

PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits

Catalog nos. K2100-02, K2100-03, K2100-04, K2100-05, K2100-06, K2100-07
250788 Version D; 18 March 2008

QUICK
REFERENCE
CARD

Mini、Midi、 MaxiPrepを はじめる前に

- チューブラベルの指示に従って、RNase AをResuspension Buffer(R3)に加え、よく混合してください。ラベルにRNase Aを加えた事を示すチェックを入れ、4°Cで保存してください。
- Lysis Buffer(L7)に沈殿物が見られる場合は、37°Cのウォーターバスで温め溶解してください。Lysis Buffer(L7)はシェイクしないでください。
- カラム精製の全ステップで、Nucleic Acid Purification Rackを使用してください。

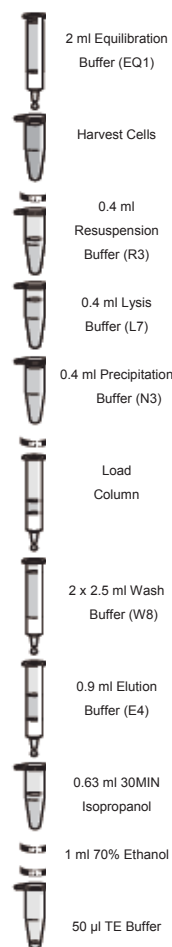
Miniprep手順

カラムの平衡化

2 mlのEquilibration Buffer(EQ1)をカラムに添加し、HiPure Miniカラムを平衡化してください。カラム内のバッファーは重力落下により除去してください。

プラスミドの精製

- LB培地で形質転換大腸菌を培養してください。
- 一晩培養した大腸菌をペレット化してください(培養液量は高コピープラスミドで1~3 ml、低コピープラスミドで10~15 ml)。
- RNase Aを含む0.4 mlのResuspension Buffer(R3)をペレットに加え、均一になるまで再懸濁してください。
- 0.4 mlのLysis Buffer(L7)を加え、5回チューブを転倒することにより緩やかに混合してください。ボルテックスはしないでください。混合後、室温で5分間インキュベートしてください。
- 0.4 mlのPrecipitation Buffer(N3)を加え、すぐにチューブを転倒することにより混合物が均一になるまで混合してください。ボルテックスはしないでください。
- 15,000 x g以上、室温で10分間遠心を行なってください。
- 上清をピペットで慎重に取り出し、平衡化したカラム上に添加してください。重力落下によりカラム内の溶液を流し、溶出液は除去してください。
- 2.5 mlのWash Buffer(W8)でカラムを2回洗浄してください。重力落下により、カラム内の溶液を流し、溶出液は除去してください。
- 0.9 mlのElution Buffer(E4)をカラムに加え、重力落下により精製DNA溶液を溶出チューブに溶出させてください。溶出チューブには、精製DNAが含まれません。
- 0.63 mlのイソプロパノールを溶出チューブに加え、よく混合してください。15,000 x g以上、4°Cで30分間遠心を行い、上清を除去してください。
- 1 mlの70%エタノールを加え、15,000 x g以上、4°Cで5分間遠心を行い、上清を除去してください。
- ペレットを10分間室温にて放置乾燥させたのち、50 µlのTE Buffer (TE)に再懸濁させてください。プラスミドDNA溶液は-20°Cで保存してください。

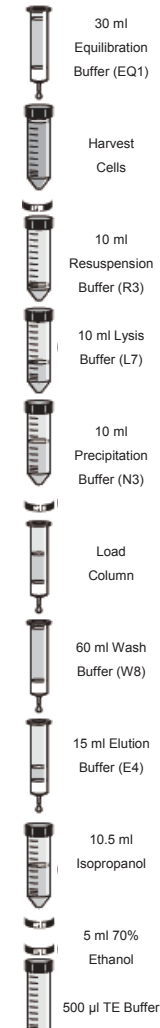


Midiprep手順

注釈	PureLink™ HiPure Precipitator Module (Cat.No.K2100-21)を使用することにより、遠心を行わず、10分以内にプラスミドDNAを濃縮することが可能です。
カラムの平衡化	10 mlのEquilibration Buffer (EQ1)をカラムに添加し、HiPure Midiカラムを平衡化してください。カラム内のバッファーは重力落下により除去してください。
プラスミドの精製	<ol style="list-style-type: none">1. LB培地で形質転換大腸菌を培養してください。2. 一晚培養した大腸菌をペレット化してください(培養液量は高コピープラスミドで15~25 ml、低コピープラスミドで25~100 ml)。3. RNase Aを含む4 mlのResuspension Buffer (R3)をペレットに加え、均一になるまで再懸濁してください。4. 4 mlのLysis Buffer (L7)を加え、5回チューブを転倒することにより緩やかに混合してください。ボルテックスはしないでください。混合物を室温で5分間インキュベートしてください。5. 4 mlのPrecipitation Buffer (N3)を加え、すぐにチューブを転倒することにより混合物が均一になるまで混合してください。ボルテックスはしないでください。6. 15,000 x g以上、室温で10分間遠心を行ってください。7. 上清をピペットで慎重に取り出し、平衡化済カラム上に添加してください。重力落下により溶液を流し、溶出液は除去してください。8. 10 mlのWash Buffer (W8)でカラムを2回洗浄してください。重力落下により、カラム内の溶液を流し、溶出液は除去してください。9. 5 mlのElution Buffer (E4)をカラムに加え、重力落下により精製DNA溶液を溶出チューブに溶出させてください。カラム上に残った溶液を強制的に流さないでください。溶出チューブには、精製DNAが含まれません。10. 3.5 mlのイソプロパノールを溶出チューブに加え、よく混合してください。 注記: PureLink™ HiPure Precipitatorを使用してDNAを沈殿させる場合は、本ステップ後、PureLink™ Precipitatorマニュアルに記載されているプロトコールに従ってください。11. 15,000 x g以上、4°Cで30分間遠心を行い、上清を除去してください。12. 3 mlの70%エタノールを加え、15,000 x g以上、4°Cで5分間遠心を行い、上清を除去してください。13. ペレットを10分間室温にて放置乾燥させたのち、100~200 µl のTE Buffer (TE)に再懸濁してください。プラスミドDNA溶液は-20°Cで保存してください。

