

プラスミドキット
QuickGene-AutoS Plasmid Kit
(AS-PL)

Ver.1.1

Contents

1. はじめに	4
2. キット内容物と保存条件	4
2 - 1. キット内容物	4
2 - 2. 保存条件	4
2 - 3. 試薬ストリップの内容物.....	5
3. キット以外にご準備いただくもの.....	5
4. 取扱上の安全注意事項	6
5. 使用上の注意事項	7
6. 品質管理	8
7. 製品説明	8
8. プロトコール	9
8 - 1. 試薬の準備.....	9
8 - 2. ライセート作製プロトコール.....	10
8 - 3. 試薬ストリップの準備.....	11
8 - 4. QG-Auto12S/24S 分離操作.....	12
9. トラブルシューティング.....	13
10. オーダーリング・インフォメーション	15

ご注意

本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。
診断および臨床用試薬として使用しないでください。

1. はじめに

本キットは、QuickGene-Auto12S(以下 QG-Auto12S)、あるいは QuickGene-Auto24S(以下 QG-Auto24S)の抽出工程で使用する試薬を処理サンプル個別に封入した試薬キットです。

本キットの特徴は以下のとおりです。

- 本キットと QG-Auto12S、あるいは QG-Auto24S をご使用いただくことにより、簡単に組み換え大腸菌からプラスミド DNA を抽出することができます。
- 抽出時間は以下のとおりです。
 - QG-Auto12S:約 20 分 *12 サンプル同時に抽出操作を行うことができます。
 - QG-Auto24S:約 20 分 *24 サンプル同時に抽出操作を行うことができます。
- タンパク質やカオトロピック塩を含まない、高純度のプラスミド DNA が得られます。得られた高品質のゲノム DNA は PCR、制限酵素処理などのアプリケーションに適しています。

2. キット内容物と保存条件

2 - 1. キット内容物

以下の内容物が入っていますので確認してください。

キットには 48 処理分のゲノム DNA 抽出試薬と消耗品が含まれています。

<input type="checkbox"/>	RNase EDP	300 μ l
<input type="checkbox"/>	Resuspension Buffer RDP	10 ml
<input type="checkbox"/>	Alkaline Solution ADP	10 ml
<input type="checkbox"/>	Neutralization Buffer NDP	15 ml
<input type="checkbox"/>	Lysis Buffer LDP	10 ml
<input type="checkbox"/>	試薬ストリップ	48 個
<input type="checkbox"/>	1 ml Long Tips	48 個
<input type="checkbox"/>	Waste Tubes	48 個

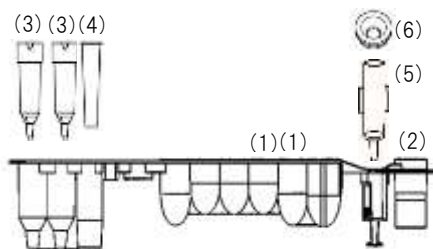
2 - 2. 保存条件

指定の温度(15°C~28°C)で保存してください。有効期限は外箱に表示しています。より安定に保つため EDP は開梱後、冷蔵(2~8°C)で保存することをお勧めします。

2 - 3. 試薬ストリップの内容物

試薬ストリップ 1 本あたり、以下の内容物が入っています。

<input type="checkbox"/>	Wash Buffer	WDP	750 μ l	x 2 箇所	下図(1)
<input type="checkbox"/>	Elution Buffer	CDP	250 μ l		下図(2)
<input type="checkbox"/>	Short Tip		2 個		下図(3)
<input type="checkbox"/>	Tip pack		1 個		下図(4)
<input type="checkbox"/>	Cartridge		1 個		下図(5)
<input type="checkbox"/>	Pressure Adapter		1 個		下図(6)



3. キット以外にご準備いただくもの

①試薬

- 特級エタノール(>99%)
LDP の調整に使用

②器具・機材

- QuickGene-Auto12S/QuickGene-Auto24S
- マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ
- 2 ml マイクロチューブ(サンプル用)
推奨品: BM 機器 Cat. 4020、SARSTEDT Cat.72.695.700、Cat.72.695.500S
推奨品以外のチューブを使用する場合は、事前にストリップ及び装置ヒーター部分との適合性を確認してください。
- 1.5 ml or 2 ml マイクロチューブ(DNA 回収用に使用)
推奨品: BM 機器 Cat.BM4015、Cat.BM4020、SARSTEDT Cat.72.706.700
推奨品以外のチューブを使用する場合は、事前にコレクションホルダーとの適合性を確認してください。
- チューブスタンド

