

GenElute™ Five-Minute Plasmid Miniprep Kit

ユーザーガイド

製品番号
PFM10、PFM50、およびPFM250

SIGMA-ALDRICH®

注文情報

製品番号	製品概要	容量
PFM10	GenElute Five-Minute Plasmid Miniprep Kit	10回分
PFM50	GenElute Five-Minute Plasmid Miniprep Kit	50回分
PFM250	GenElute Five-Minute Plasmid Miniprep Kit	250回分

関連製品

製品番号	製品概要	容量
PLN10	GenElute Plasmid Miniprep Kit	10回分
PLN70	GenElute Plasmid Miniprep Kit	70回分
PLN350	GenElute Plasmid Miniprep Kit	350回分
NA0200S	GenElute HP Plasmid Midiprep Kit	4回分
NA0200	GenElute HP Plasmid Midiprep Kit	25回分
NA0300S	GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit	4回分
NA0300	GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit	10回分
NA0310	GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit	25回分
NA0400S	GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit	4回分
NA0400	GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit	10回分
NA0410	GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit	25回分
NA0500	GenElute HP Plasmid Megaprep Kit	5回分
NA0600	GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Megaprep Kit	5回分

製品の再注文はお近くの弊社販売代理店にて承
っています。

GenElute™ Five–Minute Plasmid Miniprep Kit

目次

製品概要	2
注意事項と免責事項	3
保存方法と安定性.....	3
使用前の準備.....	3
手順	4
結果	7
参考文献	7
トラブルシューティングガイド	8
経験者向けプロトコル:吸引法	12
経験者向けプロトコル:遠心法	13

製品概要

GenElute Five-Minute Plasmid Miniprep Kitは、組換え大腸菌培養液からプラスミドDNAを簡単かつ迅速に抽出する製品です。本キットでは、細胞の回収、再懸濁、アルカリ溶解、ライセートの洗浄など、従来のプラスミド精製操作の多くを省いた全く新しい方法が採用されています。この合理的な方法によって、5分以内に、プラスミドDNAを大腸菌培養液から直接回収することができます。

LB (Luria-Bertani) 培地でオーバーナイト培養した組換え大腸菌をLysis Reagentで短時間 (1~2分) 処理するため、培地を事前に除去することなく、迅速に細胞溶解とRNA分解を行なうことができます。

次に、ライセートにBinding Solutionを混合し、DNAをシリカベースのカラムに結合させます。夾雑物をWash Solutionによって除去し、結合したプラスミドDNAをTris/バッファーまたは水で溶出します。溶出したプラスミドDNAは、精製後の様々な用途にそのまま使用することができます。

GenElute Five-Minute Plasmid Miniprep Kitは、キャピラリーDNAシーケンシング、クローニングのスクリーニング、制限酵素による切断、およびPCRに使用するプラスミドDNAを迅速に精製する目的に適しています。通常、LB培地でオーバーナイト培養した400 μ Lの培養液から得られる高コピープラスミドの収量は2~6 μ gとなります。DNAシーケンシングに使用する場合、プラスミドDNAを定量するには、1 μ Lの溶出液に対してアガロースゲル電気泳動またはPicoGreen®法を行なうことを推奨します。低コピープラスミドの場合、制限酵素による切断やPCRに使用するプラスミドDNAの精製にご使用いただけます。

構成	製品番号			
	10回分	50回分	250回分	
Lysis Reconstitution Solution	L4292	0.9 mL	3.5 mL	15 mL
Lysis Reagent	L4167	15 mg	50 mg	250 mg
Binding Solution	B0310	6 mL	30 mL	135 mL
Column Preparation Solution	C2112	7 mL	35 mL	150 mL
Wash Solution Concentrate	W3514	3 mL	15 mL	70 mL
Elution Solution (10 mM Tris, pH 8.5)	E7777	1.5 mL	8 mL	45 mL
GenElute Miniprep Binding Column	G4669	10個	50個	250個
Collection Tubes, 2.0 mL	T5449	3 × 10個	3 × 50個	3 × 250個

