



Cat. No. YPD100
100 ミニプレップ

Cat. No. YPD300
300 ミニプレップ

PD1 Buffer: 25ml
PD2 Buffer: 25ml
PD3 Buffer: 40ml
W1 Buffer: 50ml

Wash Buffer (conc.): 25ml *
Elution Buffer: 10ml
RNase A (50mg/ml): 50 μl
PD Column: 100 本
Collection Tube: 100 本

PD1 Buffer: 65ml
PD2 Buffer: 75ml
PD3 Buffer: 100ml
W1 Buffer: 130ml

Wash Buffer (conc.): 40ml **
Elution Buffer: 30ml
RNase A (50mg/ml): 130 μl
PD Column: 300 本
Collection Tube: 300 本

対象サンプル： バクテリアのプラスミド DNA

サンプル量： LB ブロス中一晚培養したバクテリア培養液 1~4ml

標準プラスミド収量： 低コピー数 0.5~5 μg、高コピー数 10~20 μg (最高 30 μg)

所要時間： 20 分

RNase A を PD1 Buffer に加えて、4°C で保存してください。

PD2 Buffer に沈殿が見られた場合は、37°C の水に浸けて温め、沈殿物を溶かしてください。

* 初めにご使用になる前に、Wash Buffer にエタノールを 4 倍量 (100ml) 加えてください。

** 初めにご使用になる前に、Wash Buffer にエタノールを 4 倍量 (160ml) 加えてください。

PD Column： メンブレンと一体になった蓋付きカラム

Collection Tube： 蓋の無い樹脂製チューブ

1

高コピー数用プロトコール



集菌

1. バクテリア培養液 1.5ml をエッペンチューブに移し入れる。(エッペンチューブは本製品の付属品ではありません。)
2. エッペンチューブを遠心分離機にフルスピード 10,000xg (13,000rpm) で 1 分間かけて、上澄みを捨てる。(バクテリア培養液を 1.5ml 以上使用する場合は、1~2 の手順を繰り返し行ってください。4ml 以上の場合は、複数のカラムを使用してください。)

再懸濁

3. (RNase A を加えた) PD1 Buffer 200 μl を加え、ボルテックスにかけるか、ピペティングにより、細胞ペレットを再懸濁させる。

溶菌

4. PD2 Buffer 200 μl を加えて、チューブを 10 回ひっくり返す方法で静かに混ぜ合わせる。ゲノミック DNA が剥離して溶液に混入しないよう、**ボルテックスにはかけないでください。**
5. 室温で 2 分間、溶液が透明になるまでチューブを立てて置く。

中和

6. PD3 Buffer 300 μl を加え、すぐに、チューブを 10 回ひっくり返す方法で混ぜ合わせる。**ボルテックスにはかけないでください。**
7. 遠心分離機にフルスピード 10,000xg (13,000rpm) で 2 分間かける。

DNA 結合

8. Collection Tube 内に PD Column を設置する。
9. 7 で透明になった溶液 (上澄み液) を PD Column に加える。
10. 遠心分離機にフルスピード 10,000xg (13,000rpm) で 30 秒間かける。
11. 排液を捨て、PD Column を Collection Tube 内に戻す。

3

概要

HiYield™ Plasmid Mini Kit は、1~4ml のバクテリア培養液からプラスミドやコスミド DNA を迅速に分離するために設計されました。信頼性の高い収量を得られるミニカラムシステムとして最適化された製品です。(200~500 μg の収量が必要な場合は Fastlon™ Plasmid Midi/Maxi Kit をご使用ください。)

本製品では、改良されたアルカリ溶菌法に基づいています。RNase 処理によりゲノミック DNA と RNA をごく微量しか含まない細胞溶解液を抽出します。カオトロピック塩とシリカスピン技術の組み合わせにより、信頼性の高い DNA の結合と溶出を実現します。精製された DNA は、制限酵素反応、ライゲーション、PCR、シーケンシング反応などの用途に使用できます。

品質

HiYield™ Plasmid Mini Kit はロット毎に、プラスミド pUC19 (A₆₀₀ > 2 ユニット/ml) を用いて形質変換された大腸菌 DH5α 培養液 4ml からプラスミド DNA を抽出する方法で、品質試験を行っています。

プラスミド DNA の収量は 20 μg 以上であることを分光光度計により確認します。さらに、1 μl に対し、制限酵素 EcoRI 消化を行い、アガロースゲルを用いてチェックを行っています。

参考文献 (1) Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979) Nucleic Acids Res. 7, 1513.

