

# MonoFas<sup>®</sup> BAC抽出キット V トラブルシューティング

トラブル	予想原因	対処法
DNA回収量が少ない (ない)	① 大腸菌が増殖していない	最適な培養条件を検討する
	② カラムに添加した上清液(ライセート)にDNAが存在しない	従来の沈澱法を行って、DNAの存在を確認する
	③ 菌体量が多すぎる、加えたBuffer A5の量が足りない	一晚培養した培養液1 mLに対してBuffer A5を200 $\mu$ L加える 菌体に加えたBuffer A5の量を確認する
	④ LB培地が残っている	菌体に混合しているLB培地をマイクロピペットを使って、できるだけ完全に除去する
	⑤ 細胞の懸濁が不完全	菌ペレットをBuffer A5で完全に懸濁させるまで、Buffer B5を添加しない
	⑥ Buffer B5が沈澱している	Buffer B5の保存条件と使用期限をチェックする Buffer B5を約40°Cで温めて再溶解する
	⑦ 菌体溶解が完全ではない、ライセートの調製が不適切	Buffer B5を 250 $\mu$ L加え、マイクロ遠心チューブを上下反転させて混ぜる ・大腸菌が溶けて液溶解しの濁りが消えます 大腸菌のゲノムDNA と RNA, タンパク質, そしてプラスミドDNA などが溶液中に溶出し、 溶液の粘性が上がります ・ボルテックス不可 激しく攪拌するとゲノム DNA とRNAが断片化して、プラスミドDNA と分離できなくなります Buffer C5を350 $\mu$ L加え、マイクロ遠心チューブを上下反転させて混ぜる ・タンパクが不溶化し、巨大なゲノムDNAが大きな白い沈澱になります ・ここでもボルテックス不可 染色体DNAを断片化しないように注意しながら完全に混和してください
	⑧ 溶出液が適切でない	オリジナル溶出液は、10mMのTris-HCL, pH 8.5あるいはアンモニア水や水酸化カリウム などでpH 8.5~8.8に調整した水を使用する
	⑨ 溶出用Buffer E5がモノリス表面に拡散していない	モノリス表面の中央部分にBuffer E5を添加して全体が馴染むようにする
BACプラスミド品質が低い	溶出液の濃度が高すぎる、ヌクレアーゼが混入した	溶出の前に洗浄ステップを行ったことを確認する 大腸菌JMシリーズ株や野生株を用いた際には洗浄工程の追加をする 又はBACプラスミド吸着後、カラムにBuffer D5を500 $\mu$ L添加後5分間室温でインキュベ ートしてから遠心する
制限酵素消化がうまく いかない	① カラムを通過させたプラスミドにエタノール残っている	洗浄Buffer D5を添加後の遠心速度、時間を再確認する 遠心時間を延長して除去する プラスミドをエタノール沈澱で回収または濃縮する
	② 酵素濃度、消化時間が不十分	制限酵素量と消化時間を増やす 制限酵素の最適温度と最適Bufferで消化する

# MonoFas<sup>®</sup> BAC抽出キット V トラブルシューティング

トラブル	予想原因	対処法
溶出液中にRNAが存在	RNase A分解が行われていない RNase A分解が十分でない 遠心回転数・時間が不十分	使用前にRNase A BufferをBuffer A5に添加したことを確認する RNase A添加後のBuffer A5を4℃で保存する Buffer C5を添加後、慎重に混合して、室温で2～3分置いてから遠心する 遠心時間を10分間に延長する 必要なら培養液量を減らして、細胞発育速度を減速させるような培養液を調整する Buffer A5にRNase A Bufferを添加後6ヶ月以上経過し、酵素活性が減少した場合には、新しくRNase Aを添加する
	① Buffer B5を正しく添加していない、溶解が長過ぎる	Buffer B5を添加後の溶解ステップが3分間を越えないようにする
溶出液中にゲノムDNAが存在	② Buffer C5を正しく添加していない	Buffer C5を添加した後は静かにマイクロ遠心チューブを上下転倒する Buffer C5を添加後、上清液(ライセート)を丁寧に回収し、DNAの切断を避ける 上清液の粘性が高い場合は、培養液量を減らす
	③ 培養時間が長すぎる	培養時間が長すぎると細胞が溶解し、分解DNAが生じる。細胞は12～16時間以上培養しない