

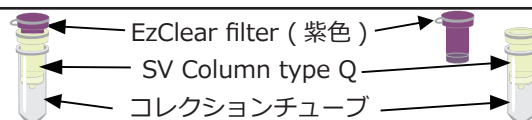
シカジーニアス® プラスミドプレップキット2

実験を行う前に…

- ・初回使用時に規定量のエタノールを④Buffer AW、②Buffer PWに加えて下さい。
- ・初回仕様時に全量の⑦RNase Aを①Buffer S1に加えて下さい。⑦RNase Aを添加した①Buffer S1は4℃で保管して下さい。
- ・②Buffer S2と③Buffer G3に沈殿が生じた場合には37℃でインキュベートし、沈殿をよく溶かしてからご使用下さい。

※迅速プロトコルでは、EzClear FilterはSV Column type Qにセットして使用します。

迅速プロトコル以外の方法ではEzClear Filterを使用しません。



培地使用量 ～ 3 mL

【迅速プロトコル】

- 1) サンプル：1～3 mL
遠心，13,000×g，室温，1分間
：上清を捨て菌体を回収
(サンプル量に応じて回数を調整)
- 2) ①Buffer S1：170 μL
懸濁 ピペッティング
- 3) ②Buffer S2：170 μL
転倒混和3～4回
- 4) ③Buffer G3：250 μL
転倒混和4～5回
- 5) EzClear FilterをSV Column type Qに重ね、
コレクションチューブをセット
上清を EzClear Filterに移す
遠心 10,000×g，室温，
30～60秒間
- EzClear Filterを捨て、
ろ液を捨てSV Column type Q
を再セット
- 6) ④Buffer AW：500 μL
遠心 10,000×g，室温，30秒間
ろ液を捨てカラムを再セット
※ホストがendA+株の場合実施
- 7) ⑤Buffer PW：700 μL
遠心 10,000×g，室温，30秒間
ろ液を捨てカラムを再セット
- 8) 遠心 10,000×g，室温，1分間
1.5 mLチューブにカラムをセット
- 9) ⑥Buffer EB：50 μL
静置 室温，1分間
遠心 10,000×g以上，室温，1分間

プラスミドDNA溶液

培地使用量 ～ 5 mL

【通常プロトコル】

- 1) サンプル：5 mL
遠心，10,000×g，室温，5分間
：上清を捨て菌体を回収
(チューブに応じて時間・回数を調整)
- 2) ①Buffer S1：250 μL
懸濁 ピペッティング
- 3) ②Buffer S2：250 μL
転倒混和4回
- 4) ③Buffer G3：350 μL
転倒混和4～6回
- 5) 遠心 10,000×g，室温，10分間
- 6) 上清をSV column type Qに移す
遠心 10,000×g，室温，30秒間
ろ液を捨てカラムを再セット
- 7) ④Buffer AW：500 μL
遠心 10,000×g，室温，30秒間
ろ液を捨てカラムを再セット
※ホストがendA+株の場合実施
- 8) ⑤Buffer PW：700 μL
遠心 10,000×g，室温，30秒間
ろ液を捨てカラムを再セット
- 9) 遠心 10,000×g，室温，1分間
1.5 mLチューブにカラムをセット
- 10) ⑥Buffer EB：50 μL
静置 室温，1分間
遠心 10,000×g以上，室温，1分間