(2) Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615

注意事項 (1) 本製品は研究用です。診断用・治療用にはご使用にならないようお願い致します。

(2) PD3 Buffer は、刺激性があり有害な 塩酸グアニジン を含有しています。ご使用中は必ず、白衣、使い捨ての手袋、防護用眼鏡を着用してください。

2

洗浄

12. PD Column に W1 Buffer 400 μl を加える。
13. 遠心分離機にフルスピード 10,000xg (13,000rpm) で 30 秒間かける。
14. 排液を捨て、PD Column を Collection Tube 内に戻す。
15. PD Column に (エタノールで薄めた) Wash Buffer 600 μl を加える。
16. 遠心分離機にフルスピード 10,000xg (13,000rpm) で 30 秒間かける。
17. 排液を捨て、PD Column を Collection Tube 内に戻す。
18. 再度、遠心分離機にフルスピード 10,000xg (13,000rpm) で 3 分間かけて、カラム充填材を乾かす。

DNA 溶出

19. 乾いた PD Column を新しい 1.5ml エッペンチューブに移し入れる。(エッペンチューブは本製品の付属品ではありません。)
20. メンブレンの中央に直に、Elution Buffer または蒸留水を 50 μl 加える。PD Column 壁に液が付着しないよう注意してください。
21. Elution Buffer または蒸留水がメンブレンに吸収されるまで 2 分間、チューブを立てて置く。
22. 遠心分離機にフルスピード 10,000xg (13,000rpm) で 2 分間かけて、精製された DNA を溶出させる。

4

低コピー数用プロトコール

前述のように、エタノールを Wash Buffer に、RNase A を PD1 Buffer に加えてください。
標準的な収量は、LB 培地で一晚培養したバクテリアから低コピー数プラスミドを精製する場合、バクテリア培養液 1ml あたり約 0.5~1.0 μg です。プラスミドが 30kb より長い場合は、DNA 溶出の処理 (20~23) を行う前に、Elution Buffer を 70°C に温めてください。

集菌

1. 一晚培養したバクテリア培養液 (10ml まで) を遠心分離機にかけて、上澄みを捨てる。

再懸濁

2. (RNase A を加えた) PD1 Buffer 400 μl を加え、ボルテックスにかけるか、ピペティングにより、細胞ペレットを再懸濁させる。

溶解

3. PD2 Buffer 400 μl を加えて、チューブを 10 回ひっくり返す方法で静かに混ぜ合わせる。ゲノミック DNA が剥離して溶液に混入しないよう、**ボルテックスにはかけないでください。**
4. 室温で 2 分間、溶液が透明になるまでチューブを立てて置く。

中和

5. PD3 Buffer 600 μl を加え、すぐに、チューブを 10 回ひっくり返す方法で混ぜ合わせる。**ボルテックスにはかけないでください。**
6. 遠心分離機にフルスピード 10,000xg (13,000rpm) で 3 分間かける。

DNA 結合

7. Collection Tube 内に PD Column を設置する。
8. 6 で得られた溶解産物 (上清) 750 μl を PD Column に加える。
9. 遠心分離機に 10,000xg (13,000rpm) で 30 秒間かけた後、排液を捨て、PD Column を Collection Tube 内に戻す。
10. 残りの溶解産物を同じ PD Column に加える。
11. 遠心分離機に 10,000xg (13,000rpm) で 30 秒間かける。
12. 排液を捨て、PD Column を Collection Tube 内に戻す。

洗浄

13. PD Column に W1 Buffer 400 μl を加える。
14. 遠心分離機に 10,000xg (13,000rpm) で 30 秒間かける。
15. 排液を捨て、PD Column を Collection Tube 内に戻す。
16. PD Column に (エタノールで薄めた) Wash Buffer 600 μl を加える。
17. 遠心分離機に 10,000xg (13,000rpm) で 30 秒間かける。
18. 排液を捨て、PD Column を Collection Tube 内に戻す。
19. 再度、遠心分離機にフルスピード 10,000xg (13,000rpm) で 2 分間かけて、カラム充填材を乾かす。

