

この日本語版は英語版 June 2005 に対応します

HiSpeed™ Plasmid Purification プロトコールとトラブルシューティング

HiSpeed Plasmid Midi および Maxi Kit

トランスフェクション・グレード DNA 精製用

目次	ページ
プロトコール	
HiSpeed Plasmid Midi/Maxi Kit を用いたプラスミドあるいは コスミド DNA 精製	2
トラブルシューティング	8



プロトコール： HiSpeed Plasmid Midi/Maxi Kitを用いたプラスミドあるいはコスミドDNA精製

このプロトコールで、高コピーあるいは低コピーのプラスミドあるいはコスミドDNAを、HiSpeed Plasmid Midi Kitでは200 µgまで、HiSpeed Plasmid Maxi Kitでは750 µgまで精製可能です。

500 µlのBuffer TEで高コピーのプラスミドを溶出する場合、最大0.4 µg/µl (Midi)あるいは最大1.5 µg/µl (Maxi)の最終濃度のDNA産物を得ることができます。しかし、低コピーベクターの場合の最終濃度はかなり低くなる場合があります。低コピー数のプラスミドから高い収量が必要な場合には、2本のQIAfilter Cartridgeからのライセートを1本のHiSpeed Tipにアプライすることが可能です。または、低コピーベクターからの溶出液あるいは希釈したサンプルは、減圧遠心あるいはエタノール沈殿により濃縮することができます。

クロラムフェニコール存在下で増幅した低コピープラスミドは、適切な培養液量を決定する場合に、高コピープラスミドと同じように取り扱ってください。

推奨する培養液量の上限*

	HiSpeed Plasmid Midi Kit	HiSpeed Plasmid Maxi Kit
高コピーのプラスミド	50 ml	150 ml
低コピーのプラスミド [†]	150 ml	250 ml

* 予想収量は高コピープラスミドの場合はHiSpeed Plasmid Midi Kitでは100 ~ 200 µg、HiSpeed Plasmid Maxi Kitでは300 ~ 750 µg、低コピープラスミドの場合はHiSpeed Plasmid Midi Kitでは30 ~ 100 µg、HiSpeed Plasmid Maxi Kitでは50 ~ 250 µgです。

[†] QIAGENが推奨するQIAfilter Cartridgeへアプライする培養液量の上限。低コピープラスミドをより高い収量で得たい場合には、2つのQIAfilterカートリッジから得られたライセートを一本のHiSpeed Tipにロードしてください。

実験を始める前の重要事項

- 新規ユーザーはこのハンドブックに記載されている詳細なプロトコールを利用されることを強くお勧めします。また、包括的なバックグラウンド情報もウェブサイトのプラスミド関連ページ www.qiagen.com/goto/plasmidinfo でご覧いただけます。
- オプション：☞のマークがあるステップでは、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、サンプルの一部を採取してください（英語版 Handbook 29ページ参照）。

実験開始前の準備事項

- 使用前に Buffer P1 にキットの RNase A 液を加えてください。RNase A の 1 バイアル分（使用前に軽く遠心する）を Buffer P1 のボトルに添加すれば、最終濃度 100 µg /ml となります。
- 低温保存中に Buffer P2 に SDS の沈澱が生じていないかどうかを確かめてください。SDS の沈澱が生じているようであれば、37 °C に加温して SDS を溶かしてから使用してください。
- Buffer P3 は、あらかじめ 4 °C に冷却してから使用してください。
- オプション：使用前にキットに入っている LyseBlue 試薬を Buffer P1 に添加し、混和します。LyseBlue の 1 バイアル分を使用前に軽く遠心し、Buffer P1 のボトルに添加すれば、1000 倍に希釈されます。LyseBlue によりバッファーが最適に混和されたことを目で確認でき、非効率的な細胞溶解や SDS、ゲノム DNA、細胞破片の不完全な沈澱を引き起こす一般的な操作ミスを防ぐことができます。詳細は英語版 Handbook 16 ページの “ Using LyseBlue reagent ” をご覧ください。

