



Application

# FastGene™ Plasmid Mini Kitを使用したプラスミドの精製

製品名

FastGene™ Plasmid Mini Kit (FG-90402)

メーカー名

日本ジェネティクス株式会社

下記のデータは、山口大学 医学部薬理学講座 本田健 様のご厚意により掲載させていただきました。

FastGene™ Plasmid Mini Kit で抽出したプラスミドを使用して、トランスフェクション (ルシフェラーゼ活性) を試みました。

## 実験条件

### ● サンプル

大腸菌株：TOP10

ベクター：pGL4 Vector 4.3kb (インサートサイズ 0.5~2kb) ※インサート：プロモーター領域

キットへの使用量：LB培地 2.5 mL

### ● 手順

1. プラスミドDNAを形質転換したTOP10をLB培地で培養した
2. 培養2.5mLスケールから大腸菌を回収し、FastGene™ Plasmid Mini Kit にてプラスミドDNA を精製した (溶出バッファー 50μL)
3. DNA収量を吸光度計 (NanoDrop) で測定した (結果①)
4. 制限酵素消化し、電気泳動により想定の間断パターンかどうか確認した (結果②)
5. トランスフェクション後、ルシフェラーゼ活性の測定を行った (結果③)

検出装置：パーキンエルマー社の2030 ARVO X シリーズ マルチラベルリーダー

## 結果

### ① 得られたDNAと純度

#	溶出バッファー量 (μL)	yield (μg)	Nucleic Acid Conc. Unit	A260	A280	A260/A280	A260/A230
pGL4-prom-498	50.0	16.3072	332.8ng/μL	6.656	3.511	1.90	2.20
pGL4-prom-998	50.0	14.2541	290.9ng/μL	5.818	3.088	1.88	2.17
pGL4-prom-1489	50.0	16.2092	330.8ng/μL	6.617	3.655	1.81	1.97
pGL4-prom-1994	50.0	23.4465	478.5ng/μL	9.571	5.063	1.89	2.24

### ② 電気泳動

精製プラスミドを制限酵素チェックに用いた

条件：1 レーン 10μL (250ng) 使用、TAE バッファー、0.7%TAE アガロース、100V・30分



数値は想定の間断長bp

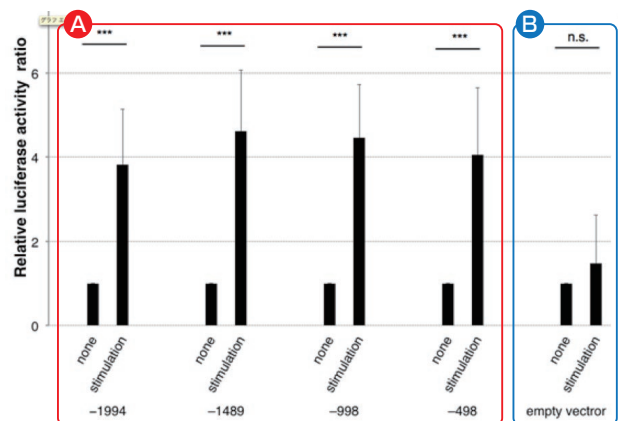
※500bp以下のバンドはゲル画像では検出されていません。

### ③ ルシフェラーゼ活性の測定

想定の間断を確認後、マウス筋芽細胞C2C12細胞に導入し、レポーター遺伝子アッセイを実施した

Lipofectamine2000にてDNA 0.2μg を 10<sup>5</sup> cellsに導入した

24後に刺激を与え、細胞ライセートを回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した



A プロモーターを挿入したベクター

B ベクターのみ (インサートなし)

刺激により、全てのプロモーターでルシフェラーゼ活性が促進された



### お客様のコメント

精製度や回収率が安定しており、コストパフォーマンスも高いと思います。

個人的には、コレクトチューブからカラムを引き抜く際、もう少しスムーズに抜けるとさらに使いやすいかと思いますが、総じてハンドリングに煩雑さはなく、ストレスなく短時間で多検体の処理ができました。