

GenElute™ HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit

SCIENCE @ WORK



User Guide

Catalog Nos. 製品番号

NA0400

NA0400S

NA0410

注文情報

製品番号	製品概要	容量
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

関連製品

製品番号	製品概要	容量
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

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 HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep 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	5
DNAの濃縮	7
DNAの定量	7
参考文献	7
トラブルシューティングガイド	8
補足	11
経験者向けプロトコル	13

製品概要

エンドキシンは抽出したプラスミドによく見られる夾雑物で、エンドキシンに感受性のある真核生物の細胞系へのトランスフェクション効率を低下させます。GenElute™ HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kitは、組み換え大腸菌 (*E. coli*) からエンドキシンフリーのプラスミドDNAを簡便かつ迅速に分離することができる製品です。本キットでは、フィルターカラムでの吸引により細胞ライセートの洗浄を迅速に行ない、シリカカラムでプラスミドDNAを結合します。Luria Broth (LB) 培地でオーバーナイト培養した培養液から、およそ40分で、0.1 Endotoxin Unit/mgが0.1未満のプラスミドDNAを最大で1.2 mg抽出することができます。なお、プラスミド収率とエンドキシンレベルは、使用する株、プラスミド、培地の種類によって異なりますのでご注意ください。

オーバーナイト培養した組換え大腸菌 (*E. coli*) の培養液を遠心して大腸菌を回収し、改変アルカリSDS溶解法で溶解します。ライセートを濾過によって清澄化し、エンドキシンフリープラスミドの抽出用に最適化されたBinding Solutionを添加します。このとき、プラスミドDNAはシリカ膜に結合しますが、エンドキシンは結合しません。次に、洗浄を2回行なって夾雑物を除去します。最後に、結合させたDNAをEndotoxin-Free Waterで溶出させます。

得られたプラスミドDNAは、主としてスーパーコイル構造を取っています。ゲノムDNAおよびRNAは、臭化エチジウム染色アガロースゲル電気泳動では検出されません。得られたDNAは、トランスフェクション、形質転換、制限酵素による切断、ライゲーション、シークエンシング、PCRなど、後の分析にそのまま使用することができます。

GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kitは、陰イオン交換法などの方法に比べて所要時間が大幅に短く、高い収率で、トランスフェクション効率の高いプラスミドDNAを精製することのできるキットです。Sigma Advanced Technology™ の認証を受けています。



付属する試薬	製品番号	NA0400S 4回分	NA0400 10回分	NA0410 25回分
Column Preparation Solution	C2112	60 ml	225 ml	2 x 225 ml
RNase A Solution	R6148	1.5 ml	1.5 ml	2.5 ml
Resuspension Solution	R1149	60 ml	150 ml	375 ml
Lysis Buffer	L1912	60 ml	150 ml	375 ml
Neutralization Solution	N7411	60 ml	150 ml	375 ml
Binding Solution	B1810	45 ml	115 ml	280 ml
Wash Solution 1	W0263	60 ml	150 ml	375 ml
Wash Solution 2	W4639	12 ml	30 ml	75 ml
Endotoxin-Free Water	2107	50 ml	50 ml	100 ml
GenElute HP Endotoxin-Free Maxiprep Filter	H3538	4	10	25
GenElute HP Endotoxin-Free Maxiprep Filter	R4778	5	10	25
GenElute HP Maxiprep Binding Column	G4917	4	10	25
Collection Tubes – 50 ml	C4353	8	20	50

キットの他にご用意いただく試薬および機器

- ・5000 × gでの遠心が可能な遠心機
- ・3,000 × gでの遠心が可能なスイング型バケットローター付き遠心機
- ・最大吸引力500 mbar以上の吸引装置単位の換算については補足2をご覧ください。
- ・Vacuum manifold、製品番号VM20
- ・Ethanol (95–100%)、製品番号E7148、E7023、または459836
- ・3 M Sodium Acetate Buffer Solution, pH 5.2 (オプション)、製品番号S7899
- ・Isopropanol (オプション)、製品番号I9030、I0398、またはI9516

注意事項と免責事項

GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep 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。