操作手順

1. 新しく作製した選択プレートから単一コロニーを採取し、適切な抗生物質を含んだ 2 ~ 5 ml の LB 培養液に接種する。37 °C で約 8 時間、激しく振盪培養（約 300 rpm）する。
培養液量の少なくとも 4 倍以上の容量を有するチューブあるいはフラスコを使用してください。
2. スターター培養液を 500 ~ 1000 倍に選択 LB 培養液で希釈する。高コピーのプラスミドの場合、50 ml（Midi）または 150 ml（Maxi）の培養液に接種する。低コピーのプラスミドの場合は 150 ml（Midi）または 250 ml（Maxi）の培養液に接種する。37 °C で 12 ~ 16 時間、激しく振盪培養し（約 300 rpm）バクテリア細胞を培養する。
培養液量の少なくとも 4 倍以上の容量を有するフラスコや容器を使用してください。この培養条件下では通常、培養細胞密度は約 $3 \sim 4 \times 10^9$ 個/ml に達し、湿重量にして約 3 g/l のペレットに相当します。
3. 4 °C で 6,000 x g、15 分間遠心操作し、バクテリア細胞を回収する。
遠心上清を完全に除去する際には、遠心チューブを逆さにして最後の一滴まで取り除くようにしてください。
☒ ここで操作を中断する場合は、収集したバクテリアペレットは -20 °C に保存してください。

4. バクテリアペレットを6 ml (Midi)または10 ml (Maxi)のBuffer P1に懸濁する。
バクテリアを効率よく溶解させるためには、溶解バッファーを完全に混和させるのに十分な容量を有する容器を使用することが大切です。Buffer P1にRNase Aを加えてあるかどうかを確認してください。

LyseBlueをBuffer P1に添加している場合は、使用前に瓶を強く振って、LyseBlue粒子を完全に再懸濁します。細胞塊が無くなるまでボルテックスやピペッティングによりバクテリアを完全に再懸濁させます。

5. 6 ml (Midi)または10 ml (Maxi)のBuffer P2を添加後、4 ~ 6回激しく転倒させ十分に混和し、5分間室温 (15 ~ 25) に放置する。

ボルテックスするとゲノムDNAが切断されるのでボルテックスしないでください。ライセートは粘稠になります。溶菌反応は5分間以上行なわないでください。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ボトルの使用後は、直ちにしっかりと蓋を閉じて保存してください。

LyseBlueをBuffer P1に添加している場合は、Buffer P2添加後に細胞懸濁液は青色になります。混和により溶液は均一な青色になります。溶液に無色の部分があったり、茶系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してください。

室温に放置している間にQIAfilter Cartridgeを準備する：

QIAfilter Midi/Maxi Cartridgeの出口ノズルにキャップを取り付ける。

QIAfilter Cartridgeを適当なチューブあるいはQIARack上に置く。

6. 冷却したBuffer P3、6 ml (Midi)あるいは10 ml (Maxi)を添加後、直ちに4 ~ 6回激しく転倒混和する。すぐにステップ7へと進む。氷上でライセートをインキュベートしない。

冷却したBuffer P3を使用すると沈澱が促進されます。Buffer P3を添加すると、ゲノムDNA、タンパク質、細胞の破片、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。バッファーは完全に混和してください。混和液の粘性が高く、茶色っぽい場合は混和が足りないので、完全に中和されるまでよく混和してください。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。

LyseBlue 試薬を使用している場合は、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SDSが効率的に沈澱したことを示します。

7. QIAfilter Cartridgeの中にライセートを注ぐ。室温で10分間インキュベートする。ここでプランジャーを挿入しない。

重要：室温で10分間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。インキュベーション中にCartridgeを揺り動かさないでください。タンパク質、ゲノムDNA、界面活性剤等の沈殿物は液体の表面に浮遊層を形成します。これにより、目詰まりなくろ過が簡便に行なえます。10分間放置後、溶液の表面に浮遊層を形成しなければ、注意深く滅菌ピペットチップでCartridgeの壁面の付着物を剥がしてください。

8. HiSpeed Midi TipあるいはHiSpeed Maxi Tipに4 ml (Midi)あるいは10 ml (Maxi)のBuffer QBTを加え、カラムが空になるまで静置流出して平衡化する。

平衡化バッファーに含まれている界面活性剤によって表面張力が減少すると、バッファーは自然に流出し始めます。HiSpeed Tipに添加したバッファーを完全に流出させます。バッファーの液面がカラム中の上のフリットに達するとバッファーの流出は停止するので、HiSpeedTipを見張っている必要はありません。

9. QIAfilter 出口ノズルからキャップを取り除く。静かにプランジャーをQIAfilter MidiあるいはQIAfilter Maxi Cartridgeに入れ、細胞ライセートがあらかじめ平衡化したHiSpeed Tipに注ぎ込まれるようにろ過する。

