

プラスミド DNA 抽出キット

ISOSPIN Plasmid

マニュアル（第 5 版）

Code No. 318-07991

NIPPON GENE CO., LTD.

I 製品説明

ISOSPIN Plasmid (アイソスピン プラスミド) は、スピncラムを用いて簡単に大腸菌から高純度なプラスミド DNA を抽出できるキットです。

本キットは、カオトロピックイオン存在下で DNA がシリカへ吸着する原理を応用しており、フェノールやクロロホルムなどの毒性有機溶媒を使用しません。使用するスピncラムは、カラム容積を最大限確保しており、内封されたシリカゲル膜は、十分な DNA 吸着容量と高い溶出効率を確保しています。本キットを使用して得られたプラスミド DNA は、制限酵素反応、形質転換、シーケンスなどの分子生物学実験に使用することができます。

II キット内容

キット内容品	(100 回用)	備考
IS1 Buffer	30 ml × 1 本	※
IS2 Buffer	30 ml × 1 本	
IS3 Buffer	40 ml × 1 本	
ISPW Buffer	60 ml × 1 本	
ISW Buffer	100 ml × 1 本	
ISE Buffer	10 ml × 1 本	組成 : 10 mM Tris-HCl (pH 8.5)
RNase A (100 mg/ml)	60 μ l × 1 本	※
Spin Column	50 本 × 2 袋	上部パーツ : カラム 下部パーツ : Collection Tube

※次ページの<キットをはじめて使用する際の準備>参照

III 保存

室温保存

- ・ RNase A は室温保存可能ですが、長期間使用しない場合は冷蔵保存もしくは冷凍保存 (−20℃) して下さい。また、RNase A 添加後の IS1 Buffer は冷蔵保存して下さい。
- ・ ISW Buffer にはエタノールが含まれています。ご使用後は蒸発を防ぐため速やかに蓋を閉め、保管して下さい。

IV 使用上の注意

- ・ 本品は、試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
- ・ 試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱わないで下さい。
- ・ 本品の取り扱いは、マニュアル記載内容通りに行ってください。
- ・ マニュアル記載内容と異なった取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。
- ・ 製品安全性データシート（MSDS）につきましては、ニッポンジーンホームページを閲覧下さい。

V プロトコール

<キット以外に必要な器具、機器など>

- ・ マイクロピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ 1.5 ml マイクロチューブ
- ・ 遠心分離機

<キットをはじめて使用する際の準備>

- キットの中の RNase A (100 mg/ml) を IS1 Buffer の中に全量添加し、混合する。IS1 Buffer のボトルラベルに RNase A を添加したことを書いておく（RNase A 添加後の IS1 Buffer は冷蔵保存して下さい）。

<抽出に使用する大腸菌培養液の準備>

抗生物質を含む LB 寒天培地からシングルコロニーを取り、同じ抗生物質を含む LB 液体培地へ接種し、37°C の振とう培養器で一晩（12～16 時間）培養する。長時間培養すると細胞が溶解するため、培養は長時間行わないようにする。本キットでは、1 回あたり 1～5 ml の LB 培地から高コピープラスミドの抽出を行う（低コピープラスミドの場合、1～10 ml の LB 培地から抽出する）。

- 例) 高コピープラスミド : pUC 系ベクターなど
低コピープラスミド : pBR 系ベクターなど

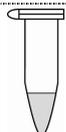
<抽出プロトコールを始める前の確認>

- IS1 Buffer に RNase A が添加済みであるか確認する。
- IS2 Buffer に沈殿が見られた場合、37°C で保温し沈殿が完全に溶解してから使用する。

<抽出プロトコール>

- ① 37°Cで一晩（12～16 時間）振とう培養した大腸菌培養液を 1.5-2 ml マイクロチューブに移して遠心（10,000×g、5 分間、室温）し、上清を捨てて、大腸菌の沈殿を回収する。

注）使用する液量は前ページの<抽出に使用する大腸菌培養液の準備>参照。



- ② 大腸菌の沈殿に IS1 Buffer（RNase A 添加済み）を 250 μl 加え、ボルテックスまたはピペティングにより大腸菌の塊がなくなるまで懸濁する。

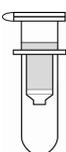
- ③ IS2 Buffer を 250 μl 加え、溶液が透明になるまで 4～6 回穏やかに転倒混和する。

注）ゲノム DNA が切断されるので、ボルテックスなど激しい攪拌はしない。また、このステップは 5 分間以上行わないようにする。

- ④ IS3 Buffer を 350 μl 加え、溶液が完全に混合するように 4～6 回転倒混和する。

注）ボルテックスなどの激しい攪拌はしない。

- ⑤ 遠心（12,000×g、10 分間、室温）する。

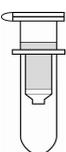


- ⑥ メンブレンに DNA を吸着させるため、上清を全量 Spin Column に添加する。

注）上清（～800 μl）を取るときに、白い沈殿を吸い取らないように注意する。

- ⑦ 遠心（12,000×g、1 分間、室温）する。

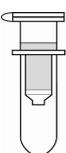
- ⑧ Spin Column のカラムを外し、Collection Tube 中のろ液を捨てた後、カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。



