

## CosMCPrep 追加プロトコル

### EMnetik RLP 磁性ビーズを用いたプラスミドなどの大量抽出



本追加プロトコルは簡易版です。使用前には、正式な製品マニュアルと Supplemental Protocol (英文) を必ずご一読ください。

大腸菌からのプラスミド、コスミド、BAC 抽出について、Mini, Midi, Maxi, Mega, Giga-Prep スケールまでに対応した追加プロトコルです。CosMCPrep 用の Pur4 磁性ビーズではなく、EMnetik 用の RLP 磁性ビーズを使用します。

## Material Supplied by the User

### 試薬

CosMCPrep (A37064, A29174) に付属の RE1, L2, N3 試薬

EMnetik PLP Bind (磁性ビーズ試薬) (C68447)

RNase A 10 mg/mL (例: ThermoFisher #EN0531)

1M MgCl<sub>2</sub> (例: ThermoFisher #AM9530G)

100%イソプロノール

75%エタノール

溶出液 (RNase フリー水、TE など、RE1 も使用可能)

### プレート

96-well 1.2 mL プレート (例: ThermoFisher #AB1127)

自動化を行う場合: AcroPrep Lysate Clearance Plate 1.9 mL (Cytiva #8275) または 300  $\mu$ L (Cytiva #8040)

### 磁気アクセサリ

96-well 用磁気プレート (例: Alpaqua #A001322)

15 mL チューブ用マグネットスタンド (例: Permagen #MSR6X15)

50 mL チューブ用マグネットスタンド (例: Permagen #MSR6X50)

## 装置

使用するチューブ、プレートおよび指定の遠心力に対応した遠心機

大きなプラスミド、コスミド、BAC を抽出する場合: 37°Cに設定可能なヒートブロック

オプション: SpeedVac などの遠心濃縮装置

## Purification Procedure

細胞を LB 培地などで対数増殖期 (OD 1.6-2.0) まで増殖させます。

LB Culture sizes for different Plasmid preparation amounts

Plasmid Prep Type	Culture Needed	Anticipated Yields
Mini-Prep	1.5-5 ml	<10-40 µg
Midi-Prep	50 ml	<250 µg
Maxi-Prep	150-250 ml	<750 µg
Mega-Prep	500 ml	<2.5 µg
Giga-Prep	1500 ml	<7.5 µg

## Lysis

1. 細胞を遠心機でペレットダウンします。
2. 遠心分離は以下の条件で行ってください。プレートを遠心する場合には、4,750 x g を確保してください。

Centrifugation x g and time for *E. coli* Culture

Tube/plate	x g	Time in minutes
1.7 ml Tube	10,000	5
2 ml Tube	10,000	5
5 ml Tube	4750	10
96-well plate	4750	10
15 ml Conical	4750	15
50 ml Conical	4750	15

3. ペレットをロスしないように、上清である培地を除去します。
4. 下表の通りに、元の培養容量の 1/10 容の RE1 を添加し、再懸濁します。

*E. coli* Resuspension Guidelines

ml of Culture	RE1 in $\mu$ L
1.5 ml	150
2 ml	200
5 ml	500
15 ml	1500
50 ml	5000
150 ml	15000 (in a 50 ml Conical)
500 ml	Split to 4x50 ml conical tubes, use 50 ml Conical for volumes per tube
1500 ml	Split to 12x50 ml conical tubes, use 50 ml Conical for volumes per tube

5. 元の培養容量 1 mL あたり 1  $\mu$ L の RNase A と、この酵素の活性を高めるために 1M MgCl<sub>2</sub> を最終濃度 7.5mM となるように加え、ピペティングで懸濁します。
6. 転倒混和を 6 回行います。
7. RE1 と等量の L2 を添加し、ピペティングで 2 回混合し、転倒混和を 6 回行います。
8. 室温で 10 分間静置します。
9. RE1 と等量の N3 を添加し、転倒混和を 6 回行います。
10. 室温で 15 分間静置します。
11. 下表の通りに遠心分離を行い、細胞片を除去します。

Tube or plate	x g	Time
1.5 ml	12,000	10
2 ml	12,000	10
5 ml	4750	15
96-Well Plate	4750	15
15 ml	4750	15
50 ml	4750	15
150 ml	4750	15
500 ml	4750	15
1500 ml	4750	15

