

Monofas[®]

研究用試薬キット

プラスミド抽出キットⅢ

取扱説明書



株式会社アニモス

目次

1. 製品説明	- 3 -
2. 製品内容	- 3 -
3. 製品仕様	- 4 -
4. 必要な試薬及び器具	- 4 -
5. カラム使用上の注意事項	- 4 -
6. DNA 抽出プロトコールの簡易フロー	- 5 -
7. 保存及びその他の注意	- 6 -
8. 保証期間	- 6 -

1. 製品説明

この度は MonoFas[®] シリーズ プラスミド抽出キットⅢをお買い上げ頂きありがとうございます。本製品は均一な連続孔を持つディスク型シリカモノリスを固定したモノリス固相カラムです。DNA がシリカゲル(シリカは石英などの結晶性シリカと、シリカゲル・未焼成の珪藻土や生物中に存在する非結晶性シリカの 2 つに大別される。)に吸着する特性を利用して、JM シリーズや DH5 α のような大腸菌 (*E. Coli*) 宿主を用いて増殖した低コピー・プラスミド (pBR322 など)、高コピー・プラスミド (pUC19 など) の高純度な抽出・精製が行えます。サイズの異なる種々のプラスミドも、同様の手法 (遠心法) を用いて簡単に回収できます。また得られたプラスミドは、そのまま制限酵素処理や DNA 配列解析などに使用することが可能です。性能を十分に発揮させるために本取扱説明書をよくお読みのうえ正しくお使いください。

2. 製品内容

本製品を受け取りましたら、梱包内容、スピнкаラムの外観、数量、バッファー液等に異常がないか確認してください。内容違い、数量違い、スピнкаラムの外観等に異常がありましたら、すみやかに弊社へご連絡ください。

Cat. No.	A03-0101	A03-0102	A03-0103	A03-0104
回数	25 本	50 本	100 本	250 本
スピнкаラム	25 本 × 1 袋	50 本 × 1 袋	50 本 × 2 袋	50 本 × 5 袋
Buffer A3 (細胞懸濁)	7 mL	14 mL	28 mL	70 mL
Buffer B3 (細胞溶菌) ※1	7 mL	14 mL	28 mL	70 mL
Buffer C3 (細胞中和・吸着)	9 mL	17 mL	33 mL	83 mL
Buffer D3 (洗浄)	14 mL	28 mL	55 mL	138 mL
Buffer E3 (溶出) ※2	6 mL	6 mL	11 mL	28 mL
RNase A ※3	1 mg	2 mg	4 mg	10 mg

※ 溶出液を回収するチューブは付属しておりません。別途 1.5 mL~2.0 mL の遠心チューブを用意して下さい。

※1 Buffer B3 に析出物がみられる場合には、約 40 °C で再溶解してからご使用ください。

※2 Buffer E3 の組成は、10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA (Free) (pH 8.5) です。

※3 RNase A は、20 mg/mL 又は 100 mg/mL に調製されています。Buffer A3 に全量を添加後、4°C で保存してご使用ください。

3. 製品仕様

本プロトコールは、LB (Luria-Bertani) 培養液で一晩培養した大腸菌培養液 1~3 mL から 15 µg までの高コピー・プラスミド、一晩培養した大腸菌培養液 1~5 mL から 5 µg までの低コピー・プラスミド抽出用にデザインされています。

大腸菌培養液からのプラスミド抽出	
操作時間	8 分間
高コピー・プラスミド回収率	15 µg/mL culture
低コピー・プラスミド回収率	5 µg/mL culture
大腸菌培養液処理量	1~3 mL
推奨溶出量	50~100 µL

4. 必要な試薬及び器具

- ① MonoFas® プラスミド抽出キット III
- ② RNase A (20 mg/mL or 100 mg/mL)
- ③ イソプロパノール(特級)
- ④ 1.5mL 遠心チューブ
- ⑤ 高速マイクロ遠心機(20,000 × g (15,000 rpm)の遠心が可能なもの) *
- ⑥ ドライバスと 1.5mL チューブ用ヒートブロックまたはウォーターバス(70°Cで使用可能なもの)
- ⑦ ボルテックスミキサー(2,500 rpm 程度の攪拌ができるもの)
- ⑧ マイクロピペット、マイクロピペット用チップ

