FastGene™
プラスミドミニキット

Cat.No. FG-90402（100 preps）, FG-90502（300 preps）

目次

コンポーネント 2
保管と準備 2
安全にご使用していただくために　―リスクとアドバイス― 3
キットの仕様 3
プロトコル
　ハイコピープラスミドDNAの精製 ― Fast プロトコル 4
　ハイコピープラスミドDNAの精製 ― スタンダードプロトコル 5
　ローコピープラスミドDNAの精製 6

コンポーネント

FastGene™ プラスミドミニキット	FG-90402（100 preps）	FG-90502（300 preps）
FastGene™ mPカラム	100個	300個
2 mLコレクションチューブ	100個	300個
再懸濁バッファー mP1	25 mL	65 mL
溶解バッファー mP2	25 mL	75 mL
中和バッファー mP3	40 mL	100 mL
第1洗浄バッファー mP4	50 mL	130 mL
第2洗浄バッファー mP5濃縮液	25 mL	40 mL
溶出バッファー mP6※1	10 mL	30 mL
RNase A（凍結乾燥）	10 mg	26 mg

※1　溶出バッファーの組成は次のとおりです；10 mM Tris-Cl, pH8.5（EDTAは含まれておりません）

キットに含まれないアイテム

試　薬：96-100% エタノール
消耗品：1.5 mL遠心チューブ、ディスポーザブルピペットチップ
装　置：マニュアルピペット、遠心チューブ用遠心機、ヒートブロック、ボルテックスミキサー、防護用品（白衣、グローブ、ゴーグル）

保管と準備

FastGene™ プラスミドミニキット は、室温（15-25℃）にて湿気を避けて保管して下さい。
この条件でキットを保管した場合、最長12カ月間は性能と品質が落ちることなく安定性が保たれます。バッファーを使用する前には、沈殿の有無を確認し、必要に応じて37℃で再溶解してください。

プロトコルを開始する前に、以下の準備をしてください。

FastGene™ プラスミドミニキット	FG-90402（100 preps）	FG-90502（300 preps）
第2洗浄バッファー mP5 濃縮液	100 mL のエタノール（96-100%）を添加、混合します	160 mL のエタノール（96-100%）を添加、混合します
再懸濁バッファー mP1 RNase A	1 mLのバッファーmP1をRnase Aバイアルに加え、ボルテックスミキサーで撹拌します。すべての溶液をバッファー mP1のボトルに移し、しっかりと混ぜ合わせます。Rnase A添加後のバッファーmP1は4℃で保管します。この溶液は、約6カ月間は使用できます。	

安全にご使用していただくために　―リスクとアドバイス―

警告：FastGene™ プラスミドミニキットは、研究目的での使用に限られます。人や動物の疾病診断目的には、ご使用いただけません。化学物質を取り扱う際は常に、実験に適した白衣、使い捨てグローブ、保護ゴーグルを着用してください。本キットの使用は、ラボ実験の訓練を受けた方が、医薬品安全性試験実施基準に基づいて行うことを強く推奨いたします。

FastGene™ プラスミドミニキットの以下のコンポーネントには、下記の物質が含まれております。

溶解バッファー mP2

水酸化ナトリウムを含みます：刺激物

中和バッファー mP3

塩酸グアニジン、酢酸を含みます：刺激物

第1洗浄バッファー mP4

塩酸グアニジンを含みます：刺激物

RNase A

リボヌクレアーゼを含みます：刺激物

キットの仕様

FastGene™ プラスミドミニキットは、ハイ/ローコピープラスミドDNAの単離および精製を目的として開発されました。

	ハイコピープラスミド	ローコピープラスミド
最大サンプル量	培養液 1-5 mL	培養液 5-10 mL
一般的な収量	< 25 µg	< 25 µg
溶出量	50 µL	50 µL
結合容量	40 µg	40 µg
ベクター	< 15 kbp	< 15 kbp
所要時間	26 分 /12 preps	36 分 /12 preps
フォーマット	スピンカラム	スピンカラム

Fast プロトコル

ハイコピープラスミドDNAの精製

精製を開始する前に、RNase Aが再懸濁バッファー mP1に溶解されていることを確認してください。そして、第2洗浄バッファー mP5が「保管と準備」の手順（2ページ）に従って用意されていることを確認してください。
別途特別な記載がない限り、通常の卓上型微量遠心機での遠心は13,000 rpm（11,000 – 18,000 × *g*）で行います。

