

この日本語版は英語版 June 2005 に対応します

QIAprep[®] Miniprep プロトコールとトラブルシューティング

分子生物学実験グレードのDNA精製

プラスミド

10 kb以上のプラスミド

低コピー数のプラスミドおよびコスミド

他の方法により調製したプラスミド



目次

プロトコール

QIAprep Spin Miniprep Kitを用いたプラスミドDNA精製	
マイクロ遠心機を使用	3
5 ml コレクションチューブを使用	4
吸引マニフォールドを使用	5
QIAprep 8 Miniprep Kitを用いたプラスミドDNA精製	7
QIAprep 8 Turbo Miniprep Kitを用いたプラスミドDNA精製	10
QIAprep 96 Turbo Miniprep Kitを用いたプラスミドDNA精製	13
トラブルシューティング	16

プロトコール： QIAprep Spin Miniprep Kitとマイクロ遠心機を用いたプラスミドDNA精製

本プロトコールは、LB(Luria-Bertani)培養液で一晩培養した *E. coli* 培養液 1 ~ 5 ml から 20 µg までの高コピープラスミドDNAの精製用にデザインされています。低コピープラスミドおよびコスミド、10 kb以上のプラスミド、他の方法を用いて調製したDNAの精製に関しては、英語版 Handbook 44 ページをご覧ください。

実験を始める前に英語版 Handbook 15 ~ 21 ページの “ Important Notes ” をお読みください。

注意：プロトコールの全ステップは室温で行ないます。

操作手順

1. 250 µl の Buffer P1 でバクテリア細胞ペレットを再懸濁し、マイクロ遠心チューブに移す。

Buffer P1 に RNase A を加えたことを確認してください。ペレットの再懸濁後、細胞塊は見えなくなります。

LyseBlue 試薬を 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ビペティングによりバクテリアを完全に再懸濁します。

2. 250 µl の Buffer P2 を添加後、4 ~ 6 回転倒させ完全に混和させる。

チューブを静かに転倒させて混和します。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。必要なら、溶液が粘稠になり少し透明になるまでチューブを転倒して混和します。溶菌反応は5分間以上行なわないでください。

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。

3. 350 µl の Buffer N3 を添加後、直ちにチューブを4 ~ 6 回転倒させて完全に混和する。

沈澱が局在化するのを避けるために、Buffer N3 の添加後、溶液を完全にしかし穏和に混和します。5 ml 以上の培養液では最高10回までチューブを転倒させて混和します。溶液は濁ります。

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。

4. 卓上マイクロ遠心機を用いて 13,000 rpm (約 17,900 x g) で10分間遠心操作する。

白い塊状のペレットが形成されます。

5. ステップ4の上清をデカントあるいはピペティングにより QIAprep スピнкаラムにアプライする。
6. 30 ~ 60 秒間遠心操作する。フロースルー液を捨てる。
7. 推奨 : Buffer PB 0.5 ml を添加後 30 ~ 60 秒間遠心して QIAprep スピнкаラムを洗浄する。フロースルー液を捨てる。

JM シリーズ、HB101 のような *endA*⁺ 株あるいはヌクレアーゼ活性あるいは炭水化物含量の高い野生株を用いた際に、ヌクレアーゼ活性を完全に除去するために本ステップが必要です。XL-1 Blue や DH5 α [™] のような宿主株ではこの洗浄ステップは必要ありません。
8. Buffer PE 0.75 ml を添加後 30 ~ 60 秒間遠心して QIAprep スピнкаラムを洗浄する。
9. フロースルー液を捨て、残留している洗浄バッファーを除去するためにさらに 1 分間遠心操作する。

重要 : 2 度目の遠心操作をする前にフロースルー液を捨てなければ、洗浄バッファーは完全に除去されません。Buffer PE のエタノールが残留していると、続く酵素反応が阻害されることがあります。
10. QIAprep カラムを新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブにセットする。DNA を溶出するために Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) または水 50 μ l を各 QIAprep spin カラムの中央にアプライし、1 分間放置した後、1 分間遠心操作する。

