

QIAGEN® Plasmid *Plus* Purification プロトコールとトラブルシューティング

大腸菌からのトランスフェクション・グレードの
プラスミドDNA調製

目次	ページ
プロトコール	
QIAGEN Plasmid <i>Plus</i> Midi Kitを用いたプラスミドDNA精製	2
QIAGEN Plasmid <i>Plus</i> Maxi Kitを用いたプラスミドDNA精製	5
QIAGEN Plasmid <i>Plus</i> Mega/Giga Kitを用いたプラスミドDNA精製	8
トラブルシューティング	11



プロトコール： QIAGEN Plasmid *Plus* Midi Kitを用いたプラスミドDNA精製

本プロトコールはQIAGEN Plasmid *Plus* Midi Kitを用いて、最大35 mlの培養溶液から250 µgまでの高コピーのプラスミドDNAあるいは低コピーのプラスミドDNAを精製するためにデザインされています。

実験を始める前の重要事項

- QIAGEN Plasmid *Plus* Midiの標準プロトコールで使用する量は▲、QIAGEN Plasmid *Plus* Midiの高収量プロトコールで使用する量は●で記載されています。
- オプション：分析用ゲル電気泳動によって実験の経過を確認するために、プロトコールのステップ6以降ではサンプルの一部を採取します。

表3. 推奨する培養液量の上限

コピー数	標準プロトコール	高収量プロトコール
高コピーのプラスミド*	20～25 ml	25～35 ml
低コピーのプラスミド*†	50 ml	-

* 高コピーのプラスミドを精製する場合の予想収量は、QIAGEN Plasmid *Plus* Midi Kitで標準プロトコールを用いた場合▲100～200 µg、QIAGEN Plasmid *Plus* Midi Kitで高収量プロトコールを用いた場合●150～250 µgです。低コピーのプラスミドを精製する場合の予想収量は、記載の培養液量を用いてQIAGEN Plasmid *Plus* Midi Kitの標準プロトコールを使用した場合▲30～100 µgになります。

† 低コピープラスミドはQIAGEN Plasmid *Plus* Midi Kitを用いて効率的に精製されますが、高密度あるいは栄養リッチな培養液（例：Terrific-Broth [TB]あるいは2x YT）で増殖したバクテリアではプラスミド純度が低下することがあります。これはプラスミドDNAに対して、夾雑物（RNA、タンパク質、多糖類など）の割合が増加するためです。

操作手順

1. ▲2 mlまたは●4 mlのBuffer P1で大腸菌ペレットを再懸濁する。

Buffer P1にRNase Aを添加したかどうかを確認してください（英語版 Handbook 18ページ、“Things to do before starting for all protocols”を参照）。

大腸菌を効率よく溶解させるために、溶解バッファーを完全に混和できるように十分な容量を有する容器を使用することが大切です。細胞塊が無くなるまでボルテックスやピペティングにより大腸菌を完全に再懸濁させます。

2. ▲2 mlまたは●4 mlのBuffer P2を添加後、容器を静かに転倒混和し、室温（15～25℃）で3分間インキュベートする。

ライセートは粘性をおびてきます。溶菌は5分間以上行なわないでください。使用後、Buffer P2が空気中のCO₂を吸収して酸性になるのを避けるため、Buffer P2の入った容器は直ちにしっかりと蓋を閉じてください。

LyseBlue®をBuffer P1に添加した場合は、Buffer P2添加後に細胞懸濁液は青色に変色し、溶液を混和することにより均一な青色の懸濁液になります。懸濁液に無色の部分があったり、茶色の細胞塊が観察される場合は、溶液が均一な青色になるまで混和を続けてください。

3. ▲2 mlまたは●4 mlのBuffer S3をライセートに添加後、直ちに4～6回転倒混和する。直ぐにステップ4に進む。氷上でライセートをインキュベートしない。

Buffer S3を添加すると、ゲノムDNA、タンパク質、細胞残渣、およびドデシル硫酸カリウムなどを含む白色綿毛状の沈殿物が形成されます。沈殿層を分散させないようにライセートを直ぐにQIAfilter Cartridgeへ移すことが重要です。混和液の粘性が高く、茶色っぽい場合は、混和が足りないため完全に中和されるまでよく混和してください。