保存法と安定性

本キットは室温で保存してください。RNase A SolutionとResuspension Solutionとの混合液は2~8°Cで保存してください。プロトコルではNeutralization Solutionを冷却して使用することを推奨していますので、Neutralization Solutionも2~8°Cで保存することができます。

使用前の準備

1. スターター培養液を準備します。

新鮮な状態で画線播種したプレートから単一のコロニーを採取し、3~5 mlのLB培地に植菌してスターター培養液を準備してください。適切な抗生物質を使用し、250~300 rpmで振とうしながら37°Cで約8時間、インキュベーションしてください。スターター培養液を適切な量のLB培地で500~1000倍に希釈し、250~300 rpmで振とうしながら37°Cで12~16時間、インキュベーションしてください。LB培地で培養した場合は、通常、600 nmの吸光度が2~4に達します。本キットを使用する場合、TB培地など栄養豊富な培地での培養は避けてください。
2. 適切な培養液の量を選択します。

通常、培養液の使用量を150 mlにすると、プラスミドの収率とエンドキシンレベルが良好となります。しかし、最適な培養液の量は、使用する株、プラスミド、培養液の密度によって異なります。培養液によって細菌細胞数が大きく異なるためです。

細胞数が少なすぎる (cell massが低い) と、DNAの収率が低下し、中和後に微小な綿状沈殿物が生じることがあります。これは、濾過中にフィルターが詰まる原因となります。逆に、細胞数が多すぎる (cell massが高い) と、細菌が十分に溶解しないためプラスミドDNAがあまり遊離せず、場合によっては濾過中にライセートが細胞片に絡まり、収率が低下します。cell massの算出を行なうことで、オーバーナイト培養液から回収できるプラスミドの最大量を確認することができます。

2. 適切な培養液の量を選択します。(続き)

最良の結果を得るため、cell massに基づいて培養液の使用量を定めるようにしてください。総cell massの推奨値は200~600ですが、一般的には450が最適値です。培養液の最適な使用量を決定するには、オーバーナイト培養液の600 nmでの吸光度(A_{600})を測定し、それを元に次式の計算を行なってください。

$$\text{Volume}_{\text{optimal}} = \frac{450}{A_{600}}$$

3. 試薬を十分に混和します。

試薬に沈殿が見られないか確認してください。保管中に、キットの試薬に沈殿が生じた場合には、沈殿が溶けるまで55~65°Cで温めてください。試薬は室温まで冷却してからご使用ください。

4. Resuspension/RNase A Solutionを調製します。

RNase A Solution(製品番号R6148)のチューブを軽くスピンドウンし、溶液をチューブの底に集めてください。下表を参考に、適量のRNase A SolutionをResuspension Solution(製品番号R1149)のボトルに添加してください。2~8°Cで保存してください。

容量	RNase A Solutionの添加量
4回分	300 μ l
10回分	750 μ l
25回分	1.9 ml

5. Wash Solution 2を調製します。

初めて使用する際には、下表を参考に、適量の95~100%エタノールをWash Solution 2(製品番号W4639)のボトルに添加してください。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。

容量	エタノールの添加量
4回分	48 ml
10回分	120 ml
25回分	300 ml

6. Neutralization Solutionを冷却します。

Neutralization Solution(製品番号N7411)は冷却して使用するため、2~8°Cで保存してください。

手順

全ての操作は室温で行なってください。吸引装置を使用する際は、吸引力が500 mbar以上であることを確認してください(単位の換算については補足2を参照)。

1. 細胞を回収します。 150 mlのオーバーナイト培養液を5000 × gで10分間遠心し、上清を捨ててください。

重要: 培養液の最適な使用量は、cell massから算出することができます。「使用前の準備」を参照してください。

2. 細胞を再懸濁させます。 12 mlのResuspension/RNase A Solutionを細胞ペレットに入れ、ピペティングまたはボルテックスによって完全に懸濁させてください。懸濁が不十分な場合、プラスミドDNAの収率が低下することがあります。