プロトコール : QIAprep Spin Miniprep Kit と 5 ml のコレクションチューブを用いたプラスミド DNA 精製

5 ml の遠心チューブ (例 ; Greiner、cat. no. 115101 または 115261) をコレクションチューブとして QIAprep Spin Miniprep 調製を行なうので、操作が減少します。3 ~ 4 ページのスタンダード・プロトコールを次のように改良します。

ステップ 4 : QIAprep スピнкаラムを 2 ml のコレクションチューブではなく 5 ml の遠心チューブにセットする。

ステップ 6 : 適切なローターを用いて 3000 x g で 1 分間遠心操作する (例 ; Beckman[®] GS-6KR 遠心機 ~4000 rpm) (フロースルー液を捨てる必要なし)

ステップ 7 洗浄ステップは、遠心操作を 3000 x g で 1 分間行なう。

および 8 : (フロースルー液を捨てる必要なし)

ステップ 9 : QIAprep スピнкаラムをマイクロ遠心チューブに移す。最高速度で 1 分間遠心操作する。プロトコールの 10 に続ける。

プロトコール： QIAprep Spin Miniprep Kitと吸引マニフォールドを用いたプラスミドDNA精製

本プロトコールは、QIAprep スピнкаラムと QIAvac 24 Plus/QIAvac 6S/その他の吸引マニフォールドを用いて、LB (Luria-Bertani) 培養液で一晩培養した *E. coli* 培養液 1 ~ 5 ml から最高 20 µg までの高コピープラスミド DNA の精製用にデザインされています。低コピープラスミドおよびコスミド、10 kb 以上のプラスミド、他の方法を用いて調製した DNA の精製に関しては、英語版 Handbook 44 ページをご覧ください。

実験を始める前に英語版 Handbook 15 ~ 21 ページの “Important Notes” をお読みください。

注意：プロトコールの全ステップは室温で行ないます。

操作手順

1. 250 µl の Buffer P1 でバクテリア細胞ペレットを再懸濁し、マイクロ遠心チューブに移す。

Buffer P1 に RNase A を加えたことを確認してください。ペレットの再懸濁後、細胞塊は見えなくなります。

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します。

2. 250 µl の Buffer P2 を添加後、4 ~ 6 回転倒させ完全に混和させる。

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。必要なら、溶液が粘稠になり少し透明になるまでチューブを転倒して混和します。溶菌反応は 5 分間以上行なわないでください。

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。

3. 350 µl の Buffer N3 を添加後、直ちにチューブを 4 ~ 6 回転倒させて完全に混和する。

沈澱が局在化するのを避けるために、Buffer N3 の添加後、溶液を完全にしかし穏和に混和します。5 ml 以上の培養液では最高 10 回までチューブを転倒させて混和します。溶液は濁ります。

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。

4. 卓上マイクロ遠心機を用いて 13,000 rpm (約 17,900 x g) で 10 分間遠心操作する。

白い塊状のペレットが形成されます。

遠心操作の際に、吸引マニフォールドと QIAprep スピнкаラムを準備する。

QIAvac 24 Plus (英語版 Handbook 16 および 18 ~ 19 ページ参照) :

- 吸引装置が QIAvac 24 Plus の上方のねじ穴に繋がり、下方ねじ穴をネジ蓋で固く閉めていることを確認します。
- QIAvac Connecting System を使用する際は、QIAvac 24 Plus Handbook に記載されているようにシステムをマニフォールドと吸引装置に接続します。
- 最高 24 個までのスピнкаラムを QIAvac 24 Plus のルアースロットにセットします。使用しない部分はルアープラグで塞ぎます。

QIAvac 6S マニフォールド :

(注: 次の操作はパネ錠付き蝶番式蓋のついたマニフォールドに用います。英語版 Handbook 16 および 18 ~ 20 ページをご覧ください。)

- QIAvac 6S の上蓋を開く。QIAvac の top plate のスロットに QIAvac ルアアダプターを装着するか、使用しないスロットは blank (QIAvac 6S に付属) で塞ぐ。QIAvac 6S の上蓋を閉じる。QIAvac base の内部に廃液トレイを設置後、QIAvac base の上に top plate をぴったりと載せる。QIAvac 6S を吸引装置に接続する。
- 各 QIAquick カラムを吸引マニフォールドのルアアダプター上のルアーコネクターに挿入する。使用しないルアーコネクターは QIAvac Luer Adapter Set に付属のプラグで塞ぐ。