DNA 溶出

20. 乾いた PD Column を新しいエッペンチューブに移し入れる。(エッペンチューブは本製品の付属品ではありません。)
21. カラム充填材の中央に Elution Buffer を 50 μl 加える。
※ プラスミド DNA が 10kb よりも長い場合は、(70°C に) 温めた Elution Buffer を使用することで溶出効率が改善されます。
22. Elution Buffer または水が充填材に吸収されるまで 2 分間、チューブを立てて置く。
23. 遠心分離機にフルスピード 10,000xg (13,000rpm) で 2 分間かけて、精製された DNA を溶出させる。

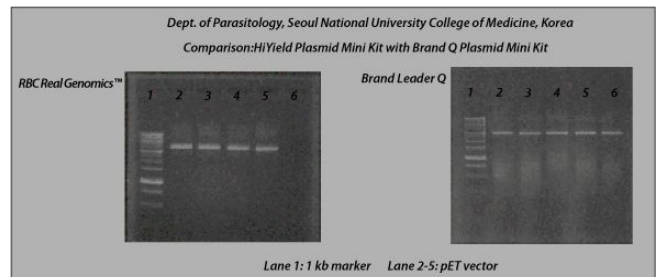
トラブルシューティング

問題	考えられる原因と解決策
収量が少ない	<p>バクテリア細胞が完全に溶解されなかった 使用したバクテリア細胞が多すぎると考えられます。A₆₀₀ 10 ユニット以上のバクテリア培養液を使用される場合は、複数のチューブに分けてください。 PD3 Buffer を加えた後、ひっくり返して沈殿物を分散させることにより、収量を確保できます。 Wash Buffer が不適切 使用前に、Wash Buffer にエタノールが加えられていることを確認してください。 DNA 溶出の処理が不適切 Elution Buffer が PD Column の充填材の中央に加えられ、吸収されていることを確認してください。 DNA が完全に溶出されなかった プラスミド DNA が 10kb より長い場合は、溶出効率を上げるため、DNA 溶出の処理を行う前に Elution Buffer を 60~70°C に温めてご使用ください。</p>
抽出された DNA を用いたその後の実験がうまくいかない	<p>残留エタノールが混入している 洗浄の処理を行った後、さらに遠心分離機にフルスピードで 5 分間かけるか、60°C で 5 分間インキュベートすることにより、PD Column を乾かしてください。 RNA が混入している PD1 Buffer を使用する前に、RNase A が加えられていることを確認してください。有効期限切れの RNase A が加えられていた場合、RNase A を追加してください。使用したバクテリア細胞が多すぎる場合、一回に処理するサンプル容量を減らしてください。 ゲノミック DNA が混入している 長時間培養しすぎたバクテリア培養液は使用しないでください。PD2 Buffer 及び PD3 Buffer を加えた際、ゲノミック DNA が剥離しないよう静かに混ぜ合わせてください。 ヌクレアーゼが混入している 宿主細胞のヌクレアーゼ活性が高い場合 (例えば endA+ 菌株など)、残留ヌクレアーゼを除去するために、追加で以下の洗浄処理を行ってください。 DNA 結合の処理が終わった後、PD3 Buffer 200ml を PD Column に加え、室温で 2 分間インキュベートしてください。次に、遠心分離機に 6,000xg (8,000rpm) で 30 秒かけてください。その後、通常の洗浄の処理を行ってください。</p>

HiYield™ Plasmid Mini Kit の収量・純度・安定性試験データ

RBC 製品	DH5 α /TA		BL21/pET20b		
DNA 溶液量 (μl)	43	44	44.5	44.5	43.5
DNA 濃度 (ng/μl)	139.4	115.8	123.5	19.7	18.7
全 DNA 量 (μg)	5.99	5.01	5.43	0.88	0.83
A ₂₆₀ / A ₂₈₀	1.92	1.91	1.91	1.78	2.03

メーカーQ 製品	DH5 α /TA		BL21/pET20b		
DNA 溶液量 (μl)	44.5	44.5	45	46	44
DNA 濃度 (ng/μl)	112.2	100.8	105.7	20.6	24.8
全 DNA 量 (μg)	4.99	4.49	4.76	0.95	1.09
A ₂₆₀ / A ₂₈₀	1.91	1.9	1.89	1.72	1.72



製品の取扱い方法についてのお問合せは、以下の弊社窓口までご相談ください。

RBC Bioscience 社製品 日本総代理店
有限会社 サイトローブ
マーケティング営業部

〒113-0034 東京都文京区湯島 3-21-5
Tel: 03-3834-2525 Fax: 03-3834-2550
E-mail: rbc@scitrove.co.jp