl

始めにご準備下さい

- ▶ RNase A 溶液を Buffer PR に加え、混合し、4°Cで保存します。
- ▶ Buffer POにエタノールを加えます。
→ エタノール量:12 ml (K-1002の場合 21 ml)
- ▶ Buffer PWにエタノールを加えます。
→ エタノール量:40 ml (K-1002の場合 60 ml)
- ▶ Buffer PLとPNに塩が析出していないことを確認します。
- ▶ **Note:** 沈殿がある場合は50°Cのウォーターバスで温めて溶かしてください。

Buffer PLを激しく攪拌しないでください

手順

- チューブやフラスコで大腸菌を培養します。

* 通常の卓上型微量遠心機で8,000rpm、室温で3分間遠心し、細菌細胞を回収する。

1. ペレット化した大腸菌細胞を250 μ lのBuffer PRに再懸濁し、微量遠心チューブに移します。ボルテックスとピペティングにより、細胞を完全に懸濁します。
2. 250 μ lのBuffer PLを加え、チューブを4~6回転倒させて静かに混和し、室温で5分間インキュベートします。ボルテックスは行わないで下さい。ボルテックスによりゲノムDNA がせん断される可能性があります。
3. 350 μ lの Buffer PN を添加し、直ちにチューブを静かに4~6回転倒させ、完全に混合します。ボルテックスは行わないで下さい。局所的な沈殿を避けるため、Buffer PN を加えた直後、溶液を十分に混合することが重要です。
4. 卓上型微量遠心機を用い、最高速度で 10 分間遠心します。
コンパクトな白色ペレットが形成されます。
5. 上清をデカンテーションまたはピペティングによりスピнкаラムに移します。
白い沈殿が混ざらないようにご注意ください。
6. 30~60秒間遠心する。ろ過された液を取り除き、スピнкаラムを同じチューブに再度セットします。
7. (オプション)500 μ lの Buffer PO を加え、30 秒間遠心します。
このステップは、*endA+* などのヌクレアーゼ活性や糖鎖含量の高い菌株を使用する場合にのみ必要です。
8. 700 μ l Buffer PW を加え、30 秒間遠心します。ろ過された液を取り除き、スピнкаラムを同じチューブに再度セットします。
9. さらに 1~2 分遠心し、残留洗浄バッファー を除去します。
洗浄バッファーに含まれる残留エタノールは、その後の酵素反応を阻害する可能性があります。
10. スピнкаラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブにセットします。(キットに含まれません)
11. Buffer PE(10mM Tris-HCl, pH8.5)または脱イオン蒸留水を50 μ l 加え、1分間静置した後、1分間遠心する。