その他の吸引装置: メーカーの説明書に従う。各 QIAprep カラムをルアーコネクターに挿入する。

5. ステップ 4 の上清をデカントあるいはピペッティングにより QIAprep スピнкаラムにアプライする。
6. 吸引装置のスイッチを入れて溶液を QIAprep スピнкаラムに通過させ、その後吸引装置のスイッチを切る。
7. 推奨: QIAprep スピнкаラムを 0.5 ml の Buffer PB で洗浄する。吸引装置のスイッチを入れる。溶液がカラムを通過後、吸引装置のスイッチを切る。

JM シリーズ、HB101 のような *endA*⁺ 株あるいはヌクレアーゼ活性あるいは炭水化物含量の高い野生株を用いた際に、ヌクレアーゼ活性を完全に除去するために本ステップが必要です。XL-1 Blue や DH5 α TM のような宿主株ではこの洗浄ステップは必要ありません。

8. QIAprep スピンカラムを 0.75 ml の Buffer PE で洗淨する。吸引装置のスイッチを入れる。洗淨液がカラムを通過後、吸引装置のスイッチを切る。
9. QIAprep スピンカラムをマイクロ遠心チューブに移す。1 分間遠心操作する。
重要：この遠心操作は残留している Buffer PE を除去するために必要です。Buffer PE 中の残留エタノールは酵素反応を阻害します。
10. QIAprep カラムを新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブにセットする。DNA を溶出するために Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) または水 50µl を各 QIAprep spin カラムの中央にアプライし、1 分間放置した後、1 分間遠心操作する。

プロトコール： QIAprep 8 Miniprep Kit を用いたプラスミドDNA精製

本プロトコールは、最高48サンプルから高コピープラスミドDNAの同時精製用にデザインされています。LB(Luria-Bertani)培養液で一晩培養した *E. coli* 培養液 1 ~ 5 ml から最高20 µg までのDNAを精製可能です。低コピープラスミドおよびコスミド、10 kb 以上のプラスミド、他の方法を用いて調製したDNAの精製に関しては、英語版 Handbook 44 ページをご覧ください。

実験を始める前に英語版 Handbook 15 ~ 21 ページの “ Important Notes ” をお読みください。

注意：プロトコールの全ステップは室温で行ないます。

操作手順

1. 250 µl の Buffer P1 でバクテリア細胞ペレットを再懸濁し、マイクロ遠心チューブに移す。

Buffer P1 に RNase A を加えたことを確認してください。ペレットの再懸濁後、細胞塊は見えなくなります。

2. 250 µl の Buffer P2 を添加後、4 ~ 6 回静かに転倒させ完全に混和させる。

チューブを静かに転倒させて混和します。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。必要なら、溶液が粘稠になり少し透明になるまでチューブを転倒して混和します。溶菌反応は5分間以上行なわないでください。

3. 350 µl の Buffer N3 を添加後、直ちにチューブを4 ~ 6 回転倒させて完全に混和する。

沈澱が局在化するのを避けるために、Buffer N3 の添加後、溶液を完全にしかし穏和に混和します。溶液は濁ります。

4. 卓上マイクロ遠心機を用いて 13,000 rpm (約 17,900 x g) で 10 分間遠心操作する。

白い固まりのペレットが形成されます。

遠心操作の際に QIAvac 6S を準備する：

(注：次の操作はパネ錠付き蝶番式蓋のついたマニフォールドに用います。英語版 Handbook 16 および 18 ~ 20 ページをご覧ください。)

■ QIAvac 6S の上蓋を開く。QIAvac top plate のスロットに QIAprep 8 ストリップを装着する。ストリップをしっかりと装着していることを確認します。使用しないスロットは blank (QIAvac 6S に付属) で塞ぐ。QIAvac 6S の上蓋を閉じる。