LyseBlue 試薬を使用した場合は、青色が消え懸濁液が無色になるまで十分に混和します。均一で無色の溶液はKDSが効率的に沈殿したことを示します。

4. QIAfilter Cartridgeの中にライセートを移し、室温（15～25℃）で10分間インキュベートする。

低コピー数のプラスミド培養液容量を使用する場合、QIAfilter Cartridgeで清澄化する前に遠心操作を行なうと良い結果が得られることがあります。10分のインキュベーションの代わりに遠心操作を行なうと、目詰まりがなく、ろ過を簡単に行なえます。アルカリ溶解を行なった容器が遠心装置で使用可能な場合は、この容器を直接遠心操作できます。遠心操作は約4,500 x gで5分間行ないます。少量の沈殿物質が上清の表面に存在することがありますが、上清をQIAfilter Cartridgeにアプライする際にピペットチップで容易に取り除くことができます。

重要：室温でのインキュベーションは、QIAfilter Cartridgeの性能を十分に発揮させるために重要です。この時にQIAfilter Cartridgeを揺り動かさないでください。タンパク質、ゲノムDNA、界面活性剤を含む沈殿物は液体の表面に浮遊層を形成します。これにより目詰まりがなく、ろ過を簡便に行なえます。インキュベーション後、溶液の表面に浮遊層が形成されなければ、滅菌ピペットチップでCartridgeの壁面の付着物を慎重に剥がしてください。

5. インキュベーションの間に吸引マニホールドとQIAGEN Plasmid Plus Midi Spin Columnを準備する。

6. 静かにプランジャーをQIAfilter Cartridgeに入れ、Buffer BBを添加するスペースのある新しいチューブに細胞ライセートをろ過させる。

ライセートのすべてが、QIAfilter Cartridgeを通過し終わるまでろ過しますが、過剰な加圧をしないでください。

7. 2 mlのBuffer BBを清澄化ライセートに添加し、4～6回転倒混和する。

8. Tube ExtenderをセットしたQIAGEN Plasmid Plus Midi Spin Column (QIAvac 24 Plus上)にライセートを移す。

9. 吸引装置のスイッチを入れて約-300 mbarに設定し、溶液を **QIAGEN Plasmid Plus Midi Spin Column** に通過させる。全溶液がすべてのカラムを通過後、吸引装置を止める。

一定の安定な吸引力で残っているサンプルを操作するため、溶液がカラムを通過後、順次VacValveを閉じてください。

10. DNAを洗浄するために0.7 mlのBuffer ETRを添加し、次の2つのステップのどちらかを行なう：

吸引操作による洗浄：

- 0.7 mlのBuffer ETR添加後、吸引装置のスイッチを入れる。溶液がすべてのカラムを通過後、吸引装置を止める。

マイクロ遠心操作による洗浄：

- Tube Extenderを廃棄し、QIAGEN Plasmid Plus Midi Spin Columnを2 mlのコレクションチューブ（添付）にセットする。各カラムに0.7 mlのBuffer ETRを添加し、10,000 x gで1分間遠心操作して洗浄する。ろ液を棄てる。

11. DNAをさらに洗浄するために0.7 mlのBuffer PEを添加し、次の2つのステップのどちらかを行なう：

吸引操作による洗浄：

- 0.7 mlのBuffer PE添加後、吸引装置のスイッチを入れる。溶液がすべてのカラムを通過後、吸引装置を止める。

マイクロ遠心操作による洗浄：

- ステップ12で使用する空のコレクションチューブにQIAGEN Plasmid Plus Midi Spin Columnをセットする。0.7 mlのBuffer PEを添加し、10,000 x gで1分間遠心操作して、DNAを洗浄する。ろ液を棄てる。

12. 残存している洗浄バッファーを完全に除去するために、カラムをマイクロ遠心機にセットして10,000 x gで1分間遠心する。

13. 新しい1.5 mlのマイクロ遠心チューブにQIAGEN Plasmid Plus Midi Spin Columnをのせる。DNAの溶出を行なうために200 µlのBuffer EB（10 mM Tris-Cl、pH 8.5）あるいは水をQIAGEN Plasmid Plus Midi Spin Columnの中央に添加し、カラムを最低1分間放置後、1分間遠心する。