重要: RNase A SolutionをResuspension Solutionに添加したことを確認してください。

3. 細胞を溶解します。 12 mlのLysis Solutionを添加して、懸濁している細胞を溶解します。時間を置かず、混合液を穏やかに6~8回転倒混和してください。混合液が粘性のある透明な液体になるまで、3~5分間静置してください。

振とうやボルテックスは行なわないでください。激しく混和するとゲノムDNAが切断されるため、プラスミドDNAに染色体DNAが混入する可能性があります。

溶解反応は5分以内に終了させてください。アルカリによる長時間の溶解反応はスーパーコイル状のプラスミドを変性させ、精製後の用途に使用できなくなる可能性があります。

4. ライセートフィルターを準備します。 Collection TubeにVacCapをしっかりとかぶせてください。VacCapにGenElute HP Endotoxin-Free Maxiprep Filterを装着してください。組み立てたフィルターアセンブリは、適当なホルダーに置いてください。



5. ライセートを中和します。 手順3で調製した細胞の混合液に冷却したNeutralization Solution 12 mlを添加し、穏やかに6~8回転倒混和して中和してください。速やかにライセートをフィルターアセンブリに注ぎ入れ、5分間インキュベーションしてください。白い凝集塊(細胞片、タンパク質、脂質、SDSおよび染色体DNA)が生じます。手順6でライセートを濾過するまでは、Binding Solutionを添加しないでください。

重要: Neutralization Solutionが2~8°Cに冷却されていることを確認してください。

6. ライセートを濾過します。 VacCapを吸引装置に装着して吸引を開始し、ライセートを濾過してください。ライセートがフィルターを通過するまで1分以上かかります。ライセートを流し通し終えたら吸引装置のスイッチを切り、装置をVacCapから取り外してください。白色の綿状の沈殿物中にライセートの一部が残ることがあります。この溶液を完全に回収する必要はありません。

重要: 吸引力を解除してからフィルターを取り外してください。

7. Binding Solutionを添加します。
8. カラムを準備します。
9. プラスミドDNAを結合させます。

▲ 重要: 全てのライセートを添加し終える前に、表面を露出させないようにしてください。



VM20吸引マニフォールド

10. Wash Solution 1を添加します。
11. Wash Solution 2を添加します。

▲ 重要: Wash Solution 2のボトルにエタノールを加えてあることを確認してください。

12. カラムを乾燥させます。

濾過したライセートに9 mlのBinding Solutionを加えて、6~8回穏やかに転倒混和してください。

GenElute HP Maxiprep Binding ColumnをSIGMA VM20吸引マニフォールドにセットしてください。カラムに12 mlのColumn Preparation Solutionを入れ、吸引を開始して溶液を通過させてください。この手順は、前の手順でのインキュベーションの間に行なうと効率的です。

吸引装置を動作させた状態で、準備したカラムに手順7の混合液を移し入れてください。全てのライセートを流し通してください。

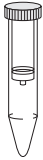
全てのライセートを添加し終える前に、表面を露出させないようにしてください。一度にライセートの全量を注入することはできませんので、カラムをあふれさせないように注意してください。全てのライセートを入れる前にカラムが空になると、残りのライセートがカラムを通過する速度が著しく低下します。この状態になるとライセートの通過には数分かかりますが、プラスミドの収率やエンドキシンレベルへの影響はありません。

12 mlのWash Solution 1をカラムに入れて、そのまま流し通してください。

12 mlのWash Solution 2をカラムに入れて、そのまま流し通してください。

洗浄後、10分以上の吸引を行なってカラムを乾燥させてください。ひとつの吸引マニフォールドに7本以上のカラムを接続する場合は、乾燥の時間を20分以上にしてください。吸引力が500 mbar以上であることを確認してください(単位の換算については補足2を参照)。

13. プラスミドDNAを溶出させます。



カラムを新しい50 ml Collection Tubelに移し替えてください。3 mlのEndotoxin-Free Waterをカラムに添加してください。次表(溶出オプション)を参考に、適切な遠心速度を決定してください。

プラスミドの収率を最大にする場合: スイング型ペケットローターを用いて、カラム/Collection Tubeのユニットを3000 × g で5分間遠心してください。