■ QIAvac base の内部に廃液トレイを設置後、QIAvac base の上に top plate をぴったりと載せる。使用しないルアーコネクタは QIAvac Luer Adapter Set に添付されているプラグで塞ぐ。QIAvac 6S を吸引装置に接続する。

5. ステップ4の上清を QIAprep 8 ストリップのウェルにアプライし、吸引装置のスイッチを入れる。

上清をアプライする前に QIAvac 6S を正確にセットしたことを確認してください。迅速に上清を QIAprep 8 ストリップにアプライします。上清が濁る場合は、QIAprep 8 ストリップの目詰まりを防ぐためにアプライする直前に遠心操作をもう一度行ないます。フロースルー液は廃液トレイに集められます。

6. 推奨：吸引装置のスイッチを切り、Buffer PB 1 ml を各ウェルに添加・吸引して QIAprep 8 ストリップを洗浄する。

JM シリーズ、HB101 のような *endA*⁺ 株あるいはヌクレアーゼ活性あるいは炭水化物含量の高い野生株を用いた際に、ヌクレアーゼ活性を完全に除去するために本ステップが必要です。XL-1 Blue や DH5 α TM のような宿主株ではこの洗浄ステップは必要ありません。

7. 吸引装置のスイッチを切る。Buffer PE 1 ml を各ウェルに添加・吸引して QIAprep 8 ストリップを洗浄する。

Buffer PE を添加して QIAprep 8 ストリップを通過させます。

8. ステップ7をもう一度繰り返す。

9. Buffer PE が全ウェルを通過後、さらに5分間最大に吸引してメンブレンを乾燥させる。

重要：この遠心操作はメンブレンに残留している Buffer PE を除去するために必要です。最大に吸引した時にのみ（例；vacuum regulator あるいは leak-age valve を使用している場合は切る）最大の空気がウェルを通過し、この除去は効果的に行なわれます。

10. 吸引装置のスイッチを切り、QIAvac マニフォールドを大気圧に戻す。Base から top plate 全体を持ち上げて（top plate から QIAprep ストリップを取り出すのではない）吸水性のある紙を重ねて、この上で水滴出なくなるまで top plate を激しく叩く。QIAprep ストリップのノズルを吸水性のある紙で覆う。ステップ 11a あるいは 11b に続ける。

この遠心操作は QIAprep 8 ストリップの出口ノズルとその外筒に残留している Buffer PE を除去するために必要です。Buffer PE 中の残留エタノールは酵素反応を阻害します。

- 11a. キットに入っているコレクション・マイクロチューブに溶出を行なう場合：
廃液トレイの代わりに青色の microtube rack (QIAvac 6S に付属、1.2 ml コレクション・マイクロチューブをセット) をセットする。Top plate を base の上に戻す。
コレクション・マイクロチューブは QIAprep 8 ストリップと同じ並びにする。
- 11b. 96 ウェル・マイクロプレートに溶出を行なう場合：
廃液トレイの代わりに青色の microtube rack (QIAvac 6S に付属) をセットし、ラックの上に 96 ウェル・マイクロプレートを直接置く。base に top plate を戻す。
12. DNA を溶出するために Buffer EB (10 mM Tris·Cl、pH 8.5) あるいは水 100 μ l を QIAprep 8 ストリップの各ウェル中央にアプライし、1 分間放置した後、吸引スイッチを入れる。溶出後、吸引スイッチを切り QIAvac 6S をゆっくりと大気圧に戻す。
溶出溶液を 75 μ l にすると DNA 濃度が増加します。

プロトコール：QIAprep 8 Turbo Miniprep Kit を用いた プラスミドDNA精製

本プロトコールは中程度のスループット数のプラスミドDNAミニプレップ用にデザインされ、TurboFilter 8とQIAprep 8ストリップをQIAvac 6Sで使用します。LB (Luria-Bertani) 培養液で一晩培養した*E. coli*培養液1～5 mlから最高20 µgまでの高コピープラスミドDNAを8～48サンプル同時に精製可能です。低コピープラスミドおよびコスミド、10 kb以上のプラスミド、他の方法を用いて調製したDNAの精製に関しては、英語版 Handbook 44 ページをご覧ください。

