

FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit

Cat: FAPDE 000 Mini (4 回分) / FAPDE 001 (100 回分) / FAPDE 001-1 (300 回分)

本製品は研究用です

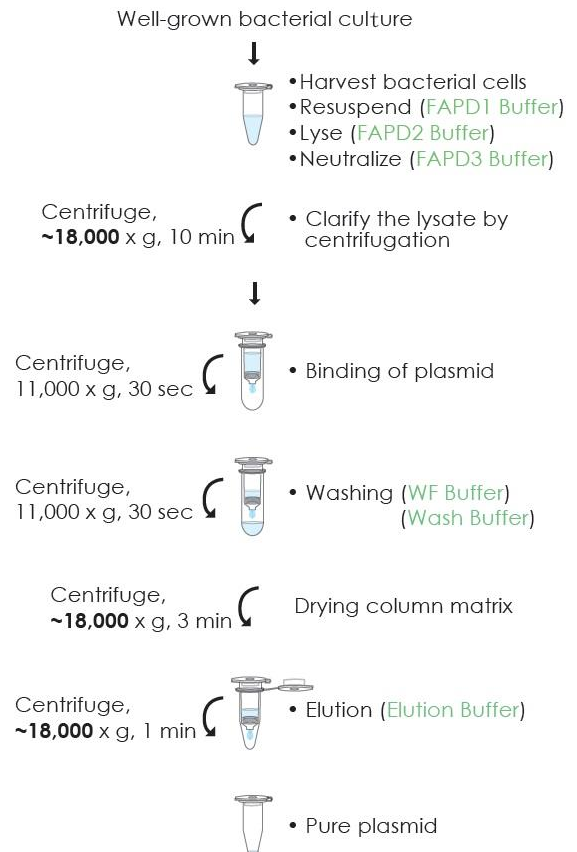
v 221121rev

🌈 キットの内容

	FAPDE 000-Mini (4 preps_sample)	FAPDE 001 (100 preps)	FAPDE 001-1 (300 preps)
FAPD1 Buffer	1.5 ml	30 ml	90 ml
FAPD2 Buffer	1.5 ml	30 ml	90 ml
FAPD3 Buffer	1.5 ml	40 ml	120 ml
WF Buffer*	1.3 ml	35 ml	98 ml
Wash Buffer*	1.0 ml	20 ml	50 ml
Elution Buffer	0.5 ml	15 ml	35 ml
FAPD Column	4 pcs	100 pcs	300 pcs
Collection Tube	4 pcs	100 pcs	300 pcs
RNase A (Lyophilized)	0.15 mg	3 mg	9 mg
*添加する 96-100%エタノール量			
WF Buffer	0.5 ml	13 ml	36 ml
Wash Buffer	4 ml	80 ml	200 ml

🌈 基本情報

構成	Mini スピンカラム(シリカメンブレン)
サンプル量	1-5 ml
プラスミドサイズ	<15Kb
所要時間	<25 分
収量	25-40 μ g
結合量	60 μ g/column
方法	遠心法 もしくは 吸引法



🌈 重要事項

- 1) RNase A はお客様の手元に届き次第、 -20°C で保存してください。
※RNase A Solution は調製不要です。対応する取扱説明書をご確認ください。
- 2) 0.5 ml の FAPD1 Buffer を RNase A のチューブに加え、ボルテックスで RNase A を溶解します。RNase A 溶液を全量 FAPD1 Buffer に添加し、再度ボルテックスします。RNase A を添加後は FAPD1 Buffer は 4°C で保管してください
- 3) FAPD2 Buffer に沈殿物が見られる場合、 37°C の湯せんで Buffer を温めて沈殿物を溶かしてください。
- 4) WF Buffer と Wash Buffer は開封時に 96~100%エタノール(お客様でご用意ください)を添加してください。
- 5) 遠心分離は $11,000\sim 18,000 \times g$ で行ってください。

🌈 操作 ※操作前に「重要事項」をよくお読みください。

1. 1~5 ml の細菌培養液を 1.5 ml チューブ (お客さまでご用意ください) へ移します。
2. $11,000 \times g$ で 1 分間遠心分離し、上清を捨てます。
3. 250 μl の FAPD1 Buffer (RNase A 添加) を加え、ピペティングでペレットを再懸濁します。
* 再懸濁ではペレットを完全に溶解させてください。
4. 250 μl の FAPD2 Buffer を加えます。5~10 回転倒混和し、細菌を溶解します。その後、2~5 分程度室温で静置します。
* ゲノム DNA が切断されるため、ボルテックスしないでください。必要な場合は、サンプル混合液が透明になるまで転倒混和し続けてください。
* 5 分以上ステップ 4 を継続しないでください。
5. 350 μl の FAPD3 Buffer を加えます。直ちに 5~10 回転倒混和し、完全に中和します。
* 沈殿が局在化するのを防ぐため、FAPD3 Buffer 添加後は直ちに混和してください。
6. 最大速度 ($\sim 18,000 \times g$) で 10 分間遠心分離します。この間に FAPD Column を Collection Tube へ取り付けてください。
7. 上清を FAPD Column へ加え、 $11,000 \times g$ で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FAPD Column を Collection Tube に戻します。
* ペレットを混入させないでください。
8. 400 μl の WF Buffer を FAPD Column へ加え、 $11,000 \times g$ で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FAPD Column を Collection Tube に戻します。
* WF Buffer にエタノール (96-100%) が添加されていることを確認してください。