全ライセートがQIAfilter Cartridgeを通過するまでろ過し、無理な力をかけないでください。ろ過後、一般的には約15 ml (Midi)あるいは25 ml (Maxi)のライセートが回収されます。

⇒ 300 µl (Midi)あるいは120 µl (Maxi)のフロースルーサンプルを分析用ゲル電気泳動用サンプル(サンプル1)として採取保存しておき、後で増殖と溶解の条件が最適であったかを確認します。

10. 清澄化ライセートを樹脂に自然落下により浸透させる。

⇒ 300 µl (Midi)あるいは120 µl (Maxi)のフロースルーサンプルを分析用ゲル電気泳動用サンプル(サンプル2)として採取保存しておき、後でQIAGEN ResinへのDNA結合率を決定します。

11. HiSpeed Midi TipあるいはHiSpeed Maxi Tipを20 ml (Midi)あるいは60 ml (Maxi)のBuffer QCで洗浄する。

HiSpeed TipにBuffer QCを添加して自然落下により通過させます。

⇒ 洗浄画分から400 µl (Midi)あるいは240 µl (Maxi)を採取、保存し、分析用ゲル電気泳動用サンプル(サンプル3)とします。

12. 5 ml (Midi)あるいは15 ml (Maxi)のBuffer QFでDNAを溶出する。

溶出液を10 ml (Midi)あるいは30 ml (Maxi)以上の容量の遠心チューブに集めます。

⇒ 100 µl (Midi)あるいは60 µl (Maxi)の溶出液を分析用ゲル電気泳動用サンプル(サンプル4)として採取保存しておきます。

⊗ ここで操作を中断する場合は、溶出液は4時間で保存してください。一晩以上保存しておくことは避けてください。

13. 溶出したDNA液に3.5 ml (Midi)あるいは10.5 ml (Maxi)(0.7倍容量)の室温イソプロパノールを添加して、DNAを沈澱する。混和後、室温で、5分間インキュベートする。

全ての溶液は、塩の沈澱が生ずるのを防止するために室温で用います。

14. インキュベーションの間に、20 ml (Midi) あるいは 30 ml (Maxi) のシリンジからプランジャーを取り除き、出口ノズルに QIAprecipitator Midi Module あるいは QIAprecipitator Maxi Module を取り付ける。
重要：プランジャーを引き上げる前に、必ず QIAprecipitator をシリンジから取り除いてください。
15. QIAprecipitator を廃液用ボトルの上に置き、20 ml (Midi) あるいは 30 ml (Maxi) シリンジ中に溶出液とイソプロパノールの混和液を添加、プランジャーを差し込む。溶出液とイソプロパノールの混和液は、一定の圧力で QIAprecipitator を通過させる。
別の方法として、20 ml (Midi) あるいは 30 ml (Maxi) のシリンジに取り付けた QIAprecipitator を QIAvac 24 Plus あるいは QIAvac 6S 吸引装置に設置することも可能です。吸引の際にルアエクステンションの位置から QIAprecipitator を上げるために、VacConnector (Cat.No.19407) を使用することをお勧めします。スイッチを入れて溶出液 / イソプロパノール混和液を通過させます。すべての溶液が通過したらスイッチを切ります。
重要：QIAprecipitator 操作 (ステップ 15 ~ 21) は 10 分以内で完了してください。QIAprecipitator が外れて DNA およびアルコールの消失を防ぐために、QIAprecipitator に液体を通過させる際に過剰な力を加えないようにしてください。
16. 20 ml (Midi) あるいは 30 ml (Maxi) のシリンジから QIAprecipitator を取り除き、プランジャーを引き抜く。QIAprecipitator を再びセットし、70% エタノール 2 ml をシリンジに添加する。プランジャーを差し込んで、一定の圧力下でエタノールを QIAprecipitator に通過させて、DNA を洗浄する。
あるいは吸引装置を使用している場合は、70% エタノール 2 ml を添加し、QIAprecipitator にエタノールを通過させるためにスイッチを入れます。吸引を 3 分間行ないます。ステップ 18 に進んでください。
17. 20 ml (Midi) あるいは 30 ml (Maxi) のシリンジから QIAprecipitator を取り除き、プランジャーを引き抜く。QIAprecipitator を 20 ml (Midi) あるいは 30 ml (Maxi) シリンジに再び取り付け、プランジャーを差し込んで QIAprecipitator に空気を通過させることによりメンブレンを乾燥させる。この操作をもう一度繰り返す。
18. エタノールの残存を避けるために、吸収性のある紙をあてて QIAprecipitator の出口のノズルを乾燥させる。

