

PureYield™ Plasmid Midiprep System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A2490, A2492, A2495, A2496

Quick
PROTOCOL

本プロトコルにおけるすべての操作は、室温（22～25℃）で行ってください。

キット以外に準備するもの

- ・ イソプロパノール
- ・ 95%エタノール
- ・ 卓上遠心機（50mL チューブ対応のアングルローター）
- ・ 50mL スクリューキャップチューブ（例：Corning 製や Falcon™ 製）
- ・ 高速遠心機（15,000 × g で遠心可能なもの）
- ・ バキュームポンプ（吸引圧力：約 650mm Hg（25.6 inches Hg）のもの）
- ・ バキュームマニホールド（例：Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold [Cat.# A7231]）
- ・ Eluator™ Vacuum Elution Device [Cat.# A1071]（※吸引法で実施する場合）

試薬の準備

下表に従い、以下の試薬を準備する。

- ・ Endotoxin Removal Wash : Endotoxin Removal Wash のボトルにイソプロパノールを加える。
 - ・ Column Wash : Column Wash のボトルに 95%エタノールを加える。
- ※添加後はアルコール成分が揮発しないように、しっかりとボトルの蓋を閉めてください。

表 1. 各キットにおけるイソプロパノールおよび 95%エタノールの添加量

Endotoxin Removal Wash	イソプロパノール/ボトル	Column Wash	95%エタノール/ボトル
4 preps system (A2490)	10mL	4 preps system (A2490)	55mL
25 preps system (A2492)	57mL	25 preps system (A2492)	350mL
100 preps system (A2495)	210mL	100 preps system (A2495)	635mL
300 preps system (A2496)	210mL	300 preps system (A2496)	635mL

大腸菌クリアライセートの調製(吸引法、遠心法 共通)

1. 組み換え大腸菌を 50～100mL の LB 培地で一晚（16～21 時間）培養する。
※100mL より多い LB 培地の用いる場合は、試薬の使用量が異なりますので、ご注意ください（表 2）。
2. 培養液を 50mL チューブへ分注し、遠心（5,000×g、室温、10 分）して大腸菌をペレット化する。
3. 遠心後の培地上清を除去する。
※大部分はデカントで除去し、残った少量の培地はピペットなどで可能な限り取り除いてください。
4. ステップ 3 のチューブに Cell Resuspension Solution を 3mL 加え、ボルテックスで 20 秒程度激しく攪拌し、大腸菌ペレットをしっかりとほぐす。
5. ステップ 4 のチューブに Cell Lysis Solution を 3mL 添加する。チューブを回転させながら 10～20 回程度しっかりと転倒混和する（図 1）。その後、室温で 3 分間インキュベーションする。
6. ステップ 5 のチューブに Neutralization Solution を 5mL 添加する。チューブを回転させながら 10～20 回程度しっかりと転倒混和する。その後、室温で 3 分間インキュベーションする。
※ステップ 5 および 6 での混和が不十分の場合、ステップ 7 でデブリがペレット化されません。
※Cell Lysis solution と Neutralization solution の混和の際にボルテックスは使用しないでください。
7. ステップ 6 のチューブを遠心（15,000×g、室温、15 分）する。デブリをペレット化し、クリアライセートが得られたことを確認する
※機器の仕様上、15,000×g に満たない場合、最高速で遠心してください（例：12,000×g、室温、20 分）

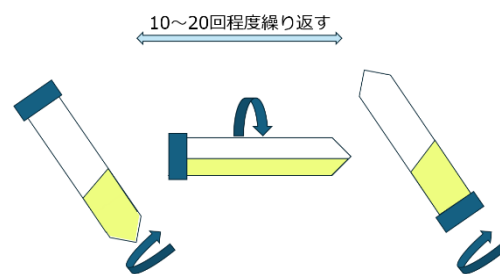
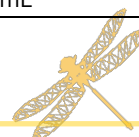


図 1. 転倒混和のイメージ

表 2. 各試薬の使用量

試薬名	大腸菌培養液量	
	50～100mL	101～250mL
Cell Resuspension Solution	3mL	6mL
Cell Lysis Solution	3mL	6mL
Neutralization Solution	5mL	10mL



吸引法プロトコール

<カラムへの吸着>

1. PureYield™ Binding Column(白色; 以下 Binding Column)の上に PureYield™ Clearing Column (青色; 以下 Clearing Column) を取り付け、マニホールドにセットする (図 2)。
2. 前工程のステップ 7 で得られた大腸菌クリアイセートを Clearing Column に注ぐ。
※可能な限りデブリが混入しないように注意してください。
3. 吸引ポンプのスイッチを入れる。吸引圧を上げ、マニホールド側のコックを開けて吸引を開始する。すべての溶液が、Clearing Column および Binding Column を完全に通過するまで吸引する。
4. マニホールド側のコックを閉め、ゆっくりと吸引圧を解除し、ポンプのスイッチを切る。
5. 青色の Clearing Column のみを取り外す (Binding Column はマニホールドに残す)。
※吸引を急に解除すると、カラムのメンブレンが外れることがあります。カラムの底から外れた場合は、滅菌チップなどを用いて元の位置に押し込んでください。