キットの他にをご用意いただく試薬および機器

- ・Ethanol (95–100%)、製品番号E7148、E7023、または459836
- ・適切な抗生物質を添加したLB培地
- ・12,000×g以上での遠心が可能なマイクロ遠心機
- ・ルアーフィッティング付きの吸引マニフォールド (吸引法の場合のみ)
- ・最大吸引力500 mbar以上の吸引マニフォールド (吸引法の場合のみ)

注意事項と免責事項

GenElute Five-Minute Plasmid Miniprep Kitは試験研究用製品です。医薬品、家庭での使用など試験研究用以外の用途には使用できません。危険性と安全な取り扱いについては安全性データシート (MSDS) をご覧ください。

保存方法と安定性

本キットは室温で保存してください。溶解したLysis Reagentは、短期間 (3ヶ月以内) であれば2~8℃で、長期間 (3ヶ月以上) であれば-20℃で保存してください。

使用前の準備

1. 細菌を培養します。

GenElute™ Five-Minute Plasmid Miniprep Kitは、LB培地で培養した細菌培養液に対して最適化されています。適切な抗生物質を添加したLB培地を用いて、OD₆₀₀値が1.5~3.0となるまで培養してください (約16~19時間)。培養し過ぎないようにご注意ください。最適な結果を得るには、OD₆₀₀値が3.0に達する前の培養液を使用してください。TBなど栄養が豊富な培地は使用しないでください。栄養が豊富な培地で培養すると、細胞密度が著しく高くなる場合があります。この場合、精製システムに過剰の負荷がかかり、カラムが詰まる可能性もあります。

良好な結果を得るには、振とう機から外した後、できるだけ速やかにプラスミドの精製を行なってください。古い培養液や2~8℃で保存していた培養液を使用する場合は、培養液を十分にボルテックスしてからプラスミドの精製を行なってください。

1回の精製に使用する培養液がプロトコル標準の400 μLに満たない場合は、それに応じて使用する試薬の量を減らしてください。溶解したLysis Reagentは培養液量の1/10、Binding Solutionは培養液量と等量を使用してください。また、培養液量が400 μLを超える場合は、カラムが詰まる可能性がありますので、吸引法での精製は避けてください。

2. Lysis Reagentを調製します。

Lysis Reconstitution Solutionを軽く混ぜ、氷上で5~10分間もしくは冷蔵庫で10分以上放置して冷却してください。次表を参考に、事前に冷却したLysis Reconstitution Solutionの適量をLysis Reagentのバイアルに加え、粉末が完全に溶けるまで十分に混ぜてください。溶解したLysis Reagentは、短期間 (3ヶ月以内) であれば2~8℃で、長期間 (3ヶ月以上) であれば-20℃で保存してください。

容量	Lysis Reconstitution Solutionの添加量
10回分	0.75 mL
50回分	3 mL
250回分	14 mL

3. Wash Solutionを調製します。

初めて使用するときは、次表を参考に、Wash Solution Concentrateのボトルに適量の95~100%エタノールを添加してください。

容量	エタノールの添加量
10回分	12 mL
50回分	60 mL
250回分	280 mL

エタノールの蒸発を防ぐため、希釈したWash Solutionのキャップは必ず締めてください。

手順

注意: 全ての遠心は最高速度(12,000×g以上)、室温で行なってください。各手順で推奨する遠心時間は最短のもので、必要に応じて延長しても構いません。

1. 遠心法

1. 培養細胞を溶解します。

2 mL Collection Tube (付属) 中で、事前に冷却したLysis Reagentの溶液(「使用前の準備」を参照) **40 μL**を、400 μLのオーバーナイト培養液に添加してください。素早く転倒混和するか、ボルテックスまたはピペッティングによって軽く混ぜてください(3~5秒間)。室温で2分間インキュベーションしてください。通常、2分後には透明の溶液になります。

注意: 精製後の用途によっては収量が最大でなくてもよく、その場合、溶液のインキュベーション時間は1分間でも構いません。また、密度の高い培養液(OD₆₀₀値 > 3.0)や大腸菌の株(XL1-Blueなど)によっては、プラスミドの収率を高めるため、インキュベーション時間を延長する必要があります。そのような場合には混合液が透明になるまでインキュベーションしてください。インキュベーション時間を長くしてもプラスミドDNAの純度が低下することはありません。