溶解と中和の手順	
1. 大腸菌の培養液1-3 mL（通常は1.5 mL）を、室温（15-25℃）にて>10,000 rpmで1分間遠心機にかけてペレット化します。できるだけ上清を取り除きます。 2. 菌体ペレットを、200 µLの再懸濁バッファー mP1（RNase Aを加えたもの）に入れ、ボルテックスまたはピペッティングで混ぜ合わせることにより再懸濁します。溶解バッファー mP2を加える前に、菌の塊が残っていないことを確認します。 3. 200 µLの溶解バッファー mP2を加え、ゆっくりとチューブを10回ほど転倒混合します。ゲノムDNAが剪断されるのを防ぐために、**ボルテックスはしないでください**。溶解液が透明になるまでの間、溶液を室温にて2分間静置します（5分以上は放置しないでください）。 4. 300 µLの中和バッファー mP3を加え、すぐにチューブを10回ほど転倒混合します。**ボルテックスはしないでください**。13,000 rpmで2分間、遠心機にかけます。上清が透明にならない場合、13,000 rpm以上で2分間の遠心を繰り返してください。	
DNAの結合	
5. FastGene™ mPカラムを、2 mLコレクションチューブの中に入れます。 6. ピペットを使って透明な上清をmPカラムに分注し、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。 7. カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ mPカラムをコレクションチューブに戻します。	
洗浄	
8. FastGene™ mPカラムに、150 µLの第1洗浄バッファーmP4を加え、メンブレンに吸収させます（10秒間）。**未だ遠心しないでください**。 9. 更に300 µLの第2洗浄バッファー mP5を続けて分注し、溶液を重層します。 10. 13,000 rpmで3分間遠心機にかけます。	
DNA溶出	
11. FastGene™ mPカラムを、新しい遠心チューブに移します（遠心チューブはキットに含まれておりません）。洗浄バッファーのキャリーオーバーを避けるようにしてください。 12. 50 µLの溶出バッファーmP6を、直接メンブレンの中央に加えます。カラムの壁に余分なバッファーが付着しないようにしてください。 13. 溶出バッファーがメンブレンに吸収されるまで、2分間静置します。 14. 13,000 rpmで2分間遠心機にかけ、精製DNAを溶出します。	

Standard プロトコル

ハイコピープラスミドDNAの精製

精製を開始する前に、RNase Aが再懸濁バッファー mP1に溶解されていることを確認してください。そして、第2洗浄バッファー mP5が「保管と準備」の手順（2ページ）に従って用意されていることを確認してください。
別途特別な記載がない限り、通常の卓上型微量遠心機での遠心は13,000 rpm（11,000 – 18,000 × *g*）で行います。

溶解と中和の手順

1. 大腸菌の培養液1-5 mL（通常は1.5 mL）を、室温（15-25℃）にて>10,000 rpmで2分間遠心機にかけてペレット化します。できるだけ上清を取り除きます。
2. 菌体ペレットを、200 µLの再懸濁バッファー mP1（RNase Aを加えたもの）に入れ、ボルテックスまたはピペッティングで混ぜ合わせることにより再懸濁します。溶解バッファー mP2を加える前に、菌の塊が残っていないことを確認します。
3. 200 µLの溶解バッファー mP2を加え、ゆっくりとチューブを10回ほど転倒混合します。ゲノムDNAが剪断されるのを防ぐために、**ボルテックスはしないでください**。溶解液が透明になるまでの間、溶液を室温にて2分間静置します（5分以上は放置しないでください）。
4. 300 µLの中和バッファー mP3を加え、すぐにチューブを10回ほど転倒混合します。**ボルテックスはしないでください**。13,000 rpmで2分間、遠心機にかけます。上清が透明にならない場合、13,000 rpm以上で2分間の遠心を繰り返してください。

DNAの結合

5. FastGene™ mPカラムを、2 mLコレクションチューブの中に入れます。
6. ピペットを使って透明な上清をmPカラムに分注し、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。
7. カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ mPカラムをコレクションチューブに戻します。