図 2.カラムの接続

<洗浄>

6. 5 mL の Endotoxin Removal Wash を Binding Column に加える。溶液が Binding Column を完全に通過するまで吸引する。
7. 20mL の Column Wash Solution を Binding Column に加え、溶液が Binding Column を完全に通過するまで吸引する。
8. すべての溶液がメンブレンを通過した後、メンブレンを乾燥させるため 30～60 秒間吸引する。メンブレンの上部が濡れている場合やエタノール臭がする場合は、再度 30～60 秒間吸引する。
9. マニホールド側のコックを閉め、ゆっくりと吸引圧を解除し、吸引を停止する。Binding Column をマニホールドから取り外す。

<Eluator™を用いた溶出>

10. Eluator™ Vacuum Elution Device に、滅菌した 1.5mL チューブをセットしチューブキャップを取り付ける (図 3A)。
11. Vac-Man® Manifold から取り外した Binding Column を、ステップ 10 で組み立てた Eluator™ Vacuum Elution Device 上にセットして、マニホールドに設置する (図 3B)。この時、Binding Column が Eluator™ Vacuum Elution Device にしっかりとまっていることを確認する。
12. 400～600μL の Nuclease-Free Water を Binding Column 内のメンブレン全体が浸るように加え、1 分間静置する。その後 1 分間 (もしくはすべての液体がカラムを通過するまで) 吸引し、DNA 溶液を溶出する。
※長鎖 (10kb 以上) のプラスミドを溶出させる場合、あらかじめ 65℃に加温した Nuclease-Free Water を用いることでメンブレンから溶出促進することができます。
13. マニホールド側のコックを閉め、ゆっくりと吸引圧を解除し、吸引を停止する。溶出したプラスミド DNA を含む 1.5mL チューブを回収する。

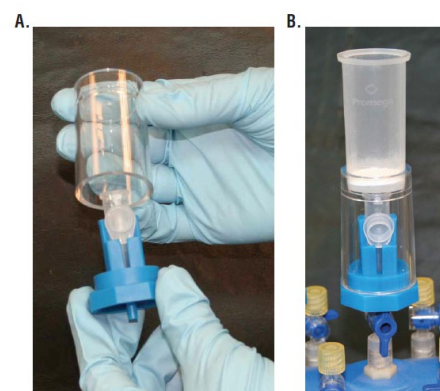
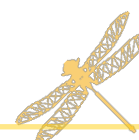


図 3.Eluator™ Vacuum Elution Device のセッティング



遠心法プロトコール

遠心による精製を行う際は、スイングローターを使用してください。

アングルローターを使用すると溶液がカラム内に残る原因となるため、使用しないでください。

<カラムへの吸着>

- 50mL チューブに PureYield™ Clearing Column (青色; 以下 Clearing Column) をセットする。
※細胞残渣が少ない場合は、インキュベートせずにすぐにステップ 2 に進むことができます。
- 遠心 (1,500×g、5 分間、室温) する。大腸菌クリアー液が Clearing Column 上に残っている場合は再度遠心を繰り返す。
- 新しい 50mL チューブに PureYield™ Binding Column (白色; 以下 Binding Column) を挿入する。
ステップ 2 で得た大腸菌ライセートを Binding Column へ注ぎ、遠心 (1,500×g、3 分間、室温) する。

洗浄

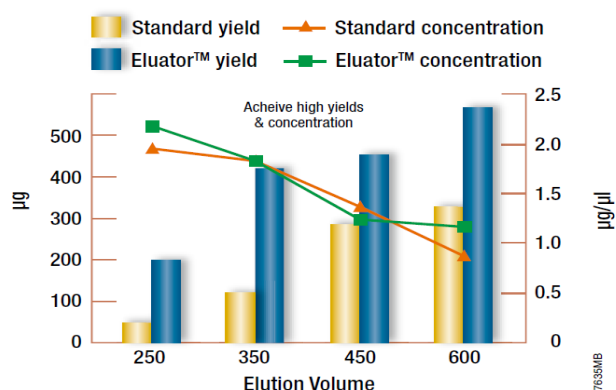
- Binding Column に 5 mL の Endotoxin Removal Wash を加え、遠心 (1,500×g、3 分間、室温) する。チューブから Binding Column を取り外し、溶液を捨てたのち、再度 Binding Column をセットする。
- Binding Column に 20mL の Column Wash Solution を加え、遠心 (1,500×g、3 分間、室温) する。チューブから Binding Column をはずし、溶液を捨てたのち、再度 Binding Column をセットする。
- 遠心 (1,500×g、10 分間、室温) し、メンブレン上に残っている Column Wash Solution を完全に取り除く。

溶出

- ステップ 6 のチューブから Binding Column を取り外し、新しい 50mL チューブにセットする。
- 600μL の Nuclease Free Water を Binding Column 内のメンブレン全体が浸るように加え、1 分間静置する。
※長鎖 (10kb 以上) のプラスミドを溶出させる場合、あらかじめ 65℃ に加温した Nuclease-Free Water を用いることでメンブレンから溶出を促進することができます。
- 遠心 (1,500×g、5 分間、室温) し、プラスミド DNA 溶液を溶出する (溶出液量: 約 400μL)。

<参考>

Eluator™ を使用することで、カラムに残る溶出液量 (デッドボリューム) が少なくなります。そのため、遠心を用いる標準法に比べて、効率よく高い収量と濃度を得ることができます。



標準法と Eluator™ を用いた吸引法との収量および濃度の比較
PureYield™ Midiprep を用いて一昼夜菌体培養液 (ハイコピープラスミド) 50mL からプラスミドを精製した際の収量比較。標準法は遠心による溶出を行った。Eluator™ Vacuum Elution Device を用いれば、1.5mL チューブに直接溶出が可能です。

図 4. 吸引法と遠心法の比較