19. 新しい5 mlのシリンジからプランジャーを取り除き、QIAprecipitatorを出口ノズルに取り付ける。1.5 mlのコレクションチューブ上にQIAprecipitatorの出口ノズルをセットする。1 mlのBuffer TEを5 mlシリンジに添加する。プランジャーを差込み、一定の圧力でチューブ中にDNAを溶出させる。

プランジャーを差し込む前にQIAprecipitatorから溶出液が出てくるので、必ずQIAprecipitatorの出口ノズルをコレクションチューブの中に向けてから、Buffer TEをシリンジに添加してください。

QIAprecipitator内の溶出バッファーは、出口ノズルから吹き出る際に泡を形成しやすいので、プランジャーは静かに差し込んでください。

別の方法として、DNA濃度をより高くするために、収量が90%まで低下してもよいという場合には、500 µlのTE bufferで溶出を行なってください。少ない容量のバッファーで溶出するとQIAprecipitator膜に液が充分に行き渡らずDNAの収量低下を引き起こすため、これ以上バッファー容量を少なくすることは避けてください。

通常DNAを溶解するのに用いられる水あるいはその他のバッファー(例; Tris)で溶出を行なうことも可能です。

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: 水で溶出を行なった場合には、バッファー作用やキレート剤がないためDNAが分解しやすいので、-20 で保存してください。

20. 5 mlのシリンジからQIAprecipitatorを取り除き、プランジャーを引き抜いて、QIAprecipitatorを再び5 mlシリンジに取り付ける。
21. ステップ19の溶出液を5 mlシリンジに添加し、同じ1.5 mlチューブへもう一度溶出させる。

この再溶出ステップにより、QIAprecipitator中の最大量のDNAを溶解し再回収することが可能です。

QIAprecipitator内の溶出バッファーは、出口ノズルから吹き出る際に泡を形成しやすいので、プランジャーは静かに差し込んでください。

収量の測定

DNAの収量を定める際には、UV分光光度計による260 nmでの測定とアガロースゲル電気泳動による定量分析を併用してDNAの濃度を決めます。分光光度計で正確なDNA定量を行なうためには、 A_{260} 測定値が0.1 ~ 1.0の間であるべきです。

アガロースゲルによる分析

精製操作中、サンプルの一部(サンプル1 ~ 4)を分取保存しておくことをお勧めします。プラスミドDNAの収量や純度に問題があるときなど、サンプルをアガロースゲル電気泳動で解析することにより、精製操作中のどの段階で問題が生じたか確認することができます(英語版 Handbook 29ページを参照)。

トラブルシューティングガイド

コメント

DNA 収量が少ないか皆無

ライセート(サンプル1)中にDNAが存在しない

- a) プラスミドが増殖しなかった
- 弊社ウェブページ www.qiagen.com/goto/plasmidinfo の “ Growth of Bacterial Cultures ” を参照にして、最適な培養条件であることを確認する。
- 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増殖が高密度、あるいは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とP3の量が不十分なために、このような条件下では溶解不良になる。培養液量を減らすか、またはBuffer P1、P2とP3の液量を増す。
- 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、P3を添加後完全に混和して均一な溶液にする。LyseBlueを用いて混和が効率良く行われているか色で確認する。
- 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倍容量の溶解Buffer P1、P2とP3を添加すれば、プラスミドの収量、純度を上げることができる(英語版 Handbook 12ページまたはwww.qiagen.com/goto/plasmidinfoを参照)。
- d) ライセート調製が不正確
- Buffer P2の低温保存によってSDSの沈澱ができる場合には、温めてSDSを溶かす。P2バッファーの入っているボトルの使用後は、直ちに蓋をしっかりと閉めておく。溶解バッファーは英語版 Handbook 32ページに掲載されている指示に従って調製する。
- 必要に応じて、新しいBuffer P1、P2、P3を調製する。