プラスミド濃度を最大にする場合: スイング型ペケットローターを用いて、カラム/Collection Tubeのユニットを1000 × g で5分間遠心してください。

遠心速度	平均収量	収率	相対濃度
3000 × g	2.5 ml	100%	100%
1000 × g	1.2 ml	80%	175%

溶出液にはプラスミドDNAが含まれています。このDNAはすぐに使用することもできますが、沈降によって濃縮することもできます。保存する場合は、短期間であれば保存温度を2 ~8°Cに、長期間であれば-20°Cにしてください。

DNAの濃縮

重要: アルコール沈殿法は、精製したプラスミドをさらに濃縮したい場合にのみ行ってください。

溶出液をパイロジェンフリー(エンドキシンフリー)の遠心チューブに移してください。付属のCollection Tubeは、5000 × g以上での遠心には使用できませんのでご注意ください。

回収したプラスミドに0.1倍量の3.0 M Sodium Acetate Buffer Solution (pH 5.2)と0.7倍量のイソプロパノールを添加してください。よく転倒混和してから、15,000 × g以上で、4°Cで30分間遠心してください。ペレットを乱さないように注意しながら上清のデカンテーションを行ってください。DNAペレットを1.5 mlの70%エタノールでリンスし、前述の条件で10分間遠心してください。デカンテーションを慎重に行なって上清を取り除いた後、ペレットを風乾して残りのエタノールを蒸発させてください。DNAペレットは適量のEndotoxin-Free Waterで溶解してください。

DNAの定量

プラスミドDNAの収率と純度は光学的分析により測定できます。通常、吸光度比 $(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})$ は1.8 ~2.0となります。 A_{320} の値は、バックグラウンドの吸光度を補正するために使用しています。DNAのサイズと純度はアガロースゲル電気泳動やパルスフィールド電気泳動で確認できます。

参考文献

1. Birnboim, H. C.; Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 1979, 7, 1513-1522.
2. Vogelstein, B.; Gillespie, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 615-619.

トラブルシューティングガイド

濾過したライセートが透明でない(カラムが詰まる)	原因——細胞の保存方法が適切でなかった。 対策——培養液をすぐに使用しない場合は、細胞をペレット状にして-70°Cで保存してください。
ライセートを添加したところ、カラムが詰まってしまったように感じられる	原因——全てのライセートを添加する前にカラムが空になった。 対策——全てのライセートを添加し終える前に、表面を露出させないようにしてください。全てのライセートを入れる前にカラムが空になると、残りのライセートがカラムを通過する速度が著しく低下します。この状態になるとライセートの通過には数分かかりますが、プラスミドの収率やエンドキシンレベルへの影響はありません。
溶出液の量が3 mlを超えている	原因——2回目の洗浄手順の後に行なったカラムの乾燥が十分でなかった。 対策——2回目の洗浄後に行なうカラムの乾燥の時間を20分に延長してください。吸引装置を使用する際は、吸引力が500 mbar以上であることを確認してください(単位の換算については補足2を参照)。
プラスミドDNAの収率が低い、または回収できない	原因——細胞の増殖が過剰であるか、または不十分である。 対策——600 nmでの吸光度を測定して細胞密度を確認してください。「使用前の準備」の手順1をご覧ください。 原因——使用した細胞が多すぎる、または少なすぎる。 対策——cell massが適切であったかどうか確認してください。「手順」の手順1をご覧ください。 原因——培養の開始時点で培養液が古すぎる。 対策——冷凍保存しておいたストックから、新鮮なプレートに播種してください。単一のコロニーを採取し、新たに培養を始めてください。 原因——プラスミドの複製が十分でない。 対策——培養の条件が最適であったか、選択的な抗生物質が加えられていたか、培養液の選択が適切であった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——新鮮な抗生物質が適量存在する状態で培養していることを確認してください。多くの抗生物質は光感受性であるため、2~8°Cで長期間保存すると失活します。 原因——Wash Solution 2の濃度が濃すぎる。 対策——Wash Solution 2が規定量のエタノールで希釈されているか確認してください。使用するとき以外は、揮発を防ぐため、フタをしっかりと閉めてください。