2. カラムを準備します。

GenElute Miniprep Binding Columnを2 mL Collection Tube (付属) に挿入します。

各カラムに**500 μLのColumn Preparation Solution**を添加し、10秒間遠心してください。カラムを通過した液を捨て、カラムをCollection Tubeに戻して次の手順に進んでください。

注意: この手順は溶解のインキュベーションの最中に行なうことができます。しかし、必要なカラムの数が多い場合は、カラムの準備をプラスミド精製の前にまとめて行なったほうが効率的です。前洗浄したカラムはその日のうちに使用してください。こうして簡単にカラムを洗浄するだけで、プラスミドを安定的に高い収率で得ることが可能になります。

3. DNAを結合させます。

ライセートに**400 μ LのBinding Solution**を加え、チューブのフタを閉めて、15回以上充分に転倒混和してください。

ボルテックスは行わないでください。前洗浄したカラムを2 ml Collection Tubeに装着し、混合液を注ぎ入れるか、ピペットで混合液約780 μ Lを移し入れ、20秒間遠心してください。カラムを通過した溶液は捨ててください。

注意: Binding Solutionの添加後に、ライセート混合液の混和を充分に行わないと、収率が低下する可能性があります。プラスミドDNAはBinding Solution中で安定です。混合液をカラムに移し入れる際に、最後の一滴まで入れる必要はありません。カラムの容量は、フタを閉じた状態で最大約780 μ Lです。

4. カラムを洗浄します。



重要:本キットを初めて使用するときは、Wash Solution Concentrateに適量のエタノールを添加してください(「使用前の準備」を参照)。

各カラムに700 μ Lの希釈したWash Solutionを添加し、20秒間遠心してください。カラムを通過した液体は、デカンテーションにより捨ててください。

さらに、各カラムに**200 μ Lの希釈したWash Solution**を入れ、30秒間遠心してフィルターを洗浄、乾燥してください。乾燥後、通過した液がカラムに接触しないように注意しながら、カラムを遠心機から取り出してください。通過した液が乾燥させたカラムに接触した場合には、カラムを20秒間、再遠心してから溶出の工程に進んでください。

5. DNAを溶出させます。

カラムを付属の新しい2 mL Collection Tubeに移し替えてください。**40 μ LのElution Solution** (必要に応じて、水)を、フィルター表面に直接添加し、30秒間、遠心によって溶出させてください。溶出液にはプラスミドDNAが含まれています。この溶液はすぐに使用するか、 -20°C で保存してください。

注意:より濃度の高いプラスミドDNA溶液が必要な場合は、Elution Solutionの量を30 μ Lまで減らしてください。しかし、この場合、プラスミドの総収量は減少する可能性があります。

II. 吸引法

1. 培養細胞を溶解します。

2 mL Collection Tube (付属) 中で、**事前に冷却したLysis Reagentの溶液** (「**使用前の準備**」を参照) **40 μ L**を、400 μ Lのオーバーナイト培養液に添加してください。素早く転倒混和するか、ボルテックスまたはピペッティングによって軽く混ぜてください(3~5秒間)。室温で2分間インキュベーションしてください。通常、2分後には透明の溶液になります。

注意: 精製後の用途によっては収量が最大でなくてもよく、その場合、溶液のインキュベーション時間は1分間でも構いません。また、密度の高い培養液(OD₆₀₀値 > 3.0)や大腸菌の株(XL1-Blueなど)によっては、プラスミドの収率を高めるため、インキュベーション時間を延長する必要があります。そのような場合には混合液が透明になるまでインキュベーションしてください。インキュベーション時間を長くしてもプラスミドDNAの純度が低下することはありません。

2. カラムを準備します。

GenElute Miniprep Binding Columnを吸引マニフォールドに装着し、各カラムに**500 μ LのColumn Preparation Solution**を添加してください。吸引装置のスイッチを入れ、液体を吸引してください。液体が完全に通過したら吸引装置のスイッチを切ってください。