実験を始める前に英語版 Handbook 15～21 ページの“Important Notes”をお読みください。

注意：プロトコールの全ステップは室温で行ないます。

操作手順

1. 250 µlのBuffer P1でバクテリア細胞ペレットを再懸濁する。

Buffer P1にRNase Aを加えたことを確認してください。ペレットの再懸濁後、細胞塊は見えなくなります。

2. 250 µlのBuffer P2を添加後、4～6回静かに転倒させ完全に混和させる。室温で5分間インキュベートする。

チューブを静かに転倒させて混和します。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。必要なら、溶液が粘稠になり少し透明になるまでチューブを転倒して混和します。

インキュベーション中に、QIAvac 6Sを準備する（英語版 Handbook 16および18～20ページ参照）：

- QIAvac 6Sの上蓋を開く。QIAvacのtop plateのスロットにTurboFilter 8 Stripを装着する。ストリップをしっかりと装着していることを確認する。使用しないスロットはblank (QIAvac 6Sに付属)で塞ぐ。QIAvac 6Sの上蓋を閉じる
- QIAvac baseの内部にstrip holderを設置する。その結果QIAprep stripは各TurboFilterストリップの下に置かれる。
- QIAvac baseの上にtop plateをぴったりと載せる。使用しないTurboFilterストリップウェルは付属のstrip capで塞ぐ。QIAvacを吸引装置に接続する。

3. 350 µlのBuffer N3を各サンプルに添加後、直ちにチューブを4～6回転倒させて完全に混和する。

Buffer N3添加後すぐにサンプルを静かにしかし完璧に混和して、沈澱が局在化するのを防ぎます。溶液は濁ります。

4. ステップ3のライセートをピペットでTurboFilter ストリップのウェルに入れる (850 μ l / ウェル)。使用しないTurboFilter ストリップのウェルは添付のstrip cap で塞ぐ。サンプルがTurboFilter を通過するまで吸引する。

最適な流速は1 ~ 2 滴 / 秒です。3-way valve、あるいはQIAvac と吸引装置の間のvacuum regulator (英語版 Handbook 48 ページ参照) で調節します。

5. 吸引装置のスイッチを切って、QIAvac 6S をゆっくりと大気圧に戻す。TurboFilter ストリップを捨てる。清澄化ライセートを含んだQIAprep ストリップをQIAvac top plate の slot に移す。QIAvac 6S の蓋を閉め、廃液トレイの代わりにstrip holder をbase にセットする。base の上にtop plate をぴったりと載せる。使用しないQIAprep strip のウェルはstrip cap (添付) で塞ぐ。吸引する。

フロースルー液は廃液トレイに回収されます。

6. 推奨：吸引装置のスイッチを入れる。各ウェルに1 ml のBuffer PB を添加後、吸引装置のスイッチを入れてQIAprep ストリップを洗浄する。

JM シリーズ、HB101 のような *endA*⁺ 株あるいはヌクレアーゼ活性あるいは炭水化物含量の高い野生株を用いた際に、ヌクレアーゼ活性を完全に除去するために本ステップが必要です。XL-1 Blue や DH5 α [™] のような宿主株ではこの洗浄ステップは必要ありません。

7. 吸引装置のスイッチを切る。各ウェルに1 ml のBuffer PE を添加後、吸引装置のスイッチを入れてQIAprep ストリップを洗浄する。もう一度繰り返す。

8. Buffer PE が全ウェルを通過後、さらに5 分間最大に吸引してメンブレンを乾燥させる。

重要；この遠心操作はメンブレンに残留しているBuffer PE を除去するために必要です。最大に吸引した時にのみ (例；vacuum regulator あるいはleak-age valve を使用している場合は切る) 最大の空気がウェルを通過し、この除去は効果的に行なわれます。

9. 吸引装置のスイッチを切り、QIAvac 6S を大気圧に戻す。Base からtop plate 全体を持ち上げて (top plate からQIAprep ストリップを取り外さない)、吸水性のある紙を重ねて、一滴も出なくなるまでこの上でtop plate を激しく叩く。QIAprep ストリップのノズルを吸水性のある紙で覆う。ステップ10a あるいは10b に続ける。