洗浄

8. 推奨：FastGene™ mPカラムに400 µL の第1洗浄バッファーmP4を加え、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。
   （本洗浄ステップは、特にタンパク除去に効果的です。本洗浄ステップを実施することで、純度は向上しますが、プラスミドDNA収量はその分低くなる可能性もあります。
   DH5αなどの菌株では本ステップをスキップすることが可能ですが、HB101やJMシリーズのようなヌクレアーゼ活性が高い菌株（end A+株）などでは、本ステップの実施を強く推奨いたします。）
9. カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ mPカラムをコレクションチューブに戻します。
10. FastGene™ mPカラムに600 µLの第2洗浄バッファーmP5を加え、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。
11. カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ mPカラムをコレクションチューブに戻します。メンブレンを完全に乾燥させるために、再び2分間遠心機にかけます。

DNA溶出

12. FastGene™ mPカラムを、新しい遠心チューブに移します（遠心チューブはキットに含まれておりません）。洗浄バッファーのキャリーオーバーを避けるようにしてください。
13. 50 µLの溶出バッファーmP6を、直接メンブレンの中央に加えます。カラムの壁に余分なバッファーが付着しないようにしてください。
14. 溶出バッファーがメンブレンに吸収されるまで、2分間静置します。
15. 13,000 rpmで2分間遠心機にかけ、精製DNAを溶出します。

プロトコル

ローコピープラスミドDNAの精製

精製を開始する前に、RNase Aが再懸濁バッファー mP1に溶解されていることを確認してください。そして、第2洗浄バッファー mP5が「保管と準備」の手順（2ページ）に従って用意されていることを確認してください。
別途特別な記載がない限り、通常の卓上型微量遠心機での遠心は13,000 rpm（11,000 – 18,000 × *g*）で行います。

溶解と中和の手順

1. 大腸菌の培養液10 mL（通常は5 mL）を、室温（15-25℃）にて>10,000 rpmで2分間遠心機にかけてペレット化します。できるだけ上清を取り除きます。
2. 菌体ペレットを、400 µLの再懸濁バッファー mP1（RNase Aを加えたもの）に入れ、ボルテックスまたは上下にピペッティングすることにより再懸濁します。溶解バッファー mP2を加える前に、菌の塊が残っていないことを確認します。
3. 400 µLの溶解バッファー mP2を加え、ゆっくりとチューブを10回ほど転倒混合します。ゲノムDNAが剪断されるのを防ぐために、**ボルテックスはしないでください**。溶解液が透明になるまでの間、溶液を室温にて2分間静置します（5分以上は放置しないでください）。
4. 600 µLの中和バッファー mP3を加え、すぐにチューブを10回ほど転倒混合します。**ボルテックスはしないでください**。13,000 rpmで3分間、遠心機にかけます。上清が透明にならない場合、13,000 rpm以上で3分間の遠心を繰り返してください。

DNAの結合

5. FastGene™ mPカラムを、2 mLコレクションチューブの中に入れます。
6. ピペットを使って、750 µLの透明な上清をmPカラムに分注し、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。
7. カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ mPカラムをコレクションチューブに戻します。
8. 残りの透明な上清を同じmPカラムにアプライし、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。
9. カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ mPカラムをコレクションチューブに戻します。

洗浄

10. FastGene™ mPカラムに400 µL の第1洗浄バッファーmP4を加え、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。
11. カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ mPカラムをコレクションチューブに戻します。
12. FastGene™ mPカラムに600 µLの第2洗浄バッファーmP5を加え、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。
13. カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ mPカラムをコレクションチューブに戻します。メンブレンを完全に乾燥させるために、再び2分間遠心機にかけます。

DNA溶出

14. FastGene™ mPカラムを、新しい遠心チューブに移します（遠心チューブはキットに含まれておりません）。
    10 kb以上のプラスミドDNAの場合、溶出バッファーmP6を予め70℃に加温しておきます。
15. 50 µLの溶出バッファーmP6を、直接メンブレンの中央に加えます。カラムの壁に余分なバッファーが付着しないようにしてください。
16. 溶出バッファーがメンブレンに吸収されるまで、2分間静置します。
17. 13,000 rpmで2分間遠心機にかけ、精製DNAを溶出します。

日本ジェネティクス株式会社　〒112-0004 東京都文京区後楽1-4-14 後楽森ビル18階
https://n-genetics.com　info@genetics-n.co.jp　TEL 03 (3813) 0961　FAX 03 (3813) 0962

本製品はライフサイエンス分野における研究での使用を目的としています。仕様は2024年1月現在のものです。製品は改良のため予告なく変更する場合があります。

M0084