DNA溶解に使用する水あるいはバッファー（例；TE）を溶出用にも使用できます。

注：TE Bufferには酵素反応やシーケンシング反応を阻害するEDTAが含まれています。

注：水で溶出した場合には、緩衝作用やキレート効果がないためDNAが分解しやすいので、-20℃で保存してください。

プロトコール： QIAGEN Plasmid *Plus Maxi Kit* を用いたプラスミドDNA精製

本プロトコールは QIAGEN Plasmid *Plus Maxi Kit* を用いて、最大 130 ml の培養溶液から 1,000 µg までの高コピーのプラスミド DNA あるいは低コピーのプラスミド DNA を精製するためにデザインされています。

実験を始める前の重要事項

- QIAGEN Plasmid *Plus Maxi* の標準プロトコールで使用する量は▲、QIAGEN Plasmid *Plus Maxi* の高収量プロトコールで使用する量は●で記載されています。
- オプション：分析用ゲル電気泳動によって実験の経過を確認するために、プロトコールのステップ 6 以降でサンプルの一部を採取します。

表 4. 推奨する培養液量の上限

コピー数	標準プロトコール	高収量プロトコール
高コピーのプラスミド*	80 ~ 100 ml	100 ~ 130 ml
低コピーのプラスミド*†	最大 200 ml	-

* 高コピーのプラスミドを精製する場合の予想収量は、QIAGEN Plasmid *Plus Maxi Kit* で標準プロトコールを用いた場合▲750 µg、QIAGEN Plasmid *Plus Maxi Kit* で高収量プロトコールを用いた場合●1,000 µg です。低コピーのプラスミドを精製する場合の予想収量は、最大 200 ml の培養液量を用いて QIAGEN Plasmid *Plus Maxi Kit* の標準プロトコールを使用した場合▲50 ~ 250 µg です。

† 低コピープラスミドは QIAGEN Plasmid *Plus Maxi Kit* を用いて効率的に精製されますが、高密度あるいは栄養リッチな培養液（例；Terrific-Broth [TB] あるいは 2x YT）で増殖したバクテリアではプラスミド純度が低下することがあります。これはプラスミド DNA に対して、夾雑物（RNA、タンパク質、多糖類など）の割合が増加するためです。

操作手順

1. ▲5 ml または ●8 ml の Buffer P1 で大腸菌ペレットを再懸濁する。

Buffer P1 に RNase A を添加したかどうかを確認してください（英語版 Handbook 18 ページ、“Things to do before starting for all protocols” を参照）。

大腸菌を効率よく溶解させるために、溶解バッファーを完全に混和できるように十分な容量を有する容器を使用することが大切です。細胞塊が無くなるまでボルテックスやピペティングにより大腸菌を完全に再懸濁させます。

2. ▲5 ml または ●8 ml の Buffer P2 を添加後、容器を静かに転倒混和し、室温（15 ~ 25°C）で3分間インキュベートする。

ライセートは粘性をおびてきます。溶菌は5分間以上行なわないでください。使用後、Buffer P2 が空気中の CO₂ を吸収して酸性になるのを避けるため、Buffer P2 の入った容器は直ちにしっかりと蓋を閉じてください。

LyseBlueをBuffer P1に添加した場合は、Buffer P2添加後に細胞懸濁液は青色に変色し、溶液を混和することにより均一な青色の懸濁液になります。懸濁液に無色の部分があったり、茶色の細胞塊が観察される場合は、溶液が均一な青色になるまで混和を続けてください。

3. ▲5 mlまたは●8 mlのBuffer S3をライセートに添加後、直ちに4～6回転倒混和する。直ぐにステップ4に進む。氷上でライセートをインキュベートしない。

Buffer S3を添加すると、ゲノムDNA、タンパク質、細胞残渣、およびドデシル硫酸カリウムなどを含む白色綿毛状の沈殿物が形成されます。沈澱層を分散させないようにライセートを直ぐにQIAfilter Cartridgeへ移すことが重要です。混和液の粘性が高く、茶色っぽい場合は、混和が足りないため完全に中和されるまでよく混和してください。