この遠心操作はQIAprep 8 ストリップの出口ノズルとその外筒に残留しているBuffer PE を除去するために必要です。Buffer PE 中の残存エタノールは酵素反応を阻害します。

- 10a. キットに入っているコレクション・マイクロチューブに溶出を行なう場合：

廃液トレイの代わりに青色のmicrotube rack (QIAvac 6S に付属、1.2 ml コレクション・マイクロチューブをセット) をセットする。top plate をbase の上に戻す。

コレクション・マイクロチューブはQIAprep 8 ストリップと同じ並びにする。

10b. 96 ウェル・マイクロプレートに溶出を行なう場合：

廃液トレイの代わりに青色の microtube rack (QIAvac 6S に付属) をセットし、ラックの上に 96 ウェル・マイクロプレートを直接置く。base に top plate を戻す。

- 11. DNA を溶出するために Buffer EB (10 mM Tris·Cl、pH 8.5)あるいは水 100 μ l を各 QIAprep ストリップの各ウェル中央にアプライし、1 分間放置した後、5 分間最大で吸引する。吸引スイッチを切り、QIAvac 6S をゆっくりと大気圧に戻す。溶出溶液を 75 μ l にすると DNA 濃度が増加します。**

プロトコール：QIAprep 96 Turbo Miniprep Kitを用いたプラスミドDNA精製

本プロトコールは、QIAvac 96でTurboFilter 96およびQIAprep 96プレートを用いたハイスルーブット・プラスミドDNAミニプレップ用にデザインされています。LB (Luria-Bertani) 培養液で一晩培養した*E. coli*培養液1～5 mlから最高20 µgまでの高コピープラスミドDNAを最高96サンプルまで同時に精製可能です。1.3 mlの一晩培養液を使用した場合、最高96個まで平底ブロックで培養可能です（英語版 Handbook 15ページのprotocol参照）。低コピープラスミドおよびコスミド、10 kb以上のプラスミド、他の方法を用いて調製したDNAの精製に関しては、英語版 Handbook 44ページをご覧ください。DNA精製の自動化に関しては弊社にお問い合わせください。

実験を始める前に英語版 Handbook 15～21ページの“Important Notes”をお読みください。

注意：プロトコールの全ステップは室温で行ないます。

操作手順

1. 250 µlのBuffer P1でバクテリア細胞ペレットを再懸濁し、キットに付属の平底ブロックに移す（細胞をこのブロックで回収しなかった場合）。

Buffer P1にRNase Aを加えたことを確認してください。ペレットの再懸濁後、細胞塊は見えなくなります。

2. 250 µlのBuffer P2を添加する。平底ブロックの上部をペーパータオルで拭き取り、ブロックを付属のテープでシールする。4～6回静かに転倒して完全に混和させ、室温で5分間インキュベートする。

ブロックを静かに転倒させて混和します。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。必要なら、溶液が粘稠になり少し透明になるまでブロックを転倒して混和します。

インキュベーション中にQIAvac 96を準備する（16と18～20ページ参照）：

- QIAvac top plateにTurboFilter 96プレートをセットし、プレートがしっかりとシールされていることを確認する。使用しないTurboFilter ウェルはテープでシールする。
- QIAvac baseの内側にplate holderをセットする。QIAprep 96プレートをplate holderに入れる。
- QIAvac 96 top plateをbaseの上にとしっかりと取り付ける。QIAprepプレートはTurboFilterプレートの下になっている。QIAvacを吸引装置に繋げる。

3. ブロックのテープを除去する。各サンプルに 350 μ l の Buffer N3 を添加し、平底ブロックの上部をペーパータオルで乾かし、新しいテープでシールする。4 ~ 6 回静かに転倒させる。

沈澱が局在化するのを避けるために、Buffer N3 の添加後、溶液を完全にしかし穏和に混和します。溶液は濁ります。

4. ブロックのテープを除去する。ステップ 3 のライセートをピペットで TurboFilter プレートのウェルに入れる (850 μ l / ウェル)。使用しない TurboFilter プレートのウェルはテープで塞ぐ。全サンプルが通過するまで吸引する。