コメント

フロースルー画分（サンプル2）中にDNAが存在

- a) カラムへのオーバーロード
それぞれのプロトコールのはじめに記載されている HiSpeed Tip の容量に対しての培養液量と収量の関係をチェックする。指示に従って培養液量を減らす。
- b) SDS（またはその他のイオン性界面活性剤）がライセートに混在
Buffer P3 を使用前に冷却しておく。遠心後のライセートが透明であれば、遠心操作後すぐに HiSpeed Tip に添加する。ライセートが粘稠で、Buffer P3 と混和しにくいようであれば、培養液量を減らすか、Buffer P1、P2 と P3 の液量を増やす。
LyseBlue を用いて混和が効率良く行なわれているか色で確認する。
- c) バッファー中に不適切な塩類が含まれているか、pH が不適切
研究室で準備したバッファーが英語版 Handbook 32 ページに記載されている指示に従って作製されているかを確認する。
- d) カラムの流速が一定でない
HiSpeed Tip は室温（15 ~ 25 ）で保存する。冷蔵保存、あるいは長期間、湿度の高い場所で保存すると樹脂が塊りになっていることがある。使用前にカラムを振って使用すれば、この問題は解消される。

Buffer QC による洗浄画分（サンプル3）中にDNAが存在

- a) カラムへのオーバーロード
それぞれのプロトコールのはじめに記載されている HiSpeed Tip の容量に対しての培養液量と収量の関係をチェックする。指示に従って培養液量を減らす。
- b) Buffer QC が適正でなかった
Buffer QC に含まれる塩類濃度、pH は適正かどうかをチェックする。沈澱させて DNA を回収し、新しい HiSpeed Tip カラムを用いて精製する（ウェブページ www.qiagen.com/goto/plasmidinfo の “Purification of plasmid DNA prepared by other methods” 参照）。

コメント

溶出液（サンプル4）中にDNAが存在しない

- a) ライセート中にDNAが存在しない 8ページの“ライセート（サンプル1）中にDNAが存在しない”を参照
- b) 溶出用Buffer QFが適正でない Buffer QF中の塩類濃度、pHをチェックする。新しいバッファーでDNAを溶出・回収する。
- c) DNAがカラムを通過しフロースルーまたは洗浄画分に含まれていた 前の2項目を参照

DNAが夾雑物を含むあるいは品質が低い

- a) 溶出液中にゲノムDNAが混入 バクテリアのライセートを激しく混和しすぎた。染色体DNAの切断を防ぐためには、Buffer P2とP3を加えた後のライセートを穏やかに取り扱うようにする。ボルテックスで混和しない。ライセートの粘稠性が高く静かに混和できない場合には、培養液量を減らす。
- b) 溶出液中のRNA RNase Aによる分解が充分でない。培養液量が適正であるかどうかをチェックし、必要に応じて培養液量を減らす。キットに入っているRNase Aを使用したことを確認する。Buffer P1が6ヶ月以上経過している場合はRNase Aを追加する。溶出液を沈澱し、RNase A分解を行ない、新しいHiSpeed Tipを用いた精製を行なってDNAを回収する。
- c) ヌクレアーゼの混入 バッファーにヌクレアーゼが混入していないかを確認し、必要に応じて新しいものと交換する。新しいガラス、プラスチック容器に換え手袋も着用する。
- d) 溶解時間が長すぎた 溶解ステップ（Buffer P2）で溶解時間が5分を超えていないかを確認する。
- e) アルカリ溶解で細胞を過剰に添加 HiSpeed Tipの容量に対する培養液量と収量をチェックする。培養液量を減らすか、あるいはBuffer P1、P2とP3の量を増やす。
- f) プラスミドDNAのニック/切断/分解 DNAの溶解バッファーが適当でない。ヌクレアーゼ活性を阻害し保存中のpHを安定に保つためには、pH 8.0のTEにDNAを再溶解する。
- g) 宿主菌がエンドヌクレアーゼを持っている www.qiagen.com/goto/plasmidinfoのバックグラウンド情報を参照し、*E. coli*宿主菌株を変える。

コメント

精製DNAを用いてよい結果が得られない

- a) タンパク質が残存 培養液量が適正であるかどうかをチェックし、必要に応じて培養液量を減らす。20,000 x g以上、45分間の遠心、あるいはQIAfilter Cartridgeによって得られたバクテリアライセートが、透明な溶液になっているかを確かめる。