Maxiprep手順

注釈	PureLink™ HiPure Precipitator Module (Cat.No.K2100-21)を使用することにより、遠心を行わず、10分以内にプラスミドDNAを濃縮することが可能です。
カラムの平衡化	30 mlのEquilibration Buffer (EQ1)をカラムに添加し、HiPure Maxiカラムを平衡化してください。カラム内のバッファーは重力落下により除去してください。
プラスミドの精製	<ol style="list-style-type: none">LB培地で形質転換大腸菌を培養してください。一晚培養した大腸菌をペレット化してください(培養液量は高コピープラスミドで100 ml、低コピープラスミドで250~500 ml)。RNase Aを含む10 mlのResuspension Buffer (R3)をペレットに加え、均一になるまで再懸濁してください。10 mlのLysis Buffer (L7)を加え、5回チューブを転倒することにより穏やかに混合してください。ボルテックスはしないでください。混合物を室温で5分間インキュベートしてください。10 mlのPrecipitation Buffer (N3)を加え、すぐにチューブを転倒することにより混合物が均一になるまで混合してください。ボルテックスはしないでください。15,000 x g以上、室温で10分間遠心を行ってください。上清をピペットで慎重に取り出し、平衡化済カラム上に添加してください。重力落下により溶液を流し、溶出液は除去してください。60 mlのWash Buffer (W8)でカラムを1回洗浄してください。重力落下により、カラム内の溶液を流し、溶出液は除去してください。15 mlのElution Buffer (E4)をカラムに加え、重力落下により精製DNA溶液を溶出チューブに溶出させてください。カラム上に残った溶液を強制的に流さないでください。溶出チューブには、精製DNAが含まれます。10.5 mlのイソプロパノールを溶出チューブに加え、よく混合してください。 注記: PureLink™ HiPure Precipitatorを使用してDNAを沈殿させる場合は、本ステップ後、PureLink™ Precipitatorマニュアルに記載されているプロトコールに従ってください。15,000 x g以上、4°Cで30分間遠心を行い、上清を除去してください。5 mlの70%エタノールを加え、15,000 x g以上、4°Cで5分間遠心を行い、上清を除去してください。ペレットを10分間室温にて放置乾燥させたのち、200~500 µl のTE Buffer (TE)に再懸濁してください。プラスミドDNA溶液は-20°Cで保存してください。



トラブル・シューティング

問題	解決策
細胞デブリのペレットに粘着性があり、チューブ底に付着しない	ライセートの遠心後(ステップ6)チューブを5分間静置し、ペレットと上清を可能な限り分離してください(ペレットが浮かび上がる場合があります)。上清を新しいチューブに慎重に移し、15,000 x g以上、室温で5分間遠心して、細胞デブリを完全に除去してください。
DNA回収率が低い	<p>使用する大腸菌培養液の量を増やしてください。低コピープラスミドの場合は、推奨最大培養液量を守るようにしてください。</p> <p>マニュアルに記載された量のPrecipitation Buffer(N3)を使用してください。エタノール沈殿および洗浄作業中、DNAペレットのロス無くすように慎重に上清を除去してください。減圧にて乾燥を行う場合は、DNAペレットを完全に乾燥させないように注意してください。</p> <p>Lysis Buffer(L7)およびElution Buffer(E4)は室温で保存してください。</p> <p>Precipitation Buffer添加後の遠心の際は、ローターおよび遠心器内が室温であることを確認してください。</p>
プラスミドDNAが分解されている	Lysis Buffer添加後、室温で5分以上保温しないようにしてください。
ゲノムDNAのコンタミネーション	Lysis Buffer添加後の混合は、チューブを静かにチューブを転倒させることにより行ってください。ボルテックスによりゲノムDNAがせん断される可能性があるため、ボルテックスはしないでください。
RNAのコンタミネーション	<p>RNase AがResuspension Buffer(R3)に添加され、RNase Aが入ったバッファーが4°Cで保存されていることを確認してください。使用期限を過ぎたResuspension Bufferは使用しないでください。</p> <p>大腸菌ペレットの再懸濁前に全ての培地を慎重に除去してください。Precipitation Buffer(N3)を過剰添加しないようにしてください。</p> <p>Precipitation Buffer添加後の遠心中は、温度が室温よりも高くないように注意してください。</p> <p>上清をカラムに添加したら、なるべく早く洗浄、溶出を行ってください。</p> <p>カラムの壁面に付いた上清をWash Bufferで洗ってください。</p>
カラムの流速が遅い	遠心後の上清はピペットを使用してカラムに移してください。沈殿物によりカラムが詰まる可能性があるため、上清をチューブから直接カラムに移さないでください。

©2004-2008 Invitrogen Corporation. All rights reserved.

For research use only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Corporate Headquarters
5791 Van Allen Way • Carlsbad • CA 92008
tech_support@invitrogen.com



Contact Information for Other Countries:
See our website: www.invitrogen.com