



## FastGene™ プラスミドミニキット

用途：ハイコピー／ローコピープラスミド DNA の精製

カタログナンバー：FG-90402 (100 preps)

カタログナンバー：FG-90502 (300 preps)

保管条件：室温 (15-25℃) で保管して下さい。

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。

## 目次

コンポーネント .....	3
保管と準備 .....	3
安全にご使用していただくために — リスクとアドバイス — .....	4
キットの仕様 .....	4
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.....	5
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 .....	6 – 7
ローコピープラスミド DNA の精製 .....	8 – 9
ご注文情報 .....	10
お問い合わせ .....	10

## 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* <sup>1</sup>	10 ml	30 ml
RNase A (凍結乾燥)	10 mg	26 mg
LB 培地カプセル* <sup>2</sup>	10 個	25 個

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

\*2 操作方法は別紙の取扱説明書をご参照ください。

### 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攪拌します。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、イソプロパノールを含みます：引火性、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	< 25µg	< 25µg
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нкаラム	スピнкаラム

# Fast プロトコル

## ー 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（3 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。




<p><b>溶解と中和の手順</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 大腸菌の培養液 1-3 ml (通常は 1.5 ml) を、室温 (15-25°C) にて &gt;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。</li> <li>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ティングで混ぜ合わせる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。</li> <li>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、<b>ボルテックスはしないでください</b>。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)。</li> <li>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。<b>ボルテックスはしないでください</b>。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。</li> </ol>	
<p><b>DNA の結合</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>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。</li> </ol>	
<p><b>洗浄</b></p>	
<p>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)。<b>未だ遠心しないでください</b>。</p> <p>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。</p> <p>10. 13,000 rpm で 3 分間遠心機にかけます。</p>	
<p><b>DNA 溶出</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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。</li> <li>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、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。</li> <li>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。</li> <li>14. 13,000 rpm で 2 分間遠心機にかけ、精製 DNA を溶出します。</li> </ol>	


# Standard プロトコル

## ー 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（3 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。

<p><b>溶解と中和の手順</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 大腸菌の培養液 1-5 ml (通常は 1.5 ml) を、室温 (15-25° C) にて &gt;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。</li> <li>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ティングで混ぜ合わせる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。</li> <li>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、<b>ボルテックスはしないでください</b>。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)。</li> <li>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。<b>ボルテックスはしないでください</b>。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。</li> </ol>	
<p><b>DNA の結合</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>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。</li> </ol>	
<p><b>洗浄</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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。)</li> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>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。</li> </ol>	




DNA 溶出	
<p>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。</p> <p>13. 50 <math>\mu</math>l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。</p> <p>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。</p> <p>15. 13,000 rpmで2分間遠心機にかけ、精製DNAを溶出します。</p>	

# プロトコル


## ー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（3 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。

<p><b>溶解と中和の手順</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 大腸菌の培養液 10 ml (通常は 5 ml) を、室温 (15-25° C) にて &gt;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。</li> <li>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。</li> <li>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、<b>ボルテックスはしないでください</b>。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)。</li> <li>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。<b>ボルテックスはしないでください</b>。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。</li> </ol>	
<p><b>DNA の結合</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>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。</li> </ol>	
<p><b>洗浄</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>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。</li> </ol>	



DNA 溶出	
<p>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）。 10kb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。</p> <p>15. 50 <math>\mu</math>l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。</p> <p>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。</p> <p>17. 13,000 rpmで2分間遠心機にかけ、精製DNAを溶出します。</p>	

## ご注文情報

商品名	カタログナンバー
FastGene™ ゲル/PCR 抽出キット (100 preps)	FG-91202
FastGene™ ゲル/PCR 抽出キット (300 preps)	FG-91302
FastGene™ ゲルバンドカッター (50 本)	FG-830
FastGene™ プラスミドミニキット (100 preps)	FG-90402
FastGene™ プラスミドミニキット (300 preps)	FG-90502
FastGene™ ダイターミネーター除去キット (50 preps)	FG-9411
LB 培地カプセル (100 個)	NE-L2720-100

## お問い合わせ

### 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  
TEL : 03-3813-0961 FAX : 03-3813-0962

より詳しい製品情報、お問い合わせの詳細、ご質問、トラブルシューティングにつきましては、弊社ウェブサイト ([www.n-genetics.com](http://www.n-genetics.com)) をご確認ください。

E-mail : [info@genetics-n.co.jp](mailto:info@genetics-n.co.jp)



FastGene<sup>®</sup> は Nippon Genetics Co.,Ltd. の登録商標です。