

# EMnetik Plasmid Purification

## 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・コールター社の EMnetik 24 Microparticle Processor 専用の試薬キットです。新しい SuperSPRI (Solid-Phase Reversible Immobilization) 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 DNA を抽出します。菌体のアルカリ溶解後にプラスミド DNA は磁性ビーズに結合し、夾雑物は簡単な洗浄によって除去されます。磁性ビーズ式の精製は、煩雑な吸引ろ過工程を必要としないメリットがあります。

## 保存方法

RE1	室温保存
L2	室温保存 (沈殿があるときは、37°Cで攪拌し再溶解してください。)
N3	室温保存
PLP	室温保存 (使用前にボルテックスで十分に攪拌し、磁性ビーズを完全に再懸濁して下さい。)
RNase A	常温保存

## 本マニュアルの対応製品

C68445 EMnetik Plasmid Purification 96 preps

## Materials Required but not Supplied

### 反応チューブ・試薬リザーバー

#### シングル PCR チューブ

例: VWR, 20170-012 or 20170-010; Thermo Fisher Scientific, AB0337

#### 8 連 PCR チューブ

例: VWR, 93001-118 or 20170-002; Thermo Fisher Scientific, AB2005

#### 24-well PCR チューブ

例: VWR 89429-038; Simport, T323-24N

#### 試薬リザーバー (マルチチャンネルピペッターを使用する場合)

例: Thermo Fisher Scientific, 14-222-398

培養液 1.5 mL を遠心分離可能なディープウェルプレートまたはマイクロチューブ (菌体のアルカリ溶解および中和工程用)

### 機器

EMnetik 24 Microparticle Processor, C57784

#### 遠心機

例: Beckman Coulter Avanti-J-30I, 363118 with JS-5.9 Rotor, 369331

例: Beckman Coulter Microfuge 16, 392244

#### シェーカー

#### インキュベーター

#### ボルテックスミキサー

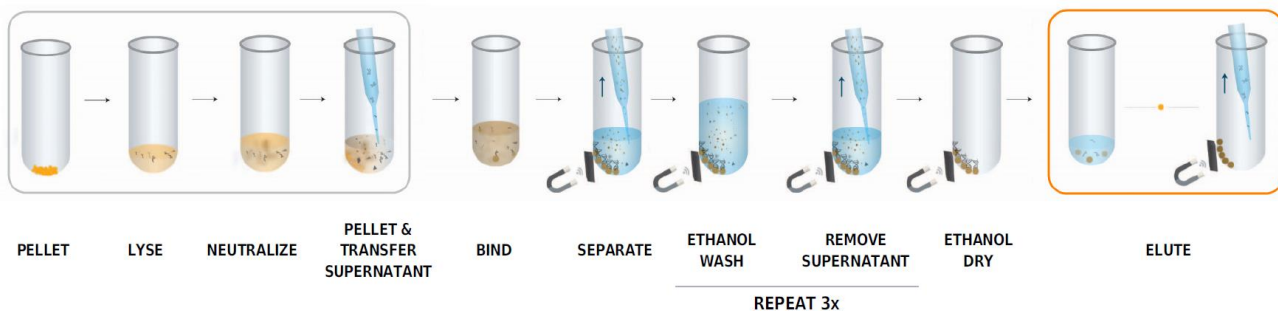
### 試薬

100%エタノール

100%イソプロパノール

ヌクレアーゼフリー水

## Plasmid Purification Protocol Overview



適当なディープウェルプレートまたはマイクロチューブに大腸菌の培養液 1.5 mL を入れ、遠心分離により上清を除去した菌体（沈殿）をスタートサンプルとします。

1. RE1 100  $\mu$ L と RNase A 1  $\mu$ L を加え、ピペッティング 20 回により菌体を十分に再懸濁します。必要があれば、ボルテックス 15 秒間により追加懸濁します。
2. L2 100  $\mu$ L を加え、ピペッティング 3 回により穏やかに混合し、室温で 5 分間静置します。
3. N3 100  $\mu$ L を加え、プレートまたはチューブに封をしてシェーカーで 400 rpm、10 分間振盪します。マイクロチューブを使用する場合は、転倒混和 10 回に代えることも可能です。
4. 4,700  $\times g$  で 20 分間遠心分離し、菌体残渣を沈殿させます。マイクロチューブを使用する場合は、>11,000  $\times g$  で 10 分間遠心分離に代えることも可能です。
5. 70%エタノール (600  $\mu$ L  $\times$  サンプル数 + デッドボリウム) を用事調製します。
6. 上清を新しいディープウェルプレートまたはマイクロチューブに移します。このとき、沈殿を乱さない・吸い上げないようにしてください。  
上清 100  $\mu$ L をステップ 12 の上清として、直接 PCR チューブに加えることも可能です。
7. PLP の試薬ボトルを 30 秒間ボルテックスし、磁性ビーズを完全に再懸濁します。再懸濁後す