LyseBlue 試薬を使用した場合は、青色が消え懸濁液が無色になるまで十分に混和します。均一で無色の溶液はKDSが効率的に沈澱したことを示します。

4. QIAfilter Cartridgeの中にライセートを移し、室温（15～25℃）で10分間インキュベートする。

低コピー数のプラスミド培養液容量を使用する場合、QIAfilter Cartridgeで清澄化する前に遠心操作を行なうと良い結果が得られることがあります。10分のインキュベーションの代わりに遠心操作を行なうと、目詰まりがなく、ろ過を簡単に行なえます。アルカリ溶解を行なった容器が遠心装置で使用可能な場合は、この容器を直接遠心操作できます。遠心操作は約4,500 x gで5分間行ないます。少量の沈殿物質が上清の表面に存在することがありますが、上清をQIAfilter Cartridgeにアプライする際にピペットチップで容易に取り除くことができます。

重要：室温でのインキュベーションは、QIAfilter Cartridgeの性能を十分に発揮させるために重要です。この時にQIAfilter Cartridgeを揺り動かさないでください。タンパク質、ゲノムDNA、界面活性剤を含む沈殿物は液体の表面に浮遊層を形成します。これにより目詰まりがなく、ろ過を簡便に行なえます。インキュベーション後、溶液の表面に浮遊層が形成されなければ、滅菌ピペットチップでCartridgeの壁面の付着物を慎重に剥がしてください。

5. インキュベーションの間に吸引マニホールドとQIAGEN Plasmid Plus Maxi Spin Columnを準備する。

6. 静かにプランジャーをQIAfilter Cartridgeに入れ、Buffer BBを添加するスペースのある新しいチューブに細胞ライセートをろ過させる。

ライセートのすべてが、QIAfilter Cartridgeを通過し終わるまでろ過しますが、過剰な加圧をしないでください。

7. 5 mlのBuffer BBを清澄化ライセートに添加し、4～6回転倒混和する。
8. Tube ExtenderをセットしたQIAGEN Plasmid Plus Maxi Spin Column（QIAvac 24 Plus上）にライセートを移す。

9. 吸引装置のスイッチを入れて約-300 mbarに設定し、溶液を **QIAGEN Plasmid Plus Maxi Spin Column** に通過させる。溶液がすべてのカラムを通過後、吸引装置を止める。

一定の安定な吸引力で残っているサンプルを操作するため、溶液がカラムを通過後、順次 VacValve を閉じてください。

10. DNA を洗浄するために 0.7 ml の Buffer ETR を添加し、次の 2 つのステップのどちらかを行なう：

吸引操作による洗浄：

- 0.7 ml の Buffer ETR 添加後、吸引装置のスイッチを入れる。溶液がすべてのカラムを通過後、吸引装置を止める。

マイクロ遠心操作による洗浄：

- Tube Extender を廃棄し、QIAGEN Plasmid Plus Maxi Spin Column を 2 ml のコレクションチューブ（添付）にセットする。各カラムに 0.7 ml の Buffer ETR を添加し、10,000 x g で 1 分間遠心操作して洗浄する。ろ液を棄てる。

11. DNA をさらに洗浄するために 0.7 ml の Buffer PE を添加し、次の 2 つのステップのどちらかを行なう：

吸引操作による洗浄：

- 0.7 ml の Buffer PE 添加後、吸引装置のスイッチを入れる。溶液がすべてのカラムを通過後、吸引装置を止める。

マイクロ遠心操作による洗浄：

- ステップ 12 で使用する空のコレクションチューブに QIAGEN Plasmid Plus Maxi Spin Column をセットする。0.7 ml の Buffer PE を添加し、10,000 x g で 1 分間遠心操作して、DNA を洗浄する。ろ液を棄てる。

12. 残存している洗浄バッファーを完全に除去するために、カラムをマイクロ遠心機にセットして 10,000 x g で 1 分間遠心する。

13. 新しい 2 ml のマイクロ遠心チューブに QIAGEN Plasmid Plus Maxi Spin Column をのせる。DNA の溶出を行なうために 400 μ l の Buffer EB（10 mM Tris-Cl、pH 8.5）あるいは水を QIAGEN Plasmid Plus Maxi Spin Column の中央に添加し、カラムを最低 1 分間放置後、1 分間遠心する。