* 遠心機によっては使用できないケースがありますので、遠心機の仕様をご確認の上、使用してください。

また本書での以下の基本計算式をもとに相対遠心加速度(×g)と回転数(rpm)を算出しております。

ローターの回転半径は、遠心機によって変わりますので、遠心機取扱説明書のローター仕様ページをご確認ください。

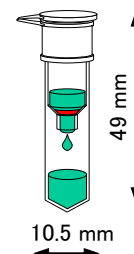
基本計算式

$$RCF = 1.118 \times R \times N^2 \times 10^{-6}$$

RCF: 相対遠心加速度(×g) R: 回転半径(mm) N: 回転数(rpm)

5. カラム使用上の注意事項

- MonoFas® スピнкаラムは落としたり、ぶついたりしないでください。強い衝撃を与えるとシリカモノリスが割れることがあります。
- Buffer の保証期間は未開封、室温保存で購入日より1年間です。
- すべての工程は遠心操作で行ってください。
- オートクレーブ処理を行う場合には 110°C以下、20 分以内で行ってください。
- MonoFas® スピнкаラムは従来のタイプより通液抵抗が小さくなっておりますので、液の流出を止める場合にはスピнкаラムの蓋を閉めるようにしてください。
- 遠心機を用いる場合はチューブ類が装置の蓋などに接触しない事を確認の上ご使用ください。サイズは右図をご参照下さい。
- 遠心操作時はチューブの蓋を開けた状態で使用してください。蓋を閉めた状態では、スピнкаラム内が陰圧になるためスムーズに通液されません。
- MonoFas® スピнкаラムは遠心機以外に、GL-SPE 吸引マニホールドや、QIAvac6c(ルアーアダプター)吸引マニホールドなどの固相抽出用アクセサリがご利用になれます。



MonoFas® プラスミド抽出キット III

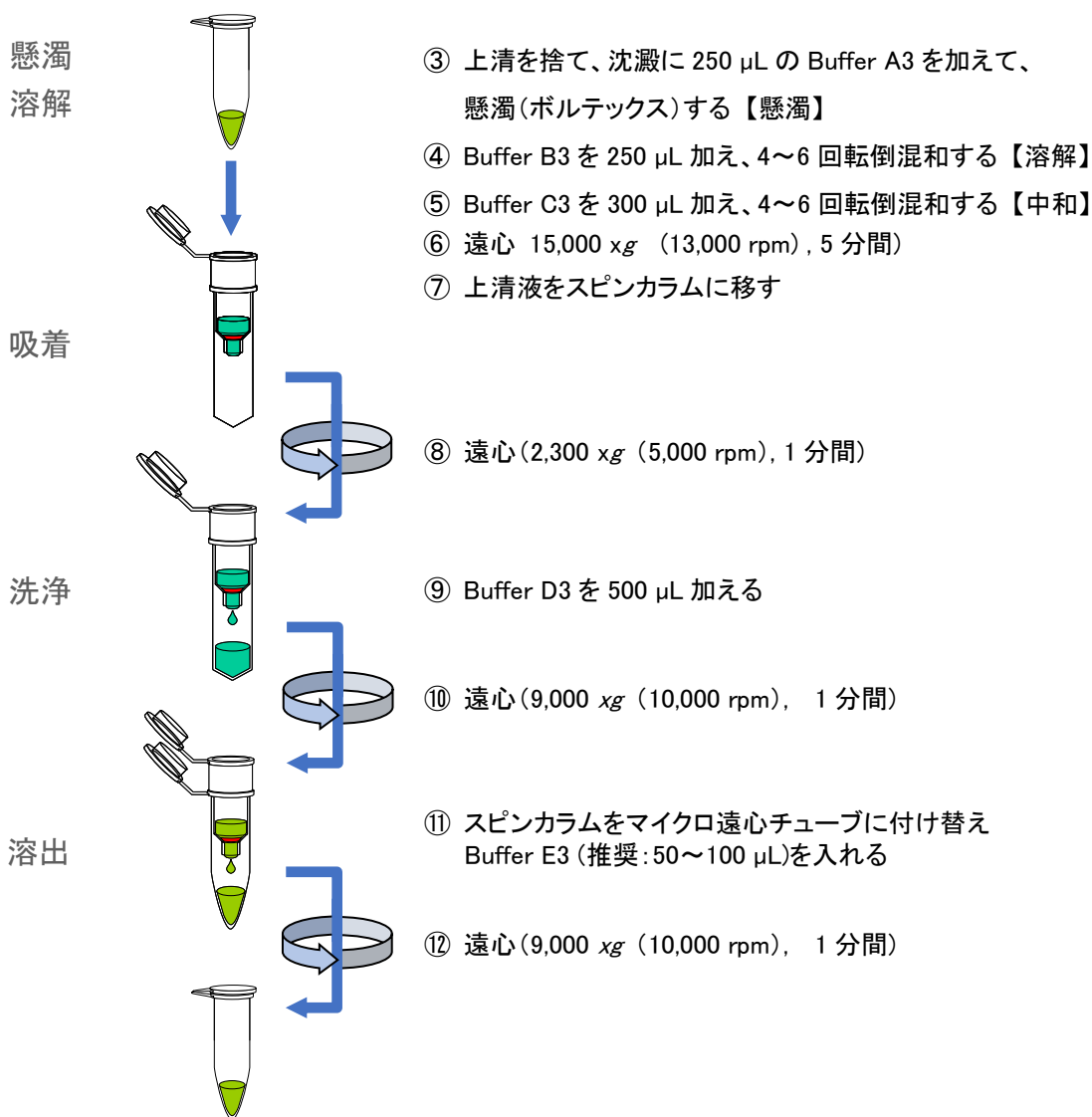
※GL-SPE 吸引マニホールドはジーエルサイエンス社の、QIAvac6s はキアゲン社の製品です。

