

MonoFas[®]

研究用試薬キット

BAC 抽出キット V

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

MonoFas® BAC(bacterial artificial chromosome) 抽出キットⅤ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、大腸菌 (E.Coli) 宿主を用いて増殖した低コピーBAC プラスミドの高純度な抽出・精製が行えます。サイズの異なる種々の BAC プラスミド (40~240 Kbp 確認済み) 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 BAC プラスミドは、そのまま 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上、正しく使用してください。

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.	A05-0101	A05-0102	A05-0103	A05-0104
回数	25	50	100	250
スピнкаラム	25 本×1 袋	50 本×1 袋	50 本×2 袋	50 本×5 袋
Buffer A5(細胞懸濁)	7 mL	14 mL	28 mL	70 mL
Buffer B5(細胞溶菌)※1	7 mL	14 mL	28 mL	70 mL
Buffer C5(細胞中和・吸着)	9 mL	17 mL	33 mL	83 mL
Buffer D5(洗浄)	14 mL	28 mL	55 mL	138 mL
Buffer E5(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 B5 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 E5 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 A5 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 1~8 mL から 5 µg までの低コピー BAC 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 BAC プラスミド抽出	
操作時間	10 分間
低コピー数 BAC の回収量	5 µg
大腸菌培養液	1~8 mL
培養(時間、O.D.)	12~14 時間、O.D.=2.0~2.5
推奨溶出量	50~100 µL
DNA 純度(O.D.260/280)	1.7~1.9

4. 必要な試薬及び器具

- ① MonoFas® BAC 抽出キット V
- 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。

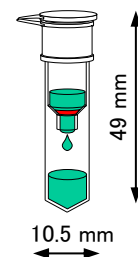
基本計算式

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

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、ぶつけ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して、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



MonoFas® プラスミド抽出キット III

ためスムーズに通液されません。

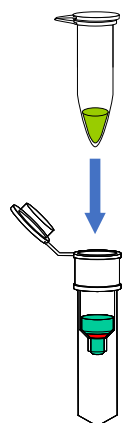
- MonoFas[®] スピнкаラムは遠心機以外に、GL-SPE 吸引マニホールドや、QIAvac6c(ルアーアダプター)吸引マニホールドなどの固相抽出用アクセサリがご利用になれます。
※GL-SPE 吸引マニホールドはジーエルサイエンス社の、QIAvac6s はキアゲン社の製品です。
- 精製 DNA を分子生物学的操作に用いる場合には、十分に滅菌された容器や滅菌水などを用いてください。
- 本製品は消耗品ですので再使用はできません。
- ご所属の機関の倫理委員会の規定に従い作業してください。また、カラムの廃棄の際には、遺伝情報が残らないことと、感染症への配慮を考慮してください。
- 余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 抽出プロトコルの簡易フロー

本プロトコルを用いると、大腸菌培養液 1~8 mL から BAC プラスミドを抽出することができます。ごまた Buffer A5 に RNase A を加えたことを確認してください。

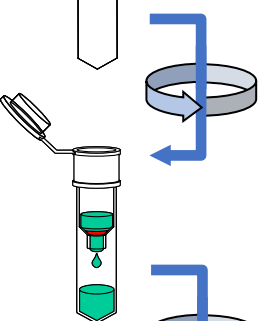
- ① 大腸菌培養液 1~8 mL を遠心チューブに入れる
- ② 遠心 (15,000 xg (13,000 rpm), 1 秒間)

懸濁
溶解



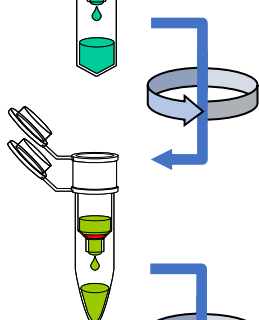
- ③ 上清を捨て、沈澱に 250 μL の Buffer A5 を加えて、懸濁(ボルテックス)する【懸濁】
- ④ Buffer B5 を 250 μL 加え、4~6 回転倒混和する【溶解】
- ⑤ Buffer C5 を 300 μL 加え、4~6 回転倒混和する【中和】
- ⑥ 遠心 (15,000 xg (13,000 rpm), 5 分間)
- ⑦ 上清液をスピнкаラムに移す

吸着



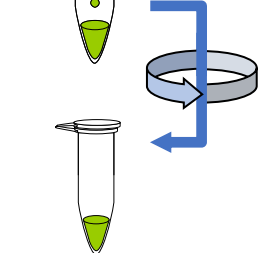
- ⑧ 遠心 (2,300 xg (5,000 rpm), 1 分間)

洗浄



- ⑨ Buffer D5 を 500 μL 加える
- ⑩ 遠心 (9,000 xg (10,000 rpm), 1 分間)

溶出



- ⑪ スピнкаラムをマイクロ遠心チューブに付け替え Buffer E5 (推奨: 50~100 μL)を入れる
- ⑫ 遠心 (9,000 xg (10,000 rpm), 1 分間)

MonoFas[®] プラスミド抽出キット III

<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 BAC 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 BAC プラスミド DNA を回収するために、混和は確実に起こってください。

工程⑨: Buffer D5 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 E5 はモノリス表面の中央に添加してください。

Buffer E5 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 BAC 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 が追加で必要な際には、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