プラスミドDNA溶液

培地使用量 10 mL

【Low-copy 用プロトコル】

- 1) サンプル：10 mL
遠心，10,000×g，室温，5分間
：上清を捨て菌体を回収
(チューブに応じて時間・回数を調整)
- 2) ①Buffer S1：400 μL
懸濁 ピペッティング
- 3) ②Buffer S2：400 μL
転倒混和4回
- 4) ③Buffer G3：600 μL
転倒混和4～6回
- 5) 遠心 10,000×g，室温，10分間
- 6) 上清を2 mLチューブに移す
7) 700 μLを上澄を
SV column type Qに移す
遠心 10,000×g，室温，30秒間
8) 上澄がなくなるまで繰り返す
ろ液を捨てカラムを再セット
- 9) ④Buffer AW：500 μL
遠心 10,000×g，室温，30秒間
ろ液を捨てカラムを再セット
- 10) ⑤Buffer PW：700 μL
遠心 10,000×g，室温，30秒間
ろ液を捨てカラムを再セット
- 11) 遠心 10,000×g，室温，1分間
1.5 mLチューブにカラムをセット
- 12) ⑥Buffer EB：50 μL
静置 室温，1分間
遠心 10,000×g以上，室温，1分間

プラスミドDNA溶液

*10kb 以上の大きなプラスミドの場合、最終ステップのプラスミド DNA の溶出には、SV Column type Q のメンブレンの中心に予め70℃に加熱した必要分の⑥Buffer EBもしくは脱イオン水を加え、室温で2分間静置してから遠心し、プラスミドDNA溶液を回収して下さい。

シカジーニアス® プラスミドプレップキット2

トラブルシューティング

現象	考えられる原因	対策
プラスミド DNA の回収量が少ない	サンプル中の細胞数が多すぎる	サンプルは抗生物質を加えた培地で 16 ～ 21 時間培養したものを使用し、適宜サンプル量を減らして下さい。特に、リッチ培地 (TB や 2×YT) で培養すると、細胞密度が高すぎる場合がありますので注意して下さい。
	低コピー数プラスミドを使用している	低コピー数プラスミドは、5 mL の 16 ～ 21 時間培養した培養液をサンプルとして使用しても 0.5 µg 程度しか回収できない場合があります。サンプル量を増やすか、可能ならばリッチ培地で培養したサンプルを使用して下さい。
	ペレットの懸濁が不十分	①Buffer S1 にて、ペレットを完全に懸濁して下さい。
	RNase 処理が不十分	RNA が過剰に混入していると、SV Column type Q へのプラスミド DNA の結合が阻害されます。⑦RNase A を加えた①Buffer S1 は 4 °C で保存して下さい。
純度が低い	沈殿物が混入している	SV Column type Q に上清を移す際に、沈殿物を吸わないように注意して下さい。
ゲノム DNA が混入している	③Buffer G3 を加えて激しく混和している	③Buffer S3 を加えた後に激しくボルテックスを行うと、染色体 DNA が切断され、染色体 DNA の混入が生じる可能性があります。③Buffer S3 を加えた後は穏やかに混和して下さい。
プラスミド DNA を電気泳動すると、バンドがスミアになる	溶解時間が長い	②Buffer S2 において、溶解時間は 5 分を超えないようにして下さい。
	②Buffer S2 を加えて激しく混和している	②Buffer S2 を加えた後に激しく混和を行うと、プラスミド DNA の不可逆変性が生じる可能性があります。②Buffer S2 を加えた後は穏やかに混和して下さい。
溶出液の塩濃度が高い	洗浄ステップが不十分	⑤Buffer PW を加えた後に 5 分間室温で静置してから遠心して下さい。
プラスミド DNA を電気泳動する際、アガロースゲルに入らない	エタノールが完全に除去できていない	⑤Buffer PW を加えた後に洗浄ステップが適切に行われ、⑥Buffer EB を加える前に SV Column type Q を完全に乾燥させる必要があります。
プラスミド DNA の酵素処理がうまくいかない	溶出液の塩濃度が高すぎる	洗浄工程がプロトコール通りに行われたことを確認してください。洗浄ステップを繰り返すことで、溶出液中の高濃度の塩を除去できる場合があります。
	エタノールが完全に除去できていない	⑤Buffer PW を加えた後に洗浄ステップが適切に行われ、⑥Buffer EB を加える前に SV Column type Q を完全に乾燥させる必要があります。