9. 700 μ l の Wash Buffer を FAPD Column へ加え、11,000 \times g で 30 秒間遠心分離します。ろ液を捨て、FAPD Column を Collection Tube へ戻します。
* Wash Buffer にエタノール (96~100%) が添加されていることを確認してください。
10. 最大速度 (~18,000 \times g) でさらに 3 分間遠心分離し、カラムを乾燥させます。
重要ステップ! : この操作は酵素処理を阻害する物質を取り除くために必要です。
11. FAPD Column を新しい 1.5 ml チューブ (お客様でご用意ください) へ取り付けます。
12. 50~100 μ l の Elution Buffer または ddH₂O (pH 7.0-8.5) を FAPD Column の膜中央へ加え、1 分間静置します。
重要ステップ! : 効率よく溶出させるため、Elution Buffer が完全に吸着したことを確認してください。
メモ: 50 μ l より少量で溶出しないでください。収量が低下する恐れがあります。
13. 最大速度 (~18,000 \times g) で 1 分間遠心分離します。溶出したプラスミド DNA は -20°C で保管してください。

🔧 トラブルシューティング

DNA の収量が少ない	
培養細菌が完全に溶菌していない	<ul style="list-style-type: none"> ・OD₆₀₀>10 の場合は、サンプルを複数のチューブに分けて処理してください。 ・FAPD3 Buffer を添加後、転倒混和で沈殿物を溶解すると収量を改善できます。
細菌の培養時間が長い	培養時間は 16 時間以内にしてください。
サンプル量が十分でない	最適な細菌濃度は OD ₆₀₀ >1 です。
DNA の溶出操作が不適切	Elution Buffer をカラムの膜中心に十分に吸着させてください。
DNA の溶出が不完全	10 kb より大きな DNA 断片の場合は、Elution Buffer を 60~70°C 程度に温めてから使用すると溶出効率が上がります。
WF Buffer と Wash Buffer に不備がある	WF Buffer と Wash Buffer の使用前に加えるエタノール (96-100%) 量が正しいことを確認してください。
精製したプラスミドが他のアプリケーションで良い結果を出せない	
エタノールが残留している	DNA を溶出する前に再度、最大速度 (~18,000 \times g) で 5 分間遠心分離を行う、もしくは 60°C で 5 分間インキュベートしてカラムを乾燥させてください。
ゲノム DNA が混入してしまう	
細胞を適切に溶菌していない	<ul style="list-style-type: none"> ・FAPD2 Buffer を加えた後はゆるやか転倒混和します。 また、5 分以上インキュベートしないでください。 ・最適な細菌濃度を超えたサンプル量を使用しないでください。

RNA が混入してしまう	
FAPD1 Buffer 中の RNase A が長期保管のために劣化	<ul style="list-style-type: none"> ・FAPD1 Buffer へ RNase A を加えたことを確認してください。また RNase A を加えた FAPD1 Buffer が使用期限を過ぎている場合は、RNase A を FAPD1 Buffer へ 50 μg/ml になるように追加し、4°C で保管してください。 ・細菌濃度が高濃度の場合、サンプル量を減らしてください。
プラスミド DNA が変性している	
ヌクレアーゼの混入	<p>宿主細胞が endA⁺株のようにヌクレアーゼ活性が高い場合は、ヌクレアーゼ残留物を取り除くために、追加で下記の洗浄ステップを実施してください。</p> <p>a) ステップ 8 で 400 μl の WF Buffer を FAPD Column へ加えた後、2 分間室温でインキュベートしてください。</p> <p>b) その後、$\sim 18,000 \times g$ で 30 秒間遠心分離します。ステップ 9 の洗浄ステップを続けてください。</p>
酵素処理に十分なプラスミド DNA が得られない	
溶出したプラスミド DNA がエタノール残留物を含む	ステップ 9 でろ液を捨てた後、ステップ 10 で 3 分間遠心分離してください。
電気泳動時、変性したプラスミド DNA が先に泳動してしまう	
FAPD2 Buffer でのインキュベーション時間が長すぎる	5 分以上 FAPD2 Buffer でインキュベートを行わないでください。