注意: この手順は溶解のインキュベーションの最中に行なうことができます。しかし、必要なカラムの数が多い場合は、カラムの準備をプラスミド精製の前にまとめて行なったほうが効率的です。前洗浄したカラムはその日のうちに使用してください。こうして簡単にカラムを洗浄するだけで、プラスミドを安定的に高い収率で得ることが可能になります。

3. DNAを結合させ、カラムを洗浄します。



重要: 本キットを初めて使用するときは、Wash Solution Concentrateに適量のエタノールを添加したことを確認してください (「**使用前の準備**」を参照)。

ライセートに400 μ LのBinding Solutionを加え、チューブのフタを開けて、15回以上十分に転倒混和してください。

ボルテックスは行なわないでください。混合液は、上下に1回ピペッティングしてから、吸引マニフォールドに装着した洗浄済みのカラムにピペットで移し入れてください。吸引装置のスイッチを入れてください。ライセートがカラムを通過したら、**1 μ Lの希釈したWash Solution**を各カラムに添加してください。液体が完全に通過したら吸引装置のスイッチを切ってください。

注意: Binding Solutionの添加後に、ライセート混合液の混和を十分に行なわないと、収率が低下する可能性があります。プラスミドDNAはBinding Solution中で安定です。ライセート混合液をカラムに移し入れる前にピペッティングを行なうと、大型の凝集体を壊すことができます。この凝集物が存在したままだと、特に培養液の細胞密度が高い場合に、カラムが詰まる原因となります。

4. **カラムを遠心して乾燥させます。** カラムを吸引マニフォールドから外し、付属の2 mL Collection Tubeに挿入してください。30秒間遠心して、フィルターを乾燥させてください。乾燥後、通過した液がカラムに接触しないように注意しながら、カラムを遠心機から取り出してください。通過した液が乾燥させたカラムに接触した場合には、カラムを20秒間、再遠心してから溶出の工程に進んでください。

5. **DNAを溶出させます。**

DNAを溶出させます。

カラムを付属の新しい2 μ L Collection Tubeに移し替えてください。**40 μ LのElution Solution** (必要に応じて、水)を、フィルター表面に直接添加し、30秒間、遠心によって溶出させてください。溶出液にはプラスミドDNAが含まれています。この溶液はすぐに使用するか、-20°Cで保存してください。

注意:より濃度の高いプラスミドDNA溶液が必要な場合は、Elution Solutionの量を30 μ Lまで減らしてください。しかし、この場合、プラスミドの総収量は減少する可能性があります。

結果

DNAのシーケンシングに使用する場合、1 μ Lの溶出液について、アガロースゲル電気泳動またはPicoGreen法を実施してプラスミドDNAの定量を行なうことを推奨します。UVの吸光度による測定は、溶出液中のプラスミド濃度が実際の2~3倍の値となるため、お勧めできません。

関連製品	製品番号	関連製品	製品番号
Water, Molecular Biology Reagent	W4502	Gel Loading Solution	G2526
Precast Agarose Gels, 1.0%, 8 well	P5472	DirectLoad™ Wide Range DNA Marker	D7058
TAE Buffer (10X)	T9650	Ethidium bromide, aqueous, 10 mg/mL	E1510
TBE Buffer (10X)	T4415	Capillary Electrophoresis Running Buffer (10X)	B4930
SeqSaver™ Sequencing Premix Dilution Buffer	S3938		

参考文献

1. Vogelstein, B. and Gillespie, D., Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 615-619 (1979).

トラブルシューティングガイド

プラスミドDNAの収率が低い

原因——Wash Solutionの濃度が濃すぎる。

対策——キットを初めて使用するときは、Wash Solution Concentrateを規定量のエタノールで希釈する必要があります。エタノールの蒸発を防ぐため、希釈したWash Solutionのキャップは必ず締めてください。

