

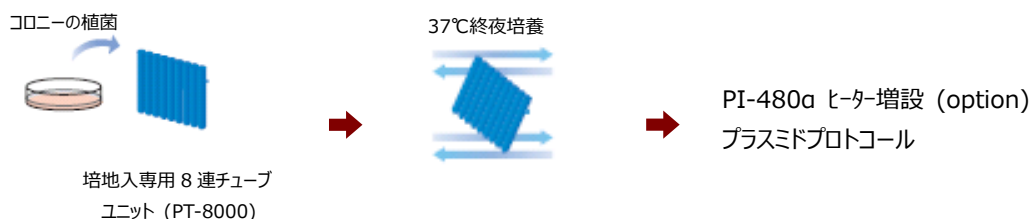
PI-480a プラスミドプロトコール

大腸菌からのプラスミド分離精製

- automated isolation from *E.coli* overnight culture-



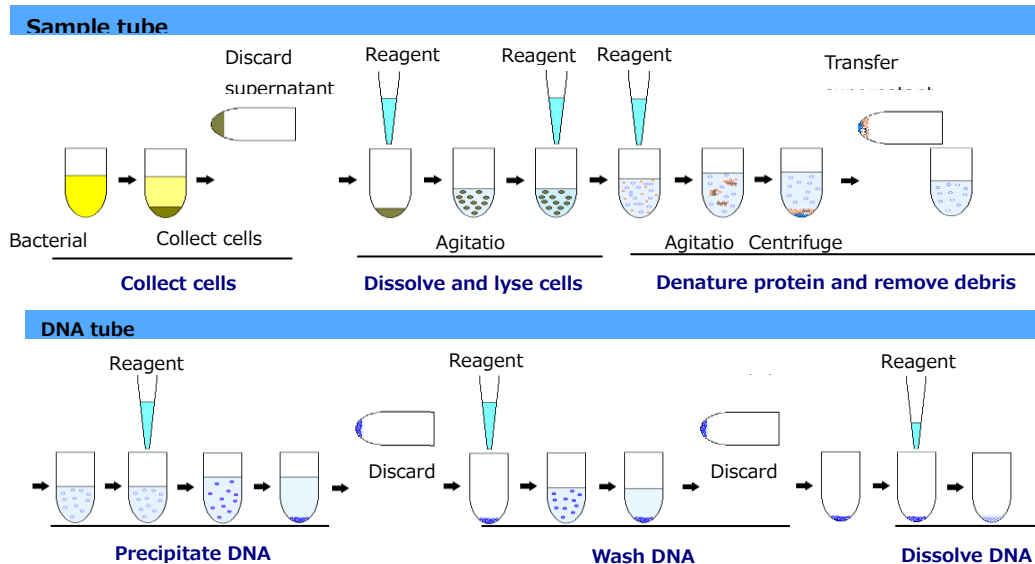
クラボウ PI-480aでは一度に 48 サンプルの DNA の分離精製が可能です。本データでは、プラスミドプロトコールを用いて、大腸菌からのプラスミド分離精製例を示します。ヒーターユニットを増設することで、DNA 乾燥工程を短縮化することが可能です。



実 験

サンプル	大腸菌 <i>E.coli</i> JM109/pUC18
サンプル量	2xYT 培地:1.5 ml 又は 2.0 ml
分離装置	PI-480a ヒーター増設モデル(オプション) プラスミドプロトコール
試薬キットと 消耗品	PR-200 サンプルチューブユニット, 回収用チューブユニット :PT-8000;
精製原理	大腸菌の懸濁: アルカリ法 精製: フェノール/クロロホルム含有試薬による蛋白変性 DNA 回収: アルコールによる沈澱
精製工程	前処理: クラボウ製 8 連チューブユニット (KURABO, PT-8000)に抗生物質入り培地を添加、 植菌後、37℃にて終夜培養 PI-480a (オプション;ヒーター)による分離精製: Step1. 集菌 Step2. 懸濁と溶菌 Step3. 蛋白変性と不純物の除去 Step4. DNA 沈澱 Step5. DNA 洗浄 Step6. 乾燥 Step7. DNA 溶解試薬(KURABO, PR-6025)による DNA の溶解(溶解液量 100 µl)

プラスミドプロトコールのワークフロー



分離時間 48 サンプル: 2.8 hr
48 サンプル: 2.1 hr (オプションヒーター搭載時)