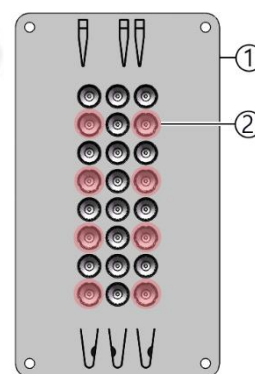
ぐに、1 サンプルあたり 100%イソプロパノール 90  $\mu$ L と PLP 12  $\mu$ L を混合します。

**【重要】** この混合作業は、磁性ビーズをサンプルに入れる 15 分以内に行ってください。混合して時間が経つと、収量にばらつきが出る場合があります。


マルチチャンネルピペッターを使用する場合には、PLP とイソプロパノールの混合物を試薬リザーバーに加えます。磁性ビーズは沈みやすいので、分注直前にピペットで再混合してください。

8. EMnetik 24 の電源を入れ、新しい PCR チューブをチューブホルダーにセットします。

シングル PCR チューブを使用する場合には、右図の赤いポジションにセットしてください (8 本まで同時に処理可能)。



1. Tube Holder  
2. Tube-Restraining Position (8 total)


9. EMnetik 24 のホーム画面から、クリックホイールを回して Plasmid Purification  を選択し、クリックします。

10. Initialize and add reagent  を選択してクリックします。

11. チューブホルダー上の PCR チューブに、PLP とイソプロパノールの混合物 102  $\mu$ L を加えます。

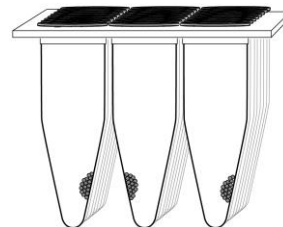
**【重要】** PLP とイソプロパノールの混合 (ステップ 7) 後すぐに使用しない場合は、使用直前に再度ボルテックスしてください。試薬リザーバーに分注した場合には、90  $\mu$ L にセットした 200  $\mu$ L のマルチチャンネルピペッターで 10 回混合してください。磁性ビーズの十分な懸濁は、高収量を得るために重要です。


12. チューブホルダー上の PCR チューブに、ステップ 6 で調製した上清 100  $\mu$ L を加えます。

13. Bind mix & separate  を選択してクリックします。約 3 分間で完了します。

14. プログレスバーに Done と表示されたら、磁性ビーズに触れないように上清を除去します。

**【重要】** 磁性ビーズとは反対側のチューブの壁に、ピペットを差し入れてください。磁性ビーズの位置は、右図に示すとおりです。



15. (オプション) Ethanol wash  をクリックすると、エタノール洗浄の最適な手法を見ることができます。

16. 70%エタノール 200  $\mu$ L を加え、30 秒静置します。

17. 上清を除去します。


18. ステップ 16~17 を繰り返し、合計 3 回の 70%エタノール洗浄を行います。

19. チューブに残ったエタノールを 200  $\mu$ L 以下のピペットチップで除去します。


20. Ethanol dry & add eluent  を選択してクリックし、磁性ビーズを 10 分間 (初期設定) 乾燥させます。

21. プログレスバーに Done と表示されたら、ヌクレアーゼフリー水 20~50  $\mu$ L を加えます。

**【重要】** ヌクレアーゼフリー水は、チューブの底に入れてください。

22. Elution mix & separate  を選択してクリックします。約 1 分間で完了します。

23. プログレスバーに Done と表示されたら、精製プラスミド DNA を含む上清を新しいチューブに移します。

24. Exit  をクリックして、ホーム画面に戻ります。



220125\_QMJ\_EMnetikPlasmidPurification

## 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 🌐 <http://www.beckmancoulter.co.jp>