プラスミドDNAの収率が低い、または回収できない	<p>原因——アルカリ溶解を5分以上行なった</p> <p>対策——長時間のアルカリ溶解は、プラスミドDNAを変性させる場合があります。溶解反応は5分以内に終了させてください。</p>
	<p>原因——細胞片の沈殿が不十分である。</p> <p>対策——冷却したNeutralization Solutionを添加した後、ライセートをよく混ぜてください。</p>
	<p>原因——溶解反応が不完全である。</p> <p>対策——細胞の使用量が多すぎます。「手順」の手順1をご覧ください。透明で粘性のある溶液になるまで細胞を3～5分間溶解処理してください。</p>
	<p>原因——吸引力が低すぎる。</p> <p>対策——吸引装置を使用する際は、吸引力が500 mbar以上であることを確認してください(単位の換算については補足2を参照)。</p>
吸光度から求めたプラスミドの量が実際の量と一致しない	<p>原因——プラスミドDNAにRNAが混入している。RNase A処理が不十分である。</p> <p>対策——初めて使用する際には、RNase A SolutionにResuspension Solutionに加えたか確認してください。Resuspension/RNase A Solution混合液は2～8℃で保存してください。</p>
	<p>原因——プラスミドDNAに染色体DNAが混入している。</p> <p>対策——24時間以上培養した細胞や死細胞は使用しないでください。溶解反応の最中や溶解反応後にボルテックスや激しい振とうを行なうことは避けてください。</p>
A_{260}/A_{280} 比が高すぎる、または低すぎる	<p>原因——バックグラウンドが高い。</p> <p>対策——「DNAの定量」を参考に、A_{320}でのバックグラウンドを引いてください。</p>
	<p>原因——Wash Solution 2を希釈したエタノールに不純物が含まれている。</p> <p>対策——エタノールの250～300 nmでの吸光度を確認してください。吸光度が高い場合、そのエタノールは使用しないでください。洗浄後に、微量の不純物がカラムに残る場合があります。不純物は、溶出液中に混入し、最終精製物の吸光度に影響を及ぼす恐れがあります。</p>
電気泳動で、スーパーコイル状プラスミドの後にバンドが現れる	<p>原因——スーパーコイル状プラスミドDNAにニックが入っている。</p> <p>対策——ニックが入った(開環状の)プラスミドDNAは、スーパーコイル状プラスミドDNAよりも泳動速度が遅くなります。DNAニックの形成が少なければ、その後の実験に問題なく使用できます。</p>

電気泳動で、スーパーコイル状プラスミドの前にバンドが現れる。

原因——スーパーコイル状プラスミドDNAが変性している。

対策——溶解反応は5分以内に終了させてください。スーパーコイル状DNAよりも泳動速度の速いDNAは変性していますので、精製後の用途に使用することは好ましくありません。

精製後の酵素反応がうまくいかない

原因——精製が不完全である。

対策——いずれかの試薬に塩の沈殿が生じている可能性があります。試薬を65°Cに加熱して、沈殿を溶解してください。加熱した試薬は、室温まで冷却してからご使用ください。

原因——プラスミドDNAが変性している。

対策——溶解反応は5分以内に終了させてください。長時間のアルカリ溶解は、プラスミドDNAを変性させる場合があります。

原因——DNA濃度が低すぎる。

対策——「DNAの濃縮」を参考に、沈殿したDNAを溶解する液の量を調節してください。

原因——最終溶出液にエタノールが残っている。

対策——2回目の洗浄後に行なうカラムの乾燥の時間を20分に延長してください。吸引装置を使用する際は、吸引力が500 mbar以上であることを確認してください(単位の換算については補足2を参照)。

原因——最終溶出液中の塩濃度が高い。

対策——Wash Solution 1の洗浄後にWash Solution 2で洗浄したことを確認してください。Wash Solution 2には、残存する塩や不純物をカラムから取り除く役割がありません。「DNAの濃縮」に従ってプラスミドDNAを沈殿させてください。