原因——培養液が古すぎる。

対策——古いアガープレートから採取した大腸菌や、何回も継代した大腸菌でオーバーナイト培養を行なうと、プラスミドの収率が大幅に低下する場合があります。冷凍したグリセロールストックから採取した新しい大腸菌を画線播種し、新鮮なプレートから採取した単一のコロニーを植菌してオーバーナイト培養してください。

原因——プラスミドの複製が十分でない。

対策——細胞がLB培地中、最適な条件で培養されたかどうかを確認してください。

原因——抗生物質の活性が不十分である。

対策——大腸菌のオーバーナイト培養には、新しい抗生物質を使用してください。多くの抗生物質は光感受性であるため、2~8℃で長期間保存すると失活します。

原因——細胞の溶解が十分でない。

XL1-Blueなどの大腸菌株には、2分以上の溶解処理が必要となることがあります。培養液が透明になるまで、2分以上インキュベーションしてください。

原因——Binding Solution添加後の混和が不十分であった。

対策——Binding Solutionを添加後、転倒混和を15回以上行ない、ライセート混合液を十分に混和させてください。

原因——カラムがColumn Preparation Solutionで処理されていない。

対策——DNAを結合させる前に、カラムを500 mLのColumn Preparation Solutionで洗浄してください。こうして簡単にカラムを洗浄するだけで、プラスミドを安定の高い収率で得ることが可能になります。

吸引濾過時にカラムが詰まる

原因——細胞密度が高すぎる。

対策——詰まったカラムを吸引マニフォールドから外し、2 mL Collection Tubeに挿入し、以降の手順は遠心法で行なってください。

培養液はOD₆₀₀ > 3.0に達する前に使用してください。TBなどの栄養豊富な培地を使用しないでください。

原因——カラムに移し入れる前に、ライセートとBinding Solutionがよく混ざり合っていない。

対策——ライセート混合液をピペットで1回上下させて混和し、大型の凝集体を壊してからカラムに移し入れてください。

精製後の酵素反応がうまくいかない

原因——カラムを通過したWash Solutionが溶出液に混入している。

対策——カラムを通過した溶液が乾燥させたカラムに接触した場合、カラムを20秒間再遠心してから溶出の手順に進んでください。

原因——シーケンシング反応に使用したプラスミドDNAテンプレートの量が少なすぎる、または多すぎる。

対策——1 μ Lの溶出液についてアガロースゲル電気泳動またはPicoGreen法を行なって、プラスミドDNAの濃度を測定してください。UVの吸光度による定量は行わないでください。

メモ

メモ

経験者向けプロトコル： 吸引法

全ての遠心操作は、最大速度および室温で行なってください。

1 培養細胞を溶解します。

- 2 mL Collection Tube中で、溶解したLysis Reagent 40 μ Lを400 μ Lのオーバーナイト培養液に添加します。素早く転倒混和して軽く混ぜた後、2分間インキュベーションしてください。
キットを初めて使用するときは、必ずLysis Reconstitution SolutionをLysis Reagentのバイアルに添加したことを確認してください。

2 カラムを準備します。

- 500 μ LのColumn Preparation Solutionを、吸引マニフォールドに装着したカラムに添加し、吸引装置のスイッチを入れてください。液体が完全に通過したら吸引装置のスイッチを切ってください。

3 DNAを結合させ、カラムを洗浄します。

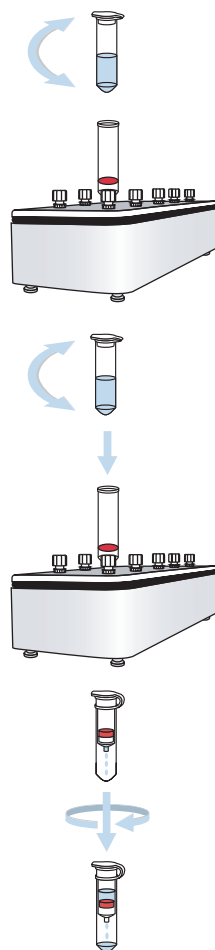
- 400 μ LのBinding Solutionを添加し、15回以上転倒混和してください。
- 混合液をピペットで1回上下させてから、吸引マニフォールドに装着した洗浄済みのカラムにピペットで移し入れ、吸引装置のスイッチを入れてください。
- 液体が通過した後、1 μ Lの希釈したWash Solutionを各カラムに添加してください。Wash Solutionが完全に通過したら吸引装置のスイッチを切ってください。
本キットを初めて使用する際には、必ずWash Solution Concentrateをエタノールで希釈したことを確認してください。