- 精製 DNA を分子生物学的操作に用いる場合には、十分に滅菌された容器や滅菌水などを用いてください。
- 本製品は消耗品ですので再使用はできません。
- ご所属の機関の倫理委員会の規定に従い作業してください。また、カラムの廃棄の際には、遺伝情報が残らないことと、感染症への配慮を考慮してください。
- 余ったバッファーの廃棄方法は、安全データシート(SDS)に記載された通り廃棄ください。

6. DNA 抽出プロトコールの簡易フロー

本プロトコールを用いると、大腸菌培養液 1~3 mL からプラスミドを抽出することができます。ご使用前に遠心機を $9,000 \times g$ (10,000 rpm) に設定してください。また Buffer A3 に RNase A を加えたことを確認してください。

- ① 大腸菌培養液 1~3 mL を遠心チューブに入れる
- ② 遠心 ($15,000 \times g$ (13,000 rpm), 1 秒間)



<注意事項>

工程③: 上清はできるだけ除去してください。

工程④: 大腸菌中のプラスミド DNA、ゲノム DNA、RNA、タンパク質が溶解します。激しく攪拌するとゲノム DNA と RNA が断片化するため、転倒混和はやさしく行ってください。

また、工程④から工程⑥の遠心前までは、3 分間以内で行ってください。

工程⑤: タンパク質が可溶化し、巨大なゲノム DNA が大きな白い沈殿になります。激しく攪拌するとゲノム DNA が断片化してしまう、転倒混和はやさしく行ってください。また純粋なプラスミド DNA を回収するために、混和は確実にこなってください。

工程⑨: Buffer D3 が残余すると回収率が悪くなる場合がありますので注意してください。

工程⑩: Buffer E3 はモノリス表面の中央に添加してください。

Buffer E3 は、RNase・DNase フリー滅菌水に置き換えることができます。その場合、pH により回収率が変動するためアンモニア水や水酸化カリウムなどで pH 8.5~8.8 に調整してご使用ください。

7. 保存及びその他の注意

- 室温(15°C ~ 25°C)で保存してください。
- 洗浄液には、揮発性のエタノールが含まれており、ご使用後は、蒸発を防ぐために必ず蓋を閉めてください。
- MonoFas[®] 抽出・精製キットは温度変化が小さく、湿気の少ない涼しく清浄な暗所に保管してください。
- MonoFas[®] 抽出・精製キットは厳しい品質管理のもとで製造、検査、包装、出荷しておりますが、万一不具合がありましたら弊社までご連絡ください。
- 本製品はプラスミド抽出の目的で製造しております。それ以外の目的での使用および本取扱説明書に基づかない方法では使用しないでください。
- 本試薬キットを使用前に、安全データシート(SDS)の記載内容を一読ください。
安全データシート(SDS)の詳細は弊社 HP(URL <http://www.animos.co.jp>)よりダウンロードして入手願います。

8. 保証期間

- 各種 Buffer の保証期間は未開封、室温保存で購入後 1 年間です。
各種 Buffer が追加が必要な際には、最寄りの支店または営業所までご連絡ください。

ゾルーゲル法によるシリカモノリスは、国立大学法人京都大学 曾我直弘先生、中西和樹先生により開発されました。この技術と、ジーエルサイエンス株式会社が所有する製品商標及び特許のライセンスを受けて、MonoFas[®] シリーズ製品を株式会社アニモスが開発・製造しています。

お問い合わせ先 : 株式会社アニモス

〒333-0844 埼玉県川口市上青木 3-12-18

TEL:048-606-2829 FAX:048-611-7192 E-mail:monofas@animos.co.jp

MonoFas[®] プラスミド抽出キット III