ゲル電気泳動分析における余分なDNAバンドがある

- a) プラスミドの二量体 プラスミドDNAの複製の際は、プラスミドスーパーコイルの二量体と多量体が形成される。精製したプラスミドDNAの電気泳動のゲルをエチジウムブロマイド染色すると、スーパーコイルDNAの単量体と二量体がみられる(英語版 Handbook 29ページ、Figure 5参照)。これらの比率はしばしば宿主菌に依存している。
- b) 変性スーパーコイルプラスミドが形成 この変性スーパーコイルDNAは、ゲル内では、閉環状DNAより速く移動し、制限酵素には耐性である(英語版 Handbook 29ページ、Figure 5参照)。Buffer P2を添加した後で5分以上インキュベートしてはいけない。Buffer P3の添加後、直ちに混和する。
- c) 欠失変異株の可能性 いくつかの塩基配列はプラスミド中で安定に維持されない。制限酵素分析によって欠損の有無をチェックする。特に、コスミドクローンの場合は、長期培養の大腸菌の中では不安定なので、新しく撒いたプレートの中で他のコロニーと重なっていないコロニーから調製しなくてはならない。

HiSpeed Tipの目詰まり

- ライセートが濁っていた カラムに添加する前にライセートが透明であるかを確かめる。Buffer P3は使用前に冷えているかどうかを確かめる。目詰まりを起こしたHiSpeed Tipを通過可能にするには、穴のあいたゴム栓と注射器を組み合わせたものなどで加圧する。

QIAfilter Cartridge

QIAfilter Cartridge がろ過中に目詰まりを起こす

- | | | |
|----|---|--|
| 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 P3 を添加後の混合が不十分 | 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 P3 添加後の混和が激し過ぎる | Buffer P3 を添加後、ライセートをすぐに、しかし穏和に混和する。ボルテックスで混和しない。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) | Buffer P3 を添加後すぐに QIAfilter Cartridge にロードしなかった | Buffer P3 を添加後、すぐにライセートを QIAfilter Cartridge にロードする。しばらく放置した後に添加すると沈澱が崩壊して微細な粒子を形成して QIAfilter Cartridge をつまらせる。 |
| e) | インキュベーション中に QIAfilter Cartridge を攪拌 | ライセートに Buffer P3 を添加した後、すぐに QIAfilter Cartridge に注ぎ、10 分間のインキュベーション中にはかき混ぜない。
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。 |
| f) | Buffer P3 添加後のインキュベーションを室温でなく氷上で行なった | QIAfilter Cartridge の中でのインキュベーションを室温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く形成される。 |
| g) | Buffer P3 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 P3 とインキュベートする。10 分間のインキュベーション後に液面に浮遊層が形成されない場合、注意深く滅菌ピペットチップ、または滅菌スパーテルなどで Cartridge の内壁に付着した沈澱を剥がした後、ろ過を続ける。 |

ろ過後のライセートが透明でない

QIAfilter Cartridge に沈澱を無理に通過させた ライセートの全てが、QIAfilter Midi/Maxi Cartridge を通過し終わるまでろ過し、過剰な加圧をしない。通常約 15 ml (Midi) あるいは 25 ml (Maxi) のライセートが回収される。

QIAprecipitator Module

得られた DNA を用いた実験でよい結果が得られない

溶出液にアルコールが残存している 少なくとも 2 回 QIAprecipitator に空気を通過させて膜を完全に乾燥させる。QIAprecipitator の出口ノズルは吸収性のある紙をあてて乾燥させる。

使用中に QIAprecipitator が目詰まりを起こす

- a) QIAprecipitator に添加した DNA 量が多すぎる QIAprecipitator に複数のカラムから得られた溶出液を添加しない。
- b) HiSpeed Maxi Tip からの溶液の沈澱に QIAprecipitator Midi Module を使用した 使用した HiSpeed Tip に対応する QIAprecipitator を使用する。
- c) 沈澱用にイソプロパノールの代わりにエタノールを使用した 沈澱用にイソプロパノールの代わりにエタノールを使用すると細かい沈澱ができ、目詰まりをおこす。

QIAprecipitator のケースが壊れて漏れる

- a) QIAprecipitator をアルコールに長時間接触させた アルコールに長時間接触すると、QIAprecipitator の上部と下部の間のジョイントが弱くなることもある。ステップ 15 ~ 21 は 10 ~ 15 分間で完了させる。
- b) QIAprecipitator の取り付け時に力がかかりすぎる QIAprecipitator をシリンジに取り付ける際は、必要以上の力をかけたり、曲げたり、捻ったりしない。
- c) QIAprecipitator の入り口を操作中に曲げた QIAprecipitator の端を硬い表面上 (シンクの端) におきプランジャーを押し、入り口に無理な力をかけないこと。QIAprecipitator を垂直に押す時も常に丁寧に取り扱う。

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



W W W . Q I A G E N . C O . J P