DNA 溶解に使用する水あるいはバッファー（例；TE）を溶出用にも使用できません。

注：TE Buffer には酵素反応やシークエンシング反応を阻害する EDTA が含まれています。

注：水で溶出した場合には、緩衝作用やキレート効果がないため DNA が分解しやすいので、-20℃で保存してください。

プロトコール： QIAGEN Plasmid *Plus Mega/Giga Kit* を用いたプラスミドDNA精製

このプロトコールはQIAGEN Plasmid *Plus Mega/Giga Kit*用です。QIAGEN Plasmid *Plus Mega Kit*を用いると、最大500 mlの培養液（LB培養液）あるいは湿重量1.5 gの大腸菌ペレットから2.5 mgまでの高コピーのプラスミドDNAあるいは低コピーのプラスミドDNAを調製することができます。QIAGEN Plasmid *Plus Giga Kit*を用いると、最大2.5リッターの培養液（LB培養液）あるいは湿重量7.5 gの大腸菌ペレットから10 mgまでの高コピーのプラスミドDNAあるいは低コピーのプラスミドDNAを調製することができます。

実験を始める前の重要事項

- QIAfilter Mega-Giga Cartridgeは1リッターの耐圧性ガラス瓶（口径45 mm、例；Schott、cat. no. 2181054あるいはCorning、cat. No.1395-1L）用にデザインされています。

注：ガラス瓶はキットには含まれないので、お客様がご用意ください。カートリッジは、-200から-600 millibar（-150から-450 mm Hg）で吸引可能な装置（例；house vacuum、真空ポンプまたはアスピレーター）で操作します。吸引力は瓶の内部と外気（1013 millibarあるいは760 mm Hg）の圧力差を測定しています。推奨する圧力は外気圧に対しての必要な圧力の減少で示しているために、マイナスで示しています。

- ガラス瓶の破裂を防ぐため、耐圧仕様でないプラスチック/ガラス瓶その他の容器を使用しないでください。ひびや傷のあるプラスチック/ガラス瓶その他の容器を使用しないでください。ガラス瓶を用いて吸引操作を行なっている際は安全のため眼鏡を着用してください。
- オプション：分析用ゲル電気泳動によって実験の経過を確認するために、プロトコールのステップ7以降でサンプルの一部を採取します。
- QIAGEN Plasmid *Plus Mega Kit*で使用する量は▲、QIAGEN Plasmid *Plus Giga Kit*で使用する量は●で記載されています。

操作手順

1. **QIAfilter Mega-Giga Cartridge**をガラス瓶（口径：45 mm）にセットし、吸引装置に繋ぐ。英語版Handbook 33ページのAppendix Aに記載されているように、**Tube Extender**をつけた**QIAGEN Plasmid *Plus Mega/Giga Spin Column***を**QIAvac 24 Plus**の上にセットする。

QIAfilter Cartridgeのプラスチックが破損するので、QIAfilter Cartridgeをボトルネックにあまり強くねじ込まないでください。

2. ▲25 mlまたは●100 mlのBuffer P1で大腸菌ペレットを再懸濁する。

Buffer P1にRNase Aを添加したかどうかを確認してください（英語版Handbook 18ページ、“Things to do before starting”を参照）。

LyseBlueをBuffer P1に添加した場合は、使用前に瓶を強く振って、LyseBlue粒子を完全に再懸濁してください。細胞塊が無くなるまでボルテックスやピペティングにより大腸菌を完全に再懸濁させます。

3. ▲25 mlまたは●100 mlのBuffer P2を添加する。チューブを穏やかに4～6回反転して完全に混和し、室温（15～25℃）で5分間インキュベートする。

ライセートは粘性をおびてきます。溶菌は5分間以上行なわないでください。使用后、Buffer P2が空気中のCO₂を吸収して酸性になるのを防止するため、Buffer P2ボトルは直ちにしっかりと蓋を閉じてください。

LyseBlueをBuffer P1に添加した場合は、Buffer P2添加後に細胞懸濁液は青色に変色し、溶液を混和することにより均一な青色の懸濁液になります。懸濁液に無色の部分があったり、茶色の細胞塊が観察される場合は、溶液が均一な青色になるまで混和を続けてください。

4. ▲25 mlまたは●100 mlのBuffer S3をライセートに添加後、直ちに4～6回転倒混和する。直ぐにステップ5に進む。氷上でライセートをインキュベートしない。

Buffer S3を添加すると、ゲノムDNA、タンパク質、細胞残渣、およびドデシル硫酸カリウム（KDS）を含む白色綿毛状の沈殿物が形成されます。沈殿層を分散させないようにライセートを直ぐにQIAfilter Cartridgeへ移すことが重要です。混和液の粘性が高く、茶色っぽい場合は、混和が足りないため完全に中和されるまでよく混和してください。