分析方法

収量 と 純度 分光光度計により各々の DNA 溶液の 260 nm の吸光度を測定。

計算 DNA 収量は下記の方法にて算出した:
 $A_{260} \times 50 \times \text{希釈率} \times \text{最終溶解量}$.
DNA 純度は A_{260}/A_{280} の値より確認。

電気泳動 それぞれ DNA 溶液 5 μl を 0.7% agarose gel にて電気泳動を行った。

制限酵素による切断 大腸菌より分離精製した pUC18 DNA 300 ng を Lac Z 領域を切断する制限酵素 3units で、最適温度で 1 hour 反応を行った。
制限酵素: *EcoRI* , *BamHI* , *KpnI* , *ScaI* , *HincII* and *SmaI*

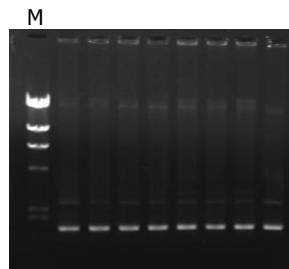
塩基配列分析 鋳型: pUC 18 DNA 200 ng
プライマー: 10 pmol T7 primer
解析装置: ABI 3130xl (life technologies™)
反応キット: ABI PRISM BigDye® Terminator Ver.3.1 Cycle Sequence Kit

結果

収量 と 純度

収量 (μg)	純度(A260/A280)
約 8 (核酸量として)	1.7~1.9

電気泳動

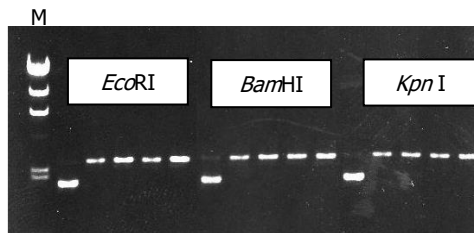


大腸菌 *E.coli* JM109 から分離精製された
pUC18 DNA 5 μl of 100 μl

M: λHind III size maker

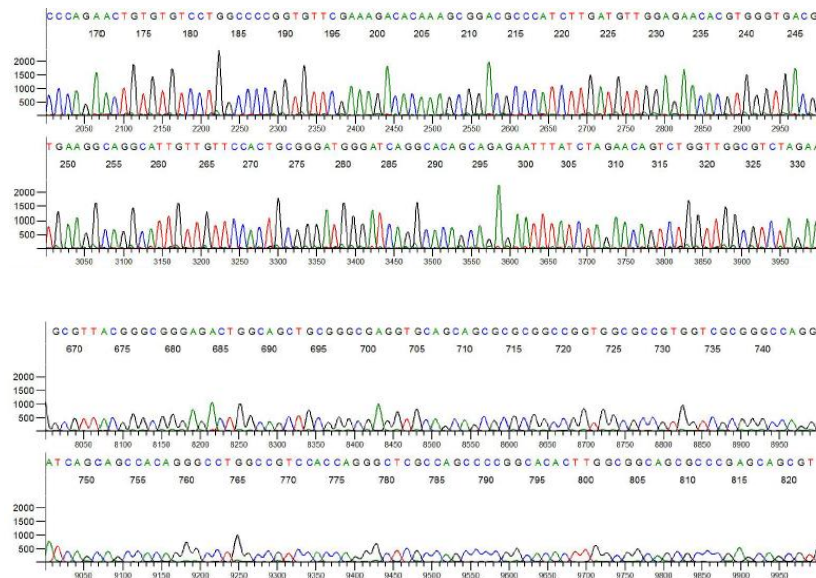
制限酵素処理

pUC18 DNA 制限酵素切断結果.



M: λHindIII size maker

塩基配列結果



分離精製されたプラスミドは概ね 750 base 程度まで塩基配列分析が可能です。

製品情報

分離装置 PI-480a
 プラスミドプロトコール
 オプション: ヒーター

試薬キット プラスミド 試薬キット PR-200 (for 950 preps)

試薬名称	試薬番号 (Code)	入数
懸濁試薬	1 (PR-1050)	1
溶菌試薬	2 (PR-2050)	1
中和除タンパク試薬	3 (PR-3140)	1
沈澱試薬	4 (PR-4050)	2
洗浄試薬	5 (PR-5050)	5
溶解試薬	6 (PR-6025)	1

専用チューブユニット サンプルチューブユニット: PT-8000 (8-hole, blue, 64 個)

本資料に記載されている商品名は、各社の商標または登録商標です。

倉敷紡績株式会社

〒572-0823

大阪府寝屋川市下木田町 14-30

クラボウ先進技術センター

電話: 072-820-3079

Fax: 072-820-3095