-
- マイクロ遠心機(8,000×g(10,000rpm)程度の遠心が可能なもの)
 -

4. 取扱上の安全注意事項

◆ EDP (RNase)

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

- 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ RDP (Resuspension Buffer)

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

- 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ ADP (Alkaline Buffer)

薬品の特性：● 触れると皮膚、目を刺激します。

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

- 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。
- この薬品を扱う場合は適切な保護手袋および保護めがねを着用してください。
- ADPはpHが高いため、未使用のまま廃棄する場合は、中和を行うなど適切な処理を行ってください。

◆ NDP (Neutralization Buffer)

薬品の特性：● 触れると皮膚、目を刺激します。

- 吸入すると有害の可能性があります。

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

- 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。
- 通気性のよい場所で取り扱ってください。
- 容器を完全密閉して保管してください。

◆ LDP (Lysis Buffer)

薬品の特性：● 飲むと有害の可能性があります。

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

- 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。
- この薬品を扱う場合は適切な保護手袋および保護めがねを着用してください。

◆ WDP (Wash Buffer)

薬品の特性：● 引火性の液体を含むので、火気に十分注意してください。

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

- 火気に注意するとともに、吸入、皮膚への接触に十分注意してください。
- 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ CDP (Elution Buffer)

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

- 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ 試薬ストリップは、指定の温度(15℃～28℃)以外での使用、保存は避けてください。

◆ 感染性のおそれのあるサンプルを使用する場合

感染性のおそれのあるサンプルを扱う場合は、適切な保護具を着用してください。

◆ 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、廃棄する場合

感染性産業廃棄物に該当しますので、関連する法に従い、焼却、溶解、滅菌、消毒などの処理をしてください。なお、処分業者に委託する場合は、特別管理産業廃棄処分業の許可を受けた業者へ、特別管理産業廃棄物管理票(マニフェスト)を添えて処理を委託してください。

◆ 参考情報

各試薬の性状および取り扱いに関する詳細情報は、SDS(安全データシート)をお読みください。SDSは弊社ホームページ(<https://www.kurabo.co.jp/bio/>)からダウンロードできます。

5. 使用上の注意事項

◆ サンプルに関する注意事項

- 本キットはハイコピープラスミド DNA をトランスフォームした大腸菌の LB 培地 1～2 ml の培養液からのプラスミド DNA 分離を基準値としています。
- 収量はサンプル状態により変動します。サンプル量が多い場合、細胞溶解が充分にできないもしくは、収量が低下する可能性があります。
- endA+の大腸菌の使用は、キットの性能が発揮されない可能性があります。
凍結サンプルで、凍結、融解を繰り返した場合は、収量が低下したり、プラスミド DNA サイズが短くなる場合があります。

◆ 試薬に関する注意事項

- ADP は室温が低い場合、白い析出物が生じることがあります。析出物が生じた場合、37℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。

◆ 操作に関する注意事項

- 全ての操作は室温(15～28℃)で行ってください。低温または高温でご使用の場合、キットの性能が発揮されないことがあります。
- 分離途中では時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- 本キットは 50 μl の CDP で溶出を行うことを前提にしています。CDP 量は変更可能ですが、

溶出効率が変化する可能性があります。

- 運転開始前に、以下の点を確認してください。
 - コレクションホルダーに Waste Tube、1.5 ml or 2 ml マイクロチューブ(回収用容器)がセットされていること
 - 試薬ストリップに 1 ml Long Tip、2 ml マイクロチューブ(ライセート入り)がセットされていること
 - 試薬ホルダーに試薬ストリップが正常にセットされていること
 - 試薬ホルダーのフタが完全に閉まっていること
 - 試薬ホルダー、コレクションホルダーがホルダーガイドに正しくセットされていること
- すべての操作は室温(15~28°C)で行ってください。低温または高温での使用の場合、キットの性能が発揮されないことがあります。詳しい作業環境情報については、QG-Auto12 S/24S 本体取扱説明書をお読みください。
- やむを得ない場合を除き、運転の途中で装置の電源を切らないでください。同じ工程からの運転再開はできません。
- 詳しくは、QG-Auto12S/24S の本体取扱説明書をお読みください。