LyseBlue試薬を使用した場合は、青色が消え懸濁液が無色になるまで十分に混和します。均一で無色な溶液はKDSが効率的に沈殿したことを示しています。

5. QIAfilter Mega-Giga Cartridgeの中にライセートを移し、室温で10分間インキュベートする。

この時にQIAfilter Cartridgeを揺り動かさないでください。タンパク質、ゲノムDNA、界面活性剤を含む沈殿物は液体の表面に浮遊層を形成します。これにより目詰まりがなく、ろ過を簡便に行なえます。インキュベーション後、溶液の表面に浮遊層が形成されなければ、滅菌ピペットチップでCartridgeの壁面の付着物を慎重に剥がしてください。

注：QIAfilter Mega-Giga Cartridgeの室温、10分間のインキュベーションは、カートリッジが最適な性能を発揮するための必須条件です。あるいは、適切な容器と遠心機を用いてライセートを10,000 x gで10分間遠心操作することも可能です。遠心後、上清をQIAfilter Mega-Giga Cartridgeに移します。インキュベートはしないでください。ステップ6に進みます。

6. 吸引装置のスイッチを入れる。全溶液がQIAfilter Cartridgeを通過後、吸引装置を止める。
7. ▲25 mlまたは●100 mlのBuffer BBを清澄化ライセートに添加後、直ちに4～6回転倒混和する。

8. **Tube Extender**をセットした **QIAGEN Plasmid Plus Mega/Giga Spin Column (QIAvac 24 Plus 上)** にライセートを移す。
9. 吸引装置のスイッチを入れて約 **-300 mbar** にセットし、**VacValve** を開く。溶液がカラムを通過した後、それぞれの **VacValve** を閉じる。溶液がすべてのカラムを通過後、吸引装置を止める。
安定な吸引力で操作するため、溶液が通過したカラムの **VacValve** を順次、閉じてください。
10. **DNA** 洗浄のために **80 ml** の **Buffer ETR** を添加し、吸引装置のスイッチを入れ、吸引力を最大にセットし、**VacValve** を開く。溶液がカラムを通過した後、それぞれの **VacValve** を閉じる。溶液がすべてのカラムを通過後、吸引装置を止める。
11. 2 回目の洗浄用に **50 ml** の **Buffer PE** を添加し、吸引装置のスイッチを入れ、吸引力を最大にセットし、**VacValve** を開く。溶液がカラムを通過した後、それぞれの **VacValve** を閉じる。溶液がすべてのカラムを通過後、吸引装置を止める。
12. **50 ml** コレクションチューブ（添付）にセットした **QIAGEN Plasmid Plus Mega/Giga Spin Column** にサンプルを移す。
13. **5,000 x g** で **10** 分間遠心操作し（室温）、メンブレンを乾燥させる。
14. **QIAGEN Plasmid Plus Mega/Giga Spin Column** を新しい **50 ml** コレクションチューブにセットする。**DNA** を溶出するため、▲ **1 ml** または● **5 ml** の **Buffer EB** を **QIAGEN Plasmid Plus Mega/Giga Spin Column** に添加し、**1** 分間放置する。インキュベーション後、チューブの蓋を閉めて室温（**15 ~ 25 °C**）で **5,000 x g**、**5** 分間遠心操作する。
DNA 溶解に使用する水あるいはバッファー（例；TE）を溶出用にも使用できます。
注：TE Buffer には酵素反応やシークエンシング反応を阻害する EDTA が含まれています。
注：水で溶出した場合には、緩衝作用やキレート効果がないため DNA が分解しやすいので、**-20 °C** で保存してください。