- ⑨ 500 μl の ISPW Buffer を Spin Column に添加する。

- ⑩ 遠心（12,000×g、1 分間、室温）する。

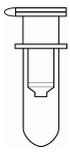
- ⑪ ろ液を捨てて、カラムを Collection Tube に再度戻す。



- ⑫ 洗浄のため、750 μl の ISW Buffer を Spin Column に添加する。

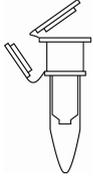
- ⑬ 遠心（12,000×g、1 分間、室温）する。

- ⑭ ろ液を捨てて、カラムを Collection Tube に再度戻す。



- ⑮ Spin Column を空の状態のまま遠心（12,000×g、1 分間、室温）し、メンブレンを乾燥させる。

注） ISW Buffer に含まれるエタノール分を取り除くため。



- ⑯ Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上へのせる。

- ⑰ DNA を溶出させるため、50 μ l の ISE Buffer をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置する。

注） ISE Buffer（10 mM Tris-HCl, pH 8.5）の代わりに Nuclease フリー水や TE（pH 8.0）も溶出液として使用できる。回収したプラスミド DNA 溶液を長期保存する場合は、EDTA を含む TE（pH 8.0）の使用を勧める。

- ⑱ 遠心（12,000×g、1 分間、室温）する。

- ⑲ プラスミド DNA 溶液が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される。

<簡易プロトコール>

大腸菌培養液 1~5 ml (低コピープラスミドの場合 1~10 ml)

遠心 (10,000 × g, 5 分間, 室温)
上清を捨てる

大腸菌 (沈殿)

← 250 μl の IS1 Buffer (RNase A 添加済み) を添加
ボルテックスなどで大腸菌の塊がなくなるまで懸濁

← 250 μl の IS2 Buffer を添加
透明になるまで 4~6 回穏やかに転倒混和 (5 分間以上行わない)

← 350 μl の IS3 Buffer を添加
4~6 回転倒混和

遠心 (12,000 × g, 10 分間, 室温)

Spin Column に上清を全量添加 (沈殿物はいれないようにする)

遠心 (12,000 × g, 1 分間, 室温)
ろ液を捨てる

← 500 μl の ISPW Buffer を添加

遠心 (12,000 × g, 1 分間, 室温)
ろ液を捨てる

← 750 μl の ISW Buffer を添加

遠心 (12,000 × g, 1 分間, 室温)
ろ液を捨てる

空の状態遠心 (12,000 × g, 1 分間, 室温)

Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に移す

← 50 μl の ISE Buffer をメンブレン中央に滴下
室温静置 3 分間

遠心 (12,000 × g, 1 分間, 室温)

プラスミド DNA

VI トラブルシューティング

トラブル	対 策
低収量	低コピープラスミドであった。プラスミドのコピー数を確認し、必要に応じて培養量を増やす。
	ISE Buffer がメンブレン中央にアプライされるように添加する。添加後、室温で3分間から5分間ほど放置する。
プラスミド DNA の純度が低い	吸光度測定には、TE (pH 8.0) など pH 8.0 以上のバッファーを使用する。
	ISW Buffer での洗浄後、必ず空の Spin Column の遠心を行う。もしエタノールが残留しているようであれば、空の Spin Column の遠心時間を5分間に延ばす。
RNA の混入	IS1 Buffer に RNase A を添加したことを確認する。
	RNase A 添加後の IS1 Buffer は冷蔵保存 (2°C~10°C) する。
ゲノム DNA の混入	IS2 Buffer 添加後、ボルテックスしない。
	IS2 Buffer 添加後、長時間放置しない。
	培養時間を確認する。培養時間が長すぎると細胞が溶解しゲノム DNA が混入することがある。
	IS3 Buffer 添加後の遠心上清を取るときに、沈殿をとらないようにする。

VII データ

<製品性能>

DNA 吸着容量	20 μ g
カラム容量	900 μ l
溶出液量	50 μ l
最大プラスミドサイズ	20 kbp

VIII 関連製品

Code No.	製品名	包装単位
316-90025	TE (pH8.0)	500 ml
314-90021		100 ml
310-90023		100 ml×6 本
316-90405	1M Tris-HCl (pH8.5)	500 ml
314-90401		100 ml
318-90105	Distilled Water, Deionized, Sterile	500 ml
316-90101		100 ml
312-90103		100 ml×6
310-06236	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> DH5 α	50 μ l×40 本
316-06233		100 μ l×20 本
314-06234		100 μ l×80 本
312-07031	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> DH5 α -Jumbo Pack-	500 μ l×6 本
317-06246	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> JM109	50 μ l×40 本
313-06243		100 μ l×20 本
311-06244		100 μ l×80 本
317-06523	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> XL1-Blue	100 μ l×10 本
315-06524		100 μ l×20 本
314-06533	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> BL21(DE3)	100 μ l×10 本
312-06534		100 μ l×20 本
310-07733	ECOS™ X Competent <i>E. coli</i> DH5 α	100 μ l×10 本

マニュアル記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。

お問い合わせ先

株式会社ニッポンジーン
研究試薬部 学術営業課

TEL 076 - 451 - 6548

URL <http://www.nippongene.com/siyaku/>

お問い合わせは、お電話もしくはWEB フォームより承っております。