6. 品質管理

- 品質管理基準を設け、全てのロットで品質に問題のないことを確認しています。
- プラスミド DNA の収量や品質は 260 nm の吸光度、260 nm/280 nm の吸光度比によって確認しています。
-

7. 製品説明

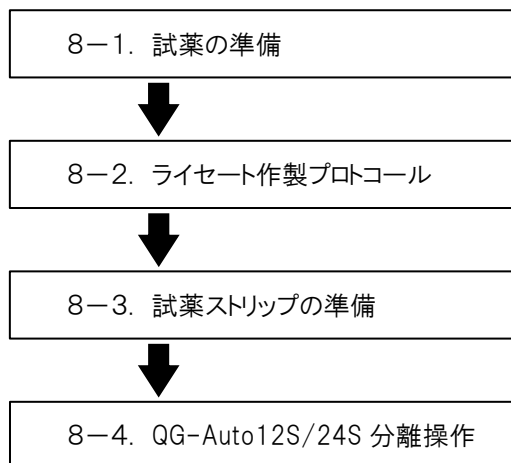
本キットは、ハイコピープラスミド DNA をトランスフォームした大腸菌の LB 培地 1~2 ml の培養液からのプラスミド DNA 分離に対応しています。収量はサンプルの状態により変動します。表 1 に pBlueScript II ベクターへ 1kb の遺伝子を組み換えたプラスミド DNA を DH5 α ヘトランスフォームし、LB 培地で、37°C、一晚培養した 1 ml の培養液から分離したプラスミド DNA の収量および純度例を示します。

表 1 プラスミドDNAの収量例

サンプル	プラスミド DNA 回収量(μ g)	A260/280
pBlueScript II /GAPDH/DH5 α 1 \times 10 ⁹ 個	23.9	2.09

8. プロトコール

〔Overview Flow Chart〕



8 - 1. 試薬の準備

◆EDP

EDP はより安定に保つため、冷蔵(2~8℃)で保存することをお勧めします。

◆RDP

使用前に、RDP ボトルに EDP を全量添加し、よく混和してください。EDP を添加した RDP は冷蔵(2~8℃)で保存し、6 カ月を目安にご使用いただくことをお勧めします。

◆ADP

使用前に混和してください。激しく振ると泡立ちますので避けてください。

ADP は室温が低い場合、白い析出物が生じることがあります。析出物が生じた場合は 37℃ で溶解後、室温に戻してから使用してください。使用後は、直ちに蓋をしっかりと閉めてください。開放したまま放置すると活性が低下します。

◆NDP

使用前に十分に混和してください。

◆LDP

濃縮状態でお届けします。

使用前に、ボトルに正確に 22 ml の特級エタノール(>99%)を添加し、よく混和してください。激しく振ると泡立ちますので避けてください。エタノール添加後はボトル蓋ラベルの「ethanol added?」チェックボックスにチェックを入れてください。また、揮発を防ぐために、ボトルの蓋をしっかりと閉めてください。

8 - 2. ライセート作製プロトコール



ご注意

<1>から<6>の工程の順序は必ずお守りください。

順序を変えた場合、目的の収量が得られない可能性があります。

- 薬品による負傷、感染リスクを抑えるため、適切な保護具を着用してください。
- 試薬ストリップ、各チューブを使用する際はヌクレアーゼの混入を避けるため、手袋を着用してください。
- 詳しくは QG-Auto12S/24S の本体取扱説明書をお読みください。

<1>組換え大腸菌を 2 ml 程度の LB 培地で 12~16 時間培養し、培養液 1~2 ml を 1.5 ml マイクロチューブへ分注し、マイクロ遠心機(3,300×g(6,000rpm))にて 10 分程度を目安)で集菌し、培地をできるだけ除去します。

強くペレット化しすぎると、再分散が難しくなります。

<2> RDP ボトルに EDP を全量添加しよく混ぜてください。組換え大腸菌ペレットに RDP(EDP 添加済み)を 100 μl 添加します。ボルテックスで激しく攪拌して確実に分散させてください。数秒間スピンドウンして、マイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集します。

分散が不十分の場合は溶菌が進まず、プラスミド DNA の収量が低下します。EDP を添加した RDP は、冷蔵(2~8℃)で保存し、6 カ月を目安にご使用いただくことをお勧めします。

