

Agencourt CosMCPrep

クイックマニュアル



本クイックマニュアルは簡易版です。使用前には、正式なマニュアル(英文)を必ずご一読ください。

Introduction

ベックマン・コールターのスリッド・フェーズ・リバーシブル・イモビライゼーション (SPRI) 磁性ビーズ技術により、高コピー・低コピーを問わず、大腸菌からプラスミドをハイスループット抽出できます。プラスミド抽出だけでなく、フォスミドや BAC ベクターの抽出にも対応します。

適用アプリケーション

サンガーシーケンシング、PCR

保存方法

RE1	4°C 保存
L2	室温保存
N3	室温保存
PUR4	4°C保存*

*使用前に十分に攪拌し、磁性ビーズを完全に再懸濁して下さい。

本マニュアルの対応製品

C42211 CosMCPrep 50 preps

A37064 CosMCPrep 384 preps

A29174 CosMCPrep 4000 preps

Material Supplied by the User

培養プレート

96 ウェル 2.2 mL ディープウェルプレートなど

例: World Wide Medical, 99181000

ガス透過性プレートシール

例: Thermo Fisher Scientific, AB-0718

反応プレート

96 ウェル 1.2 mL ディープウェルプレートなど

例: Thermo Fisher Scientific, AB-1127

磁気プレート

A32782 Agencourt SPRIPlate 96R Ring Super Magnet Plate

保存プレート

96 ウェル 300 μ L 丸底プレートなど

例: Costar, 07-200-105

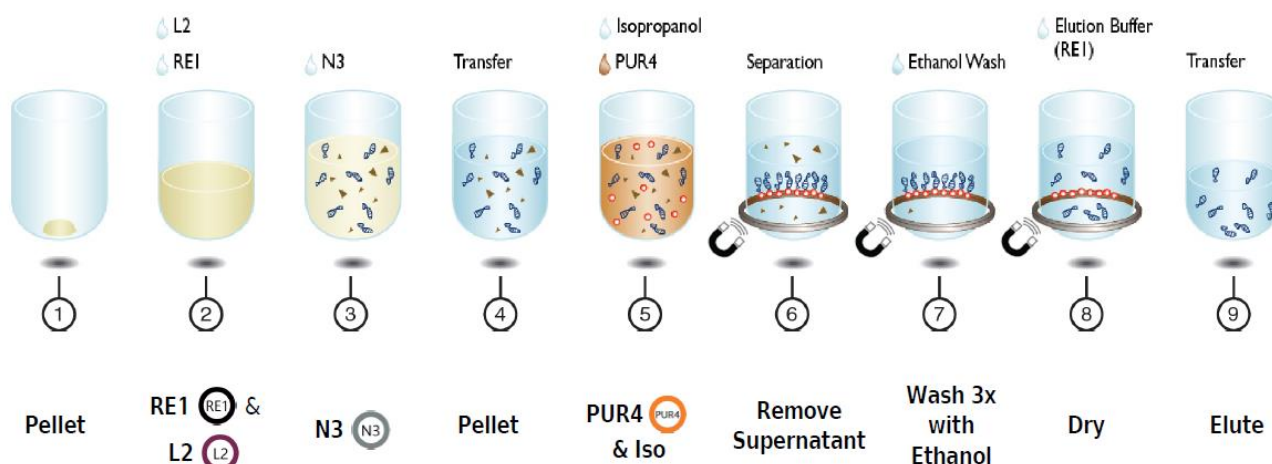
試薬

大腸菌用の培地

100%イソプロパノール

70%エタノール (用時調製)

Quick Reference



1. 培養プレートで大腸菌を培地 1.7 mL で培養し、遠心分離により沈澱として回収。
2. 培養プレートに RE1 100 μ L を加え、菌体を十分に再懸濁した後、L2 100 μ L を添加。穏やかに混合し、5 分間静置。
3. 培養プレートに N3 100 μ L を加え、シェーカーで 10 分間振盪。
4. 培養プレートを 4,700 \times g、20 分間遠心分離し、上清 175 μ L 程度を反応プレートに移す。
5. 反応プレートに PUR4 10 μ L と 100% イソプロパノール所定量 (上清と PUR4 10 μ L の合計液量の 0.66 倍容) を加え、ピペッティング 10 回により懸濁。
6. 反応プレートを磁気プレート上で 8 分間静置し、上清を除去。
7. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで 70%エタノール 200 μ L を加え、室温で 30 秒間静置し、エタノールを除去。この 70%エタノール洗浄を合計 3 回実施。
8. 反応プレートを 37°C で 5 分間乾燥後、RE1 40 μ L を加え 37°C で 5 分間反応。
9. 反応プレートを 30 秒間ボルテックスまたは振盪し、磁性ビーズから DNA を溶出。反応プレートを磁気プレート上で 1~3 分間静置し、上清を保存プレートに移す。