4 カラムを遠心して乾燥させます。

- カラムを新しい2 mL Collection Tubeに移し、30秒間遠心して乾燥させてください。

5 プラスミドDNAを溶出させます。

- カラムを新しい2 mL Collection Tubeに注意深く移してください。
- 40 μ LのElution Solutionを添加し、30秒間遠心してください。



経験者向けプロトコル： 遠心法

全ての遠心操作は、最大速度および室温で行なってください。

1 培養細胞を溶解します。

- 2 mL Collection Tube中で、溶解したLysis Reagent 40 μL を400 μL のオーバーナイト培養液に添加します。素早く転倒混和して軽く混ぜた後、2分間インキュベーションしてください。
- キットを初めて使用するときは、必ずLysis Reconstitution SolutionをLysis Reagentのバイアルに添加したことを確認してください。



2 カラムを準備します。

- 500 μL のColumn Preparation Solutionを、2 mL Collection Tubeに装着したカラムに添加してください。10秒間遠心し、カラムを通過した液体を捨ててください。



3 DNAを結合させます。

- 400 μL のBinding Solutionを添加し、15回以上転倒混和してください。
- 混合液(約780 μL)を、洗浄済みのカラムにピペットで移すか、デカンテーションによって注ぎ入れた後、20秒間遠心してください。カラムを通過した液体を捨ててください。



4 洗浄して夾雑物を取り除きます。

- カラムに700 μL の希釈したWash Solutionを添加した後、20秒間遠心してください。カラムを通過した液体を捨ててください。
- カラムに200 μL の希釈したWash Solutionを添加した後、30秒間遠心してください。



本キットを初めて使用する際には、必ずWash Solution Concentrateをエタノールで希釈したことを確認してください。

5 プラスミドDNAを溶出させます。

- カラムを新しい2 mL Collection Tubeにゆっくりと移してください。
- 40 μL のElution Solutionを添加し、30秒間遠心してください。



国際本部

3050 Spruce St., St. Louis, MO 63103

(314) 771-5765

sigma-aldrich.com

ご注文／お近くの代理店にお問い合わせください。

弊社カスタマーサービス (03) 5796-7320・Fax (03) 5796-7325

テクニカルサポート (03) 5796-7330・sigma-aldrich.com/techservice

開発／大量製造に関するお問い合わせSAFC® (800) 244-1173

SIGMA-ALDRICH®

シグマ アルドリッチグループ



©2007 Sigma-Aldrich Co. All rights reserved.

SIGMA、、SAFC、**SAFC®**、SIGMA-ALDRICH、、ISOTEC、ALDRICH、、FLUKA、、SUPELCOは、Sigma-Aldrich Co.とその関連会社であるSigma-Aldrich Biotechnology LPの商標です。

Riedel-de Haën®は、Riedel-de Haën GmbHからのライセンスに基づく商標です。SIGMA製品の販売は、Sigma-Aldrich, Inc.を通じて行なわれます。Sigma-Aldrich, inc.は、同社製品が本ガイドや他のSigma-Aldrich発行物に記載されている情報に適合することを保証します。購入者は自身の責任において、目的とする用途に同社製品が適しているかを判断してください。場合により、他の条項も適用されます。送り状や内容明細票の裏面をご覧ください。GenElute®、EZMix®、DirectLoad®、SAFC®、Sigma Advanced Technology®はSigma-Aldrich Co.とその関連会社であるSigma-Aldrich Biotechnology LPの商標です。

特許出願中。

† PCR法は、Hoffman-LaRoche社が所有する特許によって保護されています。

PicoGreenはMolecular Probes社の登録商標です。

ライフサイエンス、

先端技術、サービスを主導し、皆様の研

究を成功に導くお手伝いをしています。

00097-502620

0126