<3> ADP を 100 μl 添加し、直ちにゆっくりと 5 回転倒混和してください。数秒間スピンドウンして、マイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集します。

激しく振らないでゆっくりとかつ確実に液を混合させてください(ADP を添加すると、粘性のある液に変わります)。激しく混合すると多くのゲノム DNA が共に分離されます。ゆっくり過ぎて液の混合が不十分の場合、プラスミド DNA の収量が低下します。また、室温で 5 分以上放置すると、プラスミド DNA が変性することがあります。ADP のボトルは使用後、蓋をしっかりと閉めてください。開放したまま放置すると活性が低下します。ADP は室温が低い場合、白い析出物が生じることがあります。析出物が生じた場合は 37℃で溶解後、室温に戻してから使用してください。

<4> NDP を 140 μl 添加し、直ちにゆっくりと 5 回転倒混和してください。数秒間スピンドウンして、マイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集します。

激しく振らないでゆっくりとかつ確実に液を混合させてください(NDP を添加すると、白色の沈殿が生成します)。激しく混合すると多くのゲノム DNA が共に分離されます。ゆっくり過ぎて液の混合が不十分の場合、プラスミド DNA の収量が低下します。

<5> マイクロ遠心機 18,000×g(14,100rpm)で、10 分間室温にて遠心し、沈殿と上清を分離します。遠心分離をしている間に、LDP(特級エタノール添加済み)320 μl を新しい 1.5 ml マイクロチューブへ分注しておきます。そこへ沈殿物が混入しないように遠心上清(およそ 330 μl)を添加します。

沈殿物が混入するとプラスミド DNA と共に多くのゲノム DNA が分離されますので注意してください。

<6> 最大回転数で 30 秒間ボルテックスした後、数秒間スピンドウンして、マイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集し、新しい 2 ml マイクロチューブへ添加します。(ライセート完成)。

混合が不十分の場合、プラスミド DNA の収量が低下します。

8 - 3. 試薬ストリップの準備

- 試薬ストリップ、各チューブを使用する際はヌクレアーゼの混入を避けるため、手袋を着用してください。
- 詳しくは QG-Auto12S/24S の本体取扱説明書をお読みください。

<1>作業台にコレクションホルダーと試薬ホルダーを準備します。

<2>コレクションホルダーにウェイトチューブと、1.5 ml あるいは 2 ml マイクロチューブをセットします。

<3>試薬ストリップを箱から取り出して試薬ホルダーにセットし、ライセートの入った 2 ml マイクロチューブと 1 ml Long Tip を所定の位置に挿します。試薬ストリップの内容物が正しい位置にセットされていることを確認してください。

8 - 4. QG-Auto12S/24S 分離操作

- 運転開始前に QG-Auto12S/24S の取扱説明書をよくお読みください。
- 試薬ストリップ、各チューブを使用する際はスクレーパーの混入を避けるため、手袋を着用してください。

<1> コレクションホルダーと試薬ホルダーを装置にセットします。

<2> 装置本体の電源を入れます。

初期チェックと初期動作を行った後、ホームポジションに停止します。

<3> ホーム画面で「PLASMID DNA」を選択します。

<4> 「Elution Volume」欄でご希望の溶出液量を選択します。

<5> 「Check List」欄に記載のある消耗品が、試薬ホルダーとコレクションホルダー、あるいは試薬カートリッジに装填されていることを確認します。装填されていればチェックボックスをタッチしてチェックマークを入れます。

<6> 「Next」ボタンをタッチします。

<7> 「Protocol Information」の記載内容を確認して「Start」ボタンをタッチすると運転が開始されます。

- 抽出操作が始まると操作パネルに抽出工程が表示されます。
- 運転状況は工程名(LYSIS, BINDING, WASH, ELUTE, FINISH)の点滅によって確認できます。
- 運転中は本体のフロントドアを開けないでください。万一フロントドアを開けた場合は、QG-Auto12S/24S の取扱説明書をお読みになって動作を再開してください。
- 一時停止をする場合は、操作パネルの「Pause」ボタンをタッチしてください。終了の確認画面が表示されますので、「Yes」を押して終了してください。