Purification Procedure

1. 2.2 mL ウェルサイズの培養プレートに、1.7 mL の培地と必要な抗生物質を入れます。
2. 培養プレートに、プラスミドを持つ大腸菌のシングルコロニーを植菌します。
3. 培養プレートをガス透過性プレートシールで封をし、37°C、300 rpm で振盪培養します。
オーバーグロースした場合には、十分な DNA 収量が得られない場合があります。
4. 培養終了後、培養プレートを 2,500 ×g で 10 分間遠心分離します。
5. ガス透過性プレートシールを剥がし、培養プレートの培地（上清）をデカンテーションにより除去します。さらに培地を除去するために、培養プレートをペーパータオルの上に伏せて置きます。
以降のステップをすぐに行わない場合、培養プレートを-20°Cまたは-80°Cで保存できます。
6. 培養プレートに RE1 100 μL を加えます。ボルテックス、振盪、またはピペッティングにより菌体を十分に再懸濁します。
ボルテックスの場合は 2~3 分間、振盪の場合は 600~1,200 rpm で 4 分間、ピペッティングの場合は 20 回の再懸濁を目安とします。
7. 培養プレートに L2 100 μL を加えます。穏やかに混合し、5 分間静置します。
振盪の場合は 300~600 rpm で 5 分間、ピペッティングの場合は 2 回の混合を目安とします。
L2 ボトル中に沈殿が見られる場合には、37°Cで温めながらボトルを振り、沈殿を溶かしてから使用してください。
8. 培養プレートに N3 100 μL を加えます。シェーカーで 10 分間振盪し、サンプルを中和します。
N3 の添加により、サンプル中のタンパク質、ゲノム DNA、細胞残渣などが沈殿します。BAC ベクターについては、本ステップの振盪により沈殿からの回収率を上げることができます。

9. 培養プレートを 4,700 ×g で 20 分間遠心分離します。
10. 培養プレートの上清のうち 175 μL を、反応プレートに移します。
 反応プレートに移す上清の液量は、生じた沈殿の量によって変更可能です。最良の結果を得るためには、液面近くからゆっくりとピペット操作を行い、沈澱を乱さない・吸い上げないことが重要です。
11. 反応プレートに PUR4 10 μL と 100%イソプロパノール所定量（反応プレートに移した上清と、加えた PUR4 10 μL の合計液量の 0.66 倍容）を加えます。ピペッティング 10 回により懸濁します。
 イソプロパノールの最終濃度が 40%となるようにします。

移した上清の液量 (μL)	イソプロパノール添加容量 (μL)
100	80
150	106
175	122
200	139
225	155
240	165

12. 反応プレートを磁気プレート上で 8 分間静置し、溶液中のビーズを分離します。溶液が透明になっていることを確認してください。
13. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。このときビーズを吸い取らないように、ビーズのリング状の沈澱の中心部にピペットを差し入れるようにします。
14. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで 70%エタノール 200 μL を加え、室温で 30 秒間静置します。その後、エタノールを除去します。この 70%エタノール洗浄を引き続き 2 回、合計 3 回行います。

15. エタノールを除去した反応プレートを、37°Cで5分間乾燥してください。

BAC ベクターサンプルの場合は、磁性ビーズの過度な乾燥は避けてください。DNA 収量が非常に低くなる場合があります。

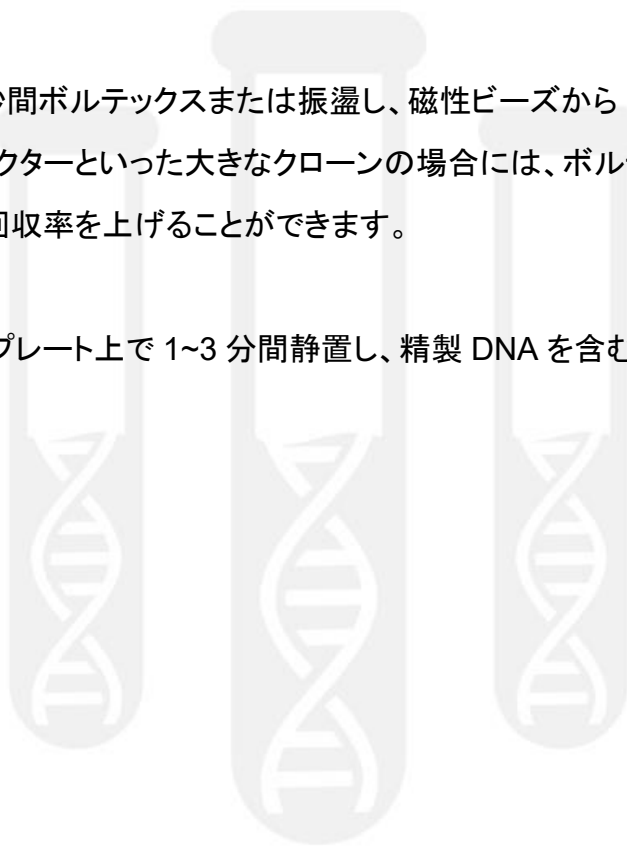
16. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、RE1 40 µL を加え、37°Cで5分間反応します。

RE1 は、RNase I を含むシーケンシング反応に最適化された溶出液です。ヌクレアーゼフリーで塩濃度が低い緩衝液であれば、RE1 に代えて溶出液として使用することができます。

17. 反応プレートを30秒間ボルテックスまたは振盪し、磁性ビーズからDNAを溶出します。

フォスミドやBACベクターといった大きなクローンの場合には、ボルテックス後に5~10分間静置することにより回収率を上げることができます。

18. 反応プレートを磁気プレート上で1~3分間静置し、精製DNAを含む上清を新しい保存プレートに移します。



180805_QMJ_CosMCPrep

ベックマン・コールター株式会社

本社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 ☎ 0120-566-730 ☎ 03-6745-4704 ☎ 03-5530-2460
✉ bckkcas@beckman.com URL <http://www.beckmancoulter.co.jp>