最適な流速は 1 ~ 2 滴 / 秒です。3-way valve あるいは QIAvac と吸引装置の間の vacuum regulator (英語版 Handbook 48 ページ参照) で調節します。

5. 吸引装置のスイッチを切って、QIAvac 96 をゆっくりと大気圧に戻す。TurboFilter プレートを捨てる。清澄化ライセートを含んだ QIAprep プレートをマニフォールドの top plate に移す。使用しない QIAprep プレートのウェルはテープで塞ぐ。plate holder の代わりに廃液トレイを base にセットする。base の上に top plate をぴったりと載せ、QIAprep プレートがしっかりと装着していることを確認する。吸引する。

フロースルー液は廃液トレイに回収されます。

6. 推奨：吸引装置のスイッチを切る。各ウェルに 0.9 ml の Buffer PB を添加後、吸引装置のスイッチを入れて QIAprep プレートを洗浄する。

JM シリーズ、HB101 のような *endA*⁺ 株あるいはヌクレアーゼ活性あるいは炭水化物含量の高い野生株を用いた際に、ヌクレアーゼ活性を完全に除去するために本ステップが必要です。XL-1 Blue や DH5 α TM のような宿主株ではこの洗浄ステップは必要ありません。

7. 吸引装置のスイッチを切る。各ウェルに 0.9 ml の Buffer PE を添加後、吸引装置のスイッチを入れて QIAprep プレートを洗浄する。もう一度繰り返す。

8. Buffer PE が全ウェルを通過後、さらに 10 分間最大に吸引してメンブレンを乾燥させる。

重要：この遠心操作はメンブレンに残留している Buffer PE を除去するために必要です。最大に吸引した時にのみ (例 ; vacuum regulator あるいは leak-age valve を使用している場合は切る) 最大の空気がウェルを通過しこの除去は効果的に行なわれます。

9. 吸引装置のスイッチを切り、QIAvac 96 をゆっくりと大気圧に戻す。base から top plate 全体を持ち上げて (top plate から QIAprep プレートではない) 吸水性のある紙を重ねて、一滴も出なくなるまでこの上で top plate を激しく叩く。QIAprep プレートのノズルを吸水性のある紙で覆う。ステップ 10a あるいは 10b に続ける。

この遠心操作は QIAprep プレートの出口ノズルとその外筒に残留している Buffer PE を除去するために必要です。Buffer PE 中の残存エタノールは酵素反応を阻害します。

- 10a. キットに入っているコレクション・マイクロチューブに溶出を行なう場合：
廃液トレイの代わりに青色の microtube rack (1.2 ml コレクション・マイクロチューブをセット) をセットする。top plate を base の上に戻す。QIAprep プレートがしっかりシールされていることを確認する。
- 10b. 96 ウェル・マイクロプレートに溶出を行なう場合：
廃液トレイの代わりに青色の microtube rack (QIAvac 96 に付属) をセットし、ラックの上に 96 ウェル・マイクロプレートを直接置く。base に top plate を戻し、QIAprep プレートがしっかりセットされていることを確認する。
11. DNA を溶出するために Buffer EB (10 mM Tris·Cl、pH 8.5) あるいは水 100 μ l を QIAprep プレートの各ウェル中央にアプライし、1 分間放置した後、5 分間最大で吸引する。吸引スイッチを切り、QIAvac 96 をゆっくりと大気圧に戻す。溶出溶液を 75 μ l にすると DNA 濃度が増加します。

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

一般

低収量は様々な要因により生じる。各ステップで採取・保存した画分をアガロースゲルで解析して、原因を見つける（例；英語版 Handbook 43 ページ図 6）。少量の清澄化ライセートと全フロースルー画分の沈澱は、0.7 容量のイソプロパノールを添加して、最高速度で 30 分間遠心操作する（13,000 rpm あるいは約 17,000 x g）。0.1 容量の酢酸ナトリウム（3 M、pH 5.0）および 0.7 容量のイソプロパノールを添加して全洗浄フロースルー画分の沈澱を行なうことが可能。