関連製品	製品番号	関連製品	製品番号
Water, Molecular Biology Reagent	W4502	DirectLoad™ Wide Range DNA Marker	D7058
Ethidium bromide, aqueous, 10 mg/ml	E1510	Escort™ II Transfection Reagent	L6037
LB Broth, Sterile Liquid Media	L2542	Escort V Kit–Enhanced	E1029 (製造中止)
GenElute™ Plasmid Midiprep Kits	NA0200S NA0200	GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kits	NA0300S NA0300 NA0310
LB Agar, EZMix™	L7533	LB Broth, EZMix™	L7658
Precast Agarose Gels, 1.0%, 8 well	P5472	TBE Buffer (10x Concentrate)	T4415
VM20 Vacuum Manifold	VM20	Gel Loading Solution	G2526

補足1: 遠心速度の換算表

遠心速度はいずれも遠心力gの単位で表されています。遠心力gの回転数への換算については、表1をご覧ください。ご使用の遠心機・ローターで必要な遠心力が得られない場合は、遠心力を最大に設定し、それに合わせて遠心時間を延長してください。

表1. 遠心力(gの単位)から、一般的なローターの回転数への換算

遠心機	ローター	種類*	半径 (cm)	3000 × gでの 回転数	5000 × gでの 回転数
Beckman社製 Allegra 6	GH-3.8	SB	20.4	3,631	4,688
	Allegra 21(R)	S4180	SB	16.1	4,081
Allegra 64	F0485	FA	9.0	N/A**	N/A
	F0685	FA	9.7	N/A	N/A
TJ-25	TS-5.1-500	SB	19.0	3,756	4,849
	TA-10-250	FA	13.7	N/A	N/A
旧式のBeckman 社製遠心機用ロ ーター	JA-10	FA	15.8	N/A	N/A
	JA-14	FA	13.7	N/A	N/A
	JA-20	FA	10.8	N/A	N/A
	JS-13	FA	14.0	N/A	N/A
IEC社製 MP4(R)	215	SB	13.0	4,537	5,857
	224	SB	35.9	2,733	3,528
PR-7000M	966	SB	24.5	3,310	4,274
B22M	877	FA	12.6	N/A	N/A
Sorvall社製	HB-4	SB	14.7	4,277	5,522
	HB-6	SB	14.6	4,284	5,531
	HS-4	SB	17.2	3,948	5,097
	SH-80	SB	10.1	5,142	6,639
	GSA	FA	14.5	N/A	N/A
	SA-300	FA	9.7	N/A	N/A
	SA-600	FA	12.9	N/A	N/A
	SE-12	FA	9.3	N/A	N/A
	SL-50T	FA	10.7	N/A	N/A
	SS-34	FA	10.7	N/A	N/A

*SB = swinging bucket(スイング型)。FA = fixed angle(アングル型)。

**N/A = 本製品には不適當

表にないローターの場合、適切な回転数は次式で計算できます。

$$\text{RPM} = \sqrt{\text{RCF} / 1.118 \times 10^{-5} r}$$

ここで、RCF = gの単位で表した、目的の重力加速度(相対遠心力)、

r = cmの単位で表したローターの半径、

RPM = 目的の遠心力gを得るために必要な1分間の回転数。

補足2: 吸引力換算表

吸引力は、いずれもミリバール単位 (mbar) で表されています。ミリバール (mbar) を他の圧力単位に換算する場合は表2をご覧ください。

表2. ミリバール (mbar) から他の圧力単位への換算

圧力単位	500ミリバール 相当
水銀柱インチ (inch Hg)	14.8
水銀柱ミリメートル (mm Hg)	375
ポンド/平方インチ (psi)	7.25
気圧 (atm)	0.49
キロパスカル (kPa)	50
トル (Torr)	375

経験者向けプロトコル

- 準備: 詳細については技術情報をご覧ください。
 - ・RNase AをResuspension Solutionに加えます。
 - ・エタノールをWash Solution 2に加えます。
 - ・Neutralization Solutionを冷却します。

1 細菌を回収し、溶解します。

- 150 mlのオーバーナイト培養液を5000 × gで10分間遠心してペレット状にしてください。上清を捨ててください。
- 細胞を12 mlのResuspension Solution中で再懸濁させます。ピペッティングまたはボルテックスにより混和してください。
- 12 mlのLysis Solutionを加え、6~8回穏やかに転倒混和してください。振とうやボルテックスは行なわないでください。透明になるまで3~5分静置してください。