トラブルシューティングガイド

コメント

収量が低い、あるいは全くない

カラムにアプライする前の清澄化ライセート中にDNAが存在しない

- a) プラスミドが増殖しなかった 最適な培養条件であったかをチェックする。詳細は、www.qiagen.com/goto/plasmidinfo を参照する。
- b) アルカリ溶解が不十分 プロトコールで指示されているよりも細胞の密度が高すぎたり培養液量が多すぎた場合には、バクテリアと溶解液の適正量比が変わる。プラスミドDNAを効率よく解離させるための Buffer P1、P2、S3の量が不十分なために、このような条件下では溶解が不完全になる。溶解バッファーに対するバイオマスの割合を改善するために培養液量を減らす。
- 溶解試薬が十分に混和していないと収量が低下することもある。Buffers P1、P2、S3を添加後、完全に混和して均一な溶液にする。混和が効率良く行なわれているかを色で確認するにはLyseBlueを使用する。
- c) 低コピーのプラスミドを調製する際の溶解が不完全 低コピーのプラスミドを調製する際には、2倍容量の Buffer P1、P2、S3とBBを添加すれば、プラスミドの収量、純度を改善されることがある。
- d) Buffer P2あるいはBBが沈澱 溶液を37℃に温めて溶解する。
- e) 細胞の再懸濁が不十分 ペレット化した細胞を Buffer P1で完全に再懸濁する。均一な懸濁液が得られるまで Buffer P2を添加しない。

DNAが洗浄ろ液中に存在する

洗浄バッファーにエタノールが入っていない 正確に洗浄バッファー (Buffer PE) を調製しなおす。

DNAの品質が低い

溶出液にエタノールが残存 QIAGEN Plasmid Plus Spin Columnを完全に乾燥したことを確認する (4、7ページのステップ12あるいは10ページのステップ13を参照)。

コメント

ろ過中に QIAfilter Cartridge が目詰まりを起こす

- | | |
|--|---|
| a) 過剰な培養液量を使用 | プロトコール中で指示されている量以上の培養液を使用しない。 |
| b) Buffer S3 を添加後の混和が不十分 | 綿毛状の白色物質が生成し、ライセートの粘性がなくなるまでよく混和する。 |
| c) Buffer S3 添加後の混和が激しすぎる | Buffer S3 を添加後、ライセートをすぐに、しかし穏和に混和する。激しく混和すると、綿毛状の沈澱が崩壊して微細な粒子を形成し、QIAfilter Cartridge が目詰まりを起こす。 |
| d) インキュベーション中に QIAfilter Cartridge を攪拌した | ライセートに Buffer S3 を添加した後、すぐに QIAfilter Cartridge に注ぎ、3 分間のインキュベーション中はかき混ぜない。かき混ぜると浮遊層が形成されずに、沈澱は微細な粒子に崩壊する。 |
| e) Buffer S3 を添加後すぐに QIAfilter Cartridge にロードしなかった | Buffer S3 を添加後、ライセートを即 QIAfilter Cartridge にロードする。しばらく放置した後にロードすると沈澱が崩壊して微細な粒子を形成し、QIAfilter Cartridge が目詰まりを起こす。 |
| f) Buffer S3 の添加後、室温ではなく氷上でインキュベートした | QIAfilter Cartridge の中でのインキュベーションを室温（15～25℃）で行なったかどうかを確かめる。沈澱の浮遊物は氷上よりも室温でより効果的に形成される。 |
| g) Buffer S3 添加後のインキュベーションの時間が短い | プロトコールの指示に従って Buffer S3 とインキュベートする。10 分間のインキュベーション後、沈澱が液面に浮上しない場合、ろ過を開始する前に注意深く滅菌ピペットチップで Cartridge の内壁に付着した沈澱を剥がす。 |
| h) 吸引力が弱すぎた | 吸引力が -200 から -600 milibar (-150 から -450 mm Hg) の吸引ができる装置を使用する。 |

ろ過後のライセートが透明でない

ライセートに生じた沈澱を無理に QIAfilter Cartridge に通過させた	ライセートのすべてが、QIAfilter Cartridge を通過し終わるまでろ過するが、過剰な吸引力はかけない。
--	--

QIAGEN Plasmid *Plus* Spin Column が DNA 結合中に目詰まりを起こす

調製したライセート中の DNA 量がカラムの結合容量を超えている	カラムの最大結合容量を超えている。残ったライセートを除去し、続きの全てのステップはマイクロ遠心機を用いて遠心操作を行なう。
----------------------------------	---

Trademarks: QIAGEN®, LyseBlue® (QIAGEN Group).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載のQIAGEN製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2008–2009 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒104-0054 ■ 東京都中央区勝どき3-13-1 ■ Forefront Tower II

Tel:03-6890-7300 ■ Fax:03-5547-0818 ■ E-mail:techservice-jp@qiagen.com

