

## DF-15

# 大腸菌からのプラスミドDNA分離

### 【プロトコル

形質転換大腸菌を 1.5 ml マイクロチューブに収集し、ペレット化する

→ RDP 混液(RDP + EDP-01)\*1:100 μl

ボルテックス(ペレット再懸濁後菌塊が見えてはいけない) 軽くスピンダウン

**→** ADP : 100 µl

チューブ転倒混和 5 回で、ゆっくりと混ぜる(激しく振らないでください)\*2 軽くスピンダウン

※ この段階でサンプルを5分以上放置しないでください

**→** NDP : 140 µl

チューブ転倒混和5回で、ゆっくりと混ぜる(激しく振らないでください)\*2



18,000×g(14,100 rpm)、10 分、室温 (この段階で 320 川 の LDP\*<sup>3</sup> を新しい 1.5 ml マイクロチューブに分注)

上清(約330 µl)を、LDPの入ったその1.5 ml マイクロチューブに移す

LDP の入ったその 1.5 ml マイ

ボルテックス:30 秒 (最大回転数) 軽くスピンダウン

ライセート完成

QuickGene のカートリッジへ全量添加

1

使用装置の分離プロトコル参照 QuickGene-Mini480\*4



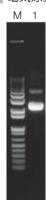
プラスミド DNA 回収 (回収液量:50 µl)

- \*1 分離を始める前に、EDP-01の全量を PDP ボトルに添加し、よく 混ぜてください。PDP 混液を貯蔵する場合は、冷蔵(2~8℃)保存し、6ヶ月以内に使用すること を推奨します。
- \*2 ADP または NDP 添加後直ぐに チューブを 5 回転倒混和で混ぜて ください。 激しい混合はゲノム DNA の多く の共精製を起こします。混合が ゆっくりすぎると液体の不十分な 混合が起こり、ブラスミド DNA の収量低下を生じます。
- \*3 使用前に 44 ml の >99% エタ ノールをボトルに添加し、ボトル の穏やかな転倒混和でよく混ぜて ください。

\*4 本事例は旧機種で取得したデータ も含まれます。 その他QuickGeneシリーズでもこ のプロトコルをご参考頂けます。

#### 結果

#### 電気泳動図



1: QuickGene

M:マーカー

(1 Kb Plus DNA Ladder : Invitrogen)

#### ■ プラスミド DNA の収量

キット	収量
QuickGene	21.4 µg

#### ■ タンパク質の混入: A260/280

キット	A260/280
QuickGene	1.99

#### ■ カオトロピック塩の混入: A260/230

キット	A260/230
QuickGene	2.49

#### その他

#### • PCR

GAPDH をターゲットに使用し、QuickGene システムで分離した 5 ng のテンプレートに対して PCR を行った。



1 : QuickGene

2:ネガティブコントロール

3:ポジティブコントロール

M: マーカー (100 bp DNA Ladder: Invitrogen)

5 ng のテンプレートから PCR 増幅が可能である。

#### • Not I and Xho I での制限酵素切断

QuickGene システムを用いて形質転換大腸菌から分離したプラスミド DNA に対して制限酵素処理を行った。 制限エンドヌクレアーゼ( $Not~\mathrm{I}$  および  $Xho~\mathrm{I}$  のそれぞれに  $0.5~\mathrm{\mu l}$ )を  $10~\mathrm{\mu l}$  の反応溶液( $1~\mathrm{\mu l}$  の分離プラスミドを含む)に添 加し、37°Cで2時間インキュベートした。



1 : QuickGene (Not I + Xho I)

2: None

 $\mathbf{M}: \mathbf{\neg} - \mathbf{b} - \text{ (1 Kb Plus DNA Ladder: Invitrogen)}$ 

これらの結果から、制限酵素処理が行えることがわかる。

## ■共通プロトコルサンプル

フォスミド