2 ライセートを濾過します。

- ライセートフィルターを準備します。Collection TubeにVacCapをかぶせ、Endotoxin-Free Maxiprep FilterをVacCapに装着してください。
- 冷却したNeutralization Solution 12 mlを加え、6~8回穏やかに転倒混和してライセートを中和してください。
- 速やかにライセートをフィルターアセンブリに注ぎ入れ、5分間インキュベーションしてください。
- ライセートを濾過します。VacCapを吸引装置に装着し、吸引を開始してください。

3 プラスミドDNAを結合させます。

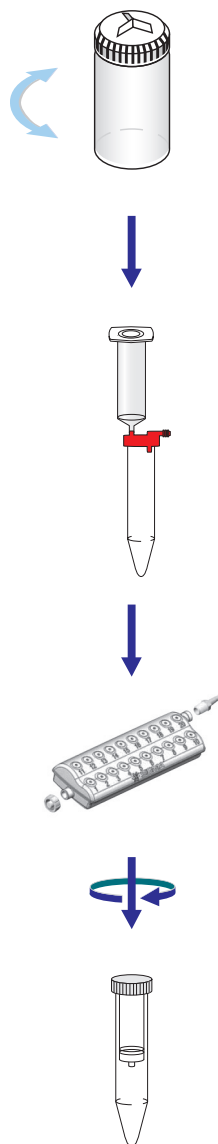
- 濾過したライセートに9 mlのBinding Solutionを加えて、6~8回穏やかに転倒混和してください。
- Maxiprep Binding ColumnをSIGMA VM20吸引マニフォールドにセットしてください。12 mlのColumn Preparation Solutionをカラムに添加し、吸引によって液を流し通してください。
- 吸引装置を動作させた状態で、準備したカラムにライセートを移し入れてください。全てのライセートを添加し終える前に、表面を露出させないようにしてください。

4 カラムを洗浄します。

- 12 mlのWash Solution 1を添加し、吸引によって液を流し通してください。
- 12 mlのWash Solution 2を添加し、吸引によって液を流し通してください。
- カラムを乾燥させるため、さらに10分間、吸引を続けてください。ひとつの吸引マニフォールドに7本以上のカラムを接続する場合は、乾燥の時間を20分以上にしてください。

5 プラスミドDNAを溶出させます。

- カラムを付属のCollection Tubeに移し換えてください。
- 3 mlのEndotoxin-Free Waterをカラムに添加してください。
- プラスミドDNAの収率を最大にする場合: スイング型パケットローターを用いて、カラム/Collection Tubeのユニットを3000 × gで5分間遠心してください。
- プラスミド濃度を最大にする場合: スイング型パケットローターを用いて、カラム/Collection Tubeのユニットを1000 × gで5分間遠心してください。



World Headquarters

3050 Spruce St., St. Louis, MO 63103





Order/Customer Service (800) 325-3010 • Fax (800) 325-5052

Technical Service (800) 325-5832 • sigma-aldrich.com/techservice

SIGMA-ALDRICH®

The SIGMA-ALDRICH Group

©2007 Sigma-Aldrich Co. All rights reserved.

SIGMA, , SAFC, **SAFC**, SIGMA-ALDRICH, , ISOTEC, ALDRICH, , FLUKA, , and SUPELCO are trademarks belonging to Sigma-Aldrich Co. and its affiliate Sigma-Aldrich Biotechnology LP. Riedel-de Haën®: trademark under license from Riedel-de Haën GmbH. Sigma products are sold through Sigma-Aldrich, Inc. Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

GenElute™, EZMix™, DirectLoad™, SAFC™, and Sigma Advanced Technology™ are trademarks of Sigma-Aldrich Co. and its division

Sigma-Aldrich Biotechnology LP. Riedel-de Haën®: trademark under license from Riedel-de Haën GmbH.

Accelerating Customers' Success

through Leadership in Life Science.

01882-502620
0047