カラムにロードする前の清澄化ライセートに DNA が存在しない

- a) プラスミドが増殖していない 英語版 Handbook 39 ~ 41 ページの “Growth of bacterial cultures” で最適な培養条件をチェックする。
- b) ライセートの調製が不適切 バッファの保存条件と製造月日をチェックする。
- c) Buffer P2 が沈澱 37 に温めて再溶解する。
- d) 細胞の再懸濁が不完全 ペレット細胞は Buffer P1 で完全に再懸濁させる。均一な懸濁液が得られるまで Buffer P2 を添加しない。

DNA が清澄化ライセートのフロースルー画分に存在

- a) QIAprep メンブレンにオーバーロード TB あるいは 2x YT のように富栄養な培養液では培養液量を減らす。プラスミドや宿主株が非常に高コピー数であったり発育速度が非常に早い場合、LB 培養液量を調節する必要がある。詳細は英語版 Handbook 41 ページの “Culture media” を参照。
- b) RNase A 分解を行なわれていない 使用前に RNase A を Buffer P1 に添加したことを確認する。
- c) RNase A 分解が十分でない 必要なら培養液量を減らす。RNase A の入った Buffer P1 が製造してから 6 ヶ月以上経っている場合には、さらに RNase A を追加する。

DNAが洗浄フローズルー画分中に存在

洗浄バッファーにエタノールが入っていない 正確に調製した洗浄バッファー（Buffer PE）で操作をもう一度行なう。

溶出液中にDNAが少ないあるいはない

- a) 溶出バッファーが適正でない DNAは低塩濃度バッファー（例；Buffer EB[10 mM Tris-Cl, pH 8.5]あるいは水）のみで溶出される。溶出効率はpHに依存する。pH 7.0から8.5の間で効率が最高になる。溶出に水を用いる際は、pH値がこの間にあることを確認する。
- b) メンブレンに溶出バッファーを正しくアプライしていない 溶出バッファーをQIAprepメンブレンの中央にアプライし、メンブレンの表面をバッファーが完全に覆うようにすると、最高の溶出効率が得られる。

DNA品質が低い

DNAを用いて行ったアプリケーションでうまく機能しない

- a) 溶出液の塩濃度が高すぎる QIAprep スピンカラムではBuffer PE 0.75 mlを添加して室温で5分間カラムをインキュベートするように洗浄ステップを改良し、その後遠心する。QIAprep 8、QIAprep 8/96 Turbo調製では溶出の前に洗浄ステップを行なったことを確認する。
- b) ヌクレアーゼのコンタミ JMシリーズ、HB101のような *endA*⁺株あるいは野生株を用いた際に、Buffer PBで洗浄ステップを行なったことを確認する。
- c) 溶出液にエタノールが残留 QIAprep Spin Miniprep プロトコールのステップ9、またはQIAprep 8 Miniprep、QIAprep 8 Turbo Miniprep、QIAprep 96 Turbo Miniprep プロトコールのステップ9および10を行なったことを確認する。

コメント

溶出液中に RNA

- | | |
|-----------------------|--|
| a) RNase A 分解が行われていない | 使用前に RNase A を Buffer P1 に添加したことを確認する。 |
| b) RNase A 分解が十分でない | 必要なら培養液量を減らす。RNase A の入った Buffer P1 を調製してから 6 ヶ月以上経っている場合には、さらに RNase A を追加する。 |

溶出液中にゲノム DNA

- | | |
|--------------------------|---|
| a) Buffer P2 を正しく添加していない | Buffer P2 を添加後はライセートを静かに取り扱い、DNA の切断を避ける。ライセートの粘性が高く静かに混和できない場合は培養液量を減らす。 |
| b) Buffer N3 を正しく添加していない | ステップ 3 で Buffer N3 を添加する際には迅速に、しかし静かに混和する。 |
| c) 溶解が長過ぎる | ステップ 2 の溶解は 5 分を超えない。 |
| d) 培養時間が長過ぎた | 培養時間が長過ぎると細胞が溶解し分解 DNA が生じる。12 ~ 16 時間以上培養しない。 |

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