

CosMCPrep 追加プロトコル

マイクロチューブを用いた少数サンプルのプラスミド抽出



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。

10 サンプル以下のロースルーフト処理や、プレート遠心機が利用できない場合に適した、マイクロチューブを用いた追加プロトコルです。

Material Supplied by the User

1.5 mL マイクロチューブ

A29182 Agencourt SPRIstand 6 Position Tube Magnet

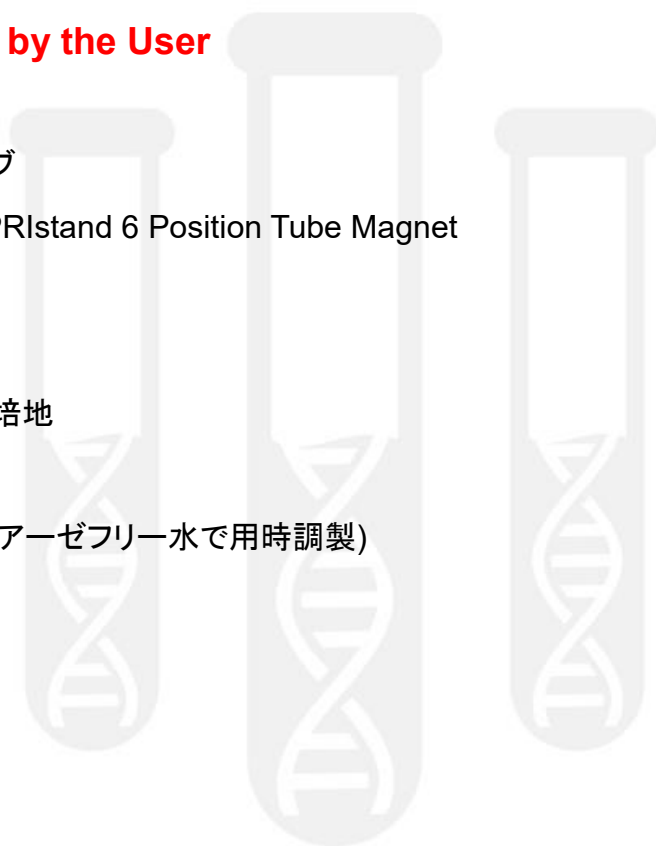
試薬

2×YT などの大腸菌用培地

100%イソプロパノール

70%エタノール (ヌクレアーゼフリー水で用時調製)

TE (pH 8.0)



Purification Procedure

1. 細胞を 2×YT などのリッチな培地で、17~22 時間培養します。
2. 細胞溶解
 - a. 培養液をボルテックスで軽く混合します。
 - b. 培養液 800 μ L を反応チューブに加えます。
 - c. 反応チューブを 10,000 $\times g$ 2 分間で遠心分離します。
 - d. 上清を除去します。
 - e. RE1 100 μ L を加えます。
 - f. ピペティング 10 回により混合します。
 - g. L2 100 μ L を加えます。
 - h. 優しいピペティング 10 回により混合します。
 - i. 室温で 5 分間静置します。
 - j. N3 100 μ L を加えます。
 - k. 4~6 回、転倒混和します。
 - l. 反応チューブを最高速 (~16,000 $\times g$) 5 分間で遠心分離します。
 - m. 上清 110 μ L を、新しい反応チューブに移します。
3. 結合
 - a. Pur4 10 μ L と 100%イソプロパノール 80 μ L を加えます。

上清を 110 μ L 以上移した場合には、イソプロパノールの最終濃度が 40%となるように添加量を調整します。
 - b. ピペティング 10 回により混合します。
 - c. 反応チューブを磁気スタンド上で 5 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
 - d. 反応チューブを磁気スタンド上に置いたままで、上清を除去します。
4. 70%エタノール洗淨
 - a. 反応チューブを磁気スタンド上に置いたままで、70%エタノール 200 μ L を加えます。
 - b. 反応チューブを磁気スタンド上で、室温で 30 秒間静置します。
 - c. 反応チューブを磁気スタンド上に置いたままで、上清を除去します。
 - d. 4.a~4.c のステップを2回繰り返し行い、合計 3 回の 70%エタノール洗淨を行います。
5. 溶出

- a. RE1 または TE (pH 8.0) 40 μ L を加えます。
- b. 37°C で 5 分間反応します。
- c. 反応チューブを磁気スタンド上で 3 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- d. 溶出プラスミド DNA を含む上清を、新しい保存用チューブに移します

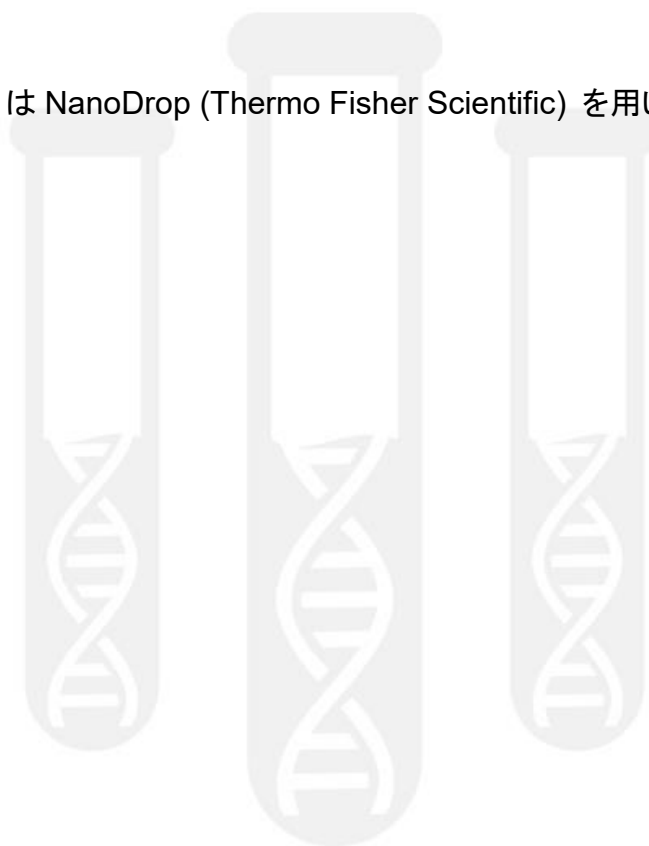


Example Data

本追加プロトコルを用いて、プラスミド DNA (大腸菌由来 2 種類、緑膿菌由来 1 種類) の抽出を行いました。DNA は NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量しました。

Plasmid Type	Concentration (ng/ul)	Yield (μg)
High copy number small (<10kb) plasmid	359.2	14.4
High copy number small (<10kb) plasmid isolated from Pseudomonas	120.0	4.8
Naturally occurring large (>100kb) plasmid	90.3	3.6

Table. プラスミド DNA は NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量。n=3



210217_SP-JP_CosMCPrep_MicroTube

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>