**Biomek i-Series で自動化を行う場合:** Amplius PPA (2,800 mb) と AcroPrep 96 well Lysate Clearance Plate を使用して細胞片を除去します。Maxi, Mega, Giga-prep の場合は、1 ウェルあたり 2 mL を上限として複数ウェルで処理します。

12. 上清を新しいチューブ/プレートに移します。

**注意:** 50 mL チューブを使用する場合、チューブの上部に凝集物の層ができる場合があります。1ml のピペットを使用して、この層をチューブの端に寄せて新しいチューブに持ち込まないようにしてください。持ち込んでしまった場合は、再度遠心分離し凝集物を取り除いてください。

## Bind

13. 下表の通り、EMnetik RLP Bind (磁性ビーズ) と 100%イソプロパノールを混合します。

Tube, Plate or 50ml conicals Starting Culture Amount	EMnetik PLP Bind (μL)	Isopropanol (μL)
1.5 ml	68	506
2 ml	90	675
5 ml	180	1,350
15 ml	540	4,050
50 ml	1800	13,500
150 ml	5400	40,500*
500 ml	10800	135,000*
1500 ml	32400	405,000*

14. **注意:** 上表アスタリスクの条件では、複数の 50 mL チューブに分けて調製してください。

15. EMnetik RLP Bind/イソプロパノール混合液を 5 分以内にサンプルに添加してください。

16. 転倒混和を 6 回行い、穏やかに 3 分間混合してください。

17. マグネットで磁性ビーズを集めます (15-30 秒程度)。

18. 磁性ビーズをロスしないように、上清を除去します。

## Wash

19. マグネットからプレート/チューブを下ろし除去した上清と等量の 75%エタノールを加え、マグネットに戻し室温で 30 秒間静置し、上清を除去します。

20. この 75%エタノール洗浄を合計 3 回行います。

21. マグネット上で磁性ビーズを風乾させ、エタノールを除去します。

## Elute

22. 元の培養容量の 1/100 から 1/1000 容の溶出液を加え、5 分間静置します。収量を上げるために、2 回目の溶出を行うことも可能です。

23. 大きなプラスミド、コスミド、BAC を溶出する場合には、5 分間の静置を 37°Cで行います。

24. マグネットで磁性ビーズを集め (一瞬で磁性ビーズは集まります)、精製プラスミドを含む上清

を回収します。

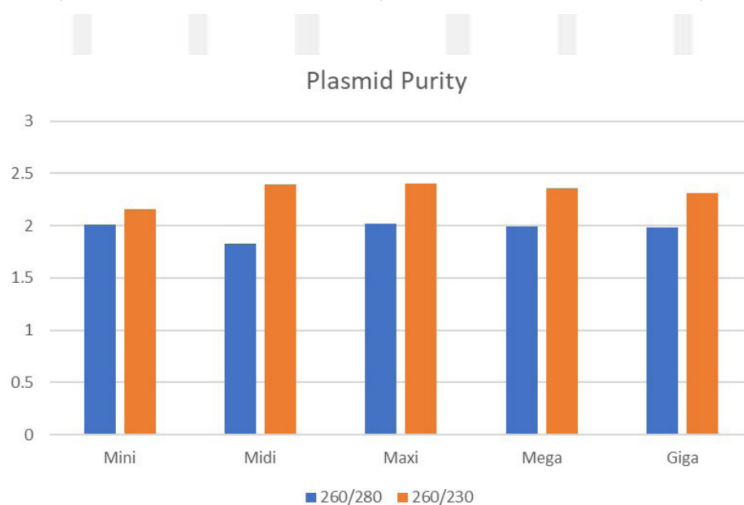
25. オプション: 260/280 値が 2 を超える場合には、SpeedVac などの遠心濃縮装置で残留するエタノールを除去することもできます。

## Example Data

収量はプラスミドの種類によって異なります。本例では、高コピープラスミドである pUC19 を使用しています。

Typical Yields for each prep type and indicated minimal yields

Plasmid Prep Type	Culture Needed	Anticipated Yields	Range of Typical Yields
Mini-Prep	1.5/5 ml	<10-40 µg	15.8 µg average for 1.5 ml/ 79 µg average for 5 ml
Midi-Prep	50 ml	<250 µg	420-837 µg, average 590 µg
Maxi-Prep	150-250 ml	<750 µg	1.64 mg average
Mega-Prep	500 ml	<2.5 mg	3.2 mg average
Giga-Prep	1500 ml	<7.5 mg	9.7 mg



231128\_SP-JP\_CosMCPrep\_LargePrep

## 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>