<8> 運転が終了するとビーブ音が鳴り、工程名が「FINISH」と表示され点滅します。

装置が完全に停止していることを確認した後、フロントドアを開け、試薬ホルダーとコレクションホルダーを取り出し、回収チューブを取り出します。

- すぐに DNA を使用しない場合はチューブの蓋をしっかりと閉め、4°Cまたは-20°Cで保存してください。長期間プラスミド DNA を保存する場合は - 20°Cでの保存をお勧めします。

9. トラブルシューティング

トラブルが生じた場合には、以下の対策を参照してください。

(1) プラスミドDNAの収量が低い、プラスミドDNAが得られない

原因	対策
菌体の溶解が不十分	① RDP での菌体分散が不十分です。よく分散させてください。 ② ADP の攪拌混合が不十分です。液をゆるやかにかつ完全に混合してください。 ③ 使用菌体量が多すぎます。LB 培地の 12~16 時間の培養液 1~2 ml 程度を目安としてください。
試薬量が不適切	プロトコールに従った液量を添加してください。 RDP には EDP を全量添加して使用してください。
サンプル量が不適切	LB 培地 12~16 時間の培養液 1~2 ml 程度を目安としてください。菌がよく増殖していることを確認してください。培養時間が長すぎる培養液には溶菌した細胞が含まれ、分解した核酸が含まれます。
LDP 添加後のボルテックスが不十分	LDP 添加後は、最大回転数で十分にボルテックス(30 秒)してください。
LDP に所定量の特級エタノールを添加していない	LDP 使用前には、必ず所定量の特級エタノール(>99%)を添加したことを確認してください。(8-1 p.9 参照)

(2) RNA が回収された

原因	対策
RNA の分解が不十分	RDP ボトルへ EDP を全量添加し、よく混ぜてから使用してください。サンプル量が多すぎる場合は、サンプル量を所定量(LB 培地の 12~16 時間培養液 1~2 ml 程度)まで下げて使用してください。

(3)ゲノムDNAが回収された

原因	対策
細胞溶解が不適切	ADP、あるいは NDP を添加、混合する工程では、転倒混和により確実に液を混合し、激しく攪拌しないでください。 ADP を添加、混合する工程では、5 分以上放置しないでください。
サンプルが不適切	培養時間が長いと溶菌した細胞が増えてしまいますので、12～16 時間程度の培養を目安にしてください。
遠心後の上清回収時に沈殿物が混入した	NDP 添加後の沈殿物が混入しないように上清を回収してください。

(4)カートリッジが詰まった

原因	対策
サンプルが多すぎる	所定量(LB 培地の 12～16 時間の培養液)
サンプルが不適切	培養時間が長くと溶菌した細胞が増えてしまいますので、12～16 時間程度の培養を目安にしてください。

(5)PCRなど、続けて行う実験がうまくいかない

原因	対策
使用したプラスミドDNA量が不適切	260nm 吸光度から濃度を確認してください。
プラスミドDNAの分解	プラスミド DNA 回収後は -20℃ で保存することをお勧めします。古い培養液から分離すると、プラスミド DNA が分解していることがあります。菌ペレットをすぐに使用しない場合は、ペレットで凍結保存 (-80℃) しておくことをお勧めします。分離前に室温に戻してから操作してください。

(6)試薬に析出物が生じた

原因	対策
低温で保存している	指定の温度(15～28℃)で保存してください。 析出物が生じた場合は、37℃で溶解後、析出物を溶解後、室温に戻してから使用してください。

10. オーダーリング・インフォメーション

製 品	内 容	Cat #
QuickGene-AutoS DNA Blood Kit	48 回入	AS-DB
QuickGene-AutoS DNA Tissue Kit	48 回入	AS-DT
QuickGene-AutoS Plasmid Kit	48 回入	AS-PL
QuickGene-AutoS RNA Blood Kit	48 回入	AS-RB
QuickGene-AutoS RNA Tissue Kit	48 回入	AS-RT
QuickGene-AutoS RNA Cultured Cell Kit	48 回入	AS-RC

＊トレードマークと免責事項

本取扱説明書に記載されている登録名などは、特に表示がない場合でも法律によってその権利が保証されています。



●製造元

倉敷紡績株式会社

環境メカトロニクス事業部 バイオメディカル部

〒572-0823 大阪府寝屋川市下木田町14-30

TEL (072) 820-3079 FAX (072) 820-3095

URL; <http://www.kurabo.co.jp/bio/>