

ATP™ Plasmid Mini Kit



Introduction

ATP™ Plasmid Mini Kit は、1～4 ml の細菌培養液からプラスミドまたはコスミド DNA を迅速、手軽かつ安価に単離するために設計されています。多量のプラスミドを精製する場合は、イオン交換を基盤とした Fast Ion Plasmid Midi/Maxi Kit の利用を推奨します。

本手順では、ゲノム DNA および RNA の混入を最小限に抑えたきれいな細胞溶解液を得るために、改良したアルカリ分解方法および RNase 処理が用いられています。

続いて溶解液は中和され、DNA の吸着に適した高塩濃度の結合状態に調節されます。カオトロピック塩の存在下において、溶解液中のプラスミド DNA はスピンカラム内に独自設計されたガラスファイバーマトリックスに結合します。

一方、RNA、細胞タンパク質、および他の不純物は、カラムを通過し簡単かつ確実に反応液から除去されます。エタノールを含む Wash Buffer による簡便な洗浄ステップにより、エンドヌクレアーゼ、塩および他の混入物を除去した後、低塩濃度の Elution Buffer または水により精製プラスミド DNA は溶出されます。

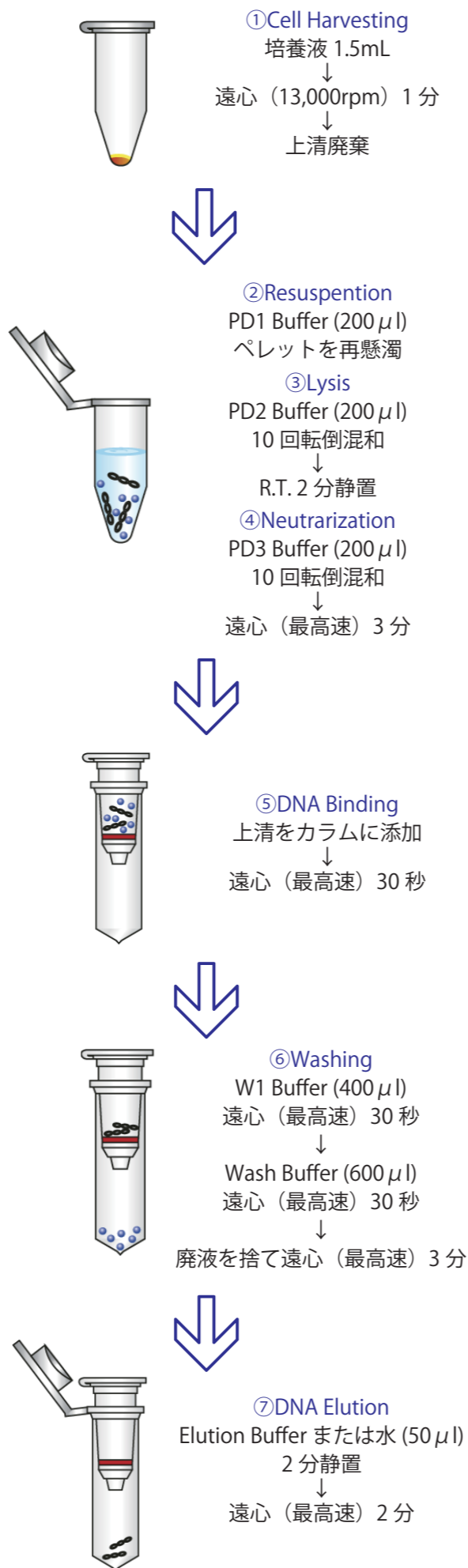
全ての手順は 20 分で完了することができます。

精製されたプラスミド DNA は直ちに制限酵素処理、ライゲーション、PCR、およびシーケンスに利用できます。

本手順において、DNA フェノール抽出およびアルコール沈殿の必要はありません。

◎品質管理

ATP™ Plasmid Mini Kit の品質はロットごとに検査されています。キットは、pBluescript を導入した E.Coli DH5α (A600 >2 units/ml) の培養液 4 ml からプラスミド DNA を単離することにより検査されます。分光光度計で定量化し、25μg 以上のプラスミド DNA が回収されることを確認しています。精製されたプラスミド DNA の 1 μg を使用して Eco RI で制限酵素処理し、切断した DNA をアガロースゲル分析により確認しています。



ATP™ Plasmid Midi/Maxi Kit



Introduction

ATP™ Plasmid Midi/Maxi Kit は、カラムに充填された陰イオン交換樹脂により 20～200ml/100～400ml の細菌培養液から、プラスミド DNA またはコスミド DNA を精製するために使用されます。

この過程において、ゲノム DNA および RNA の混入を最小限に抑えたきれいな細胞溶解液を得るために、改良したアルカリ分解方法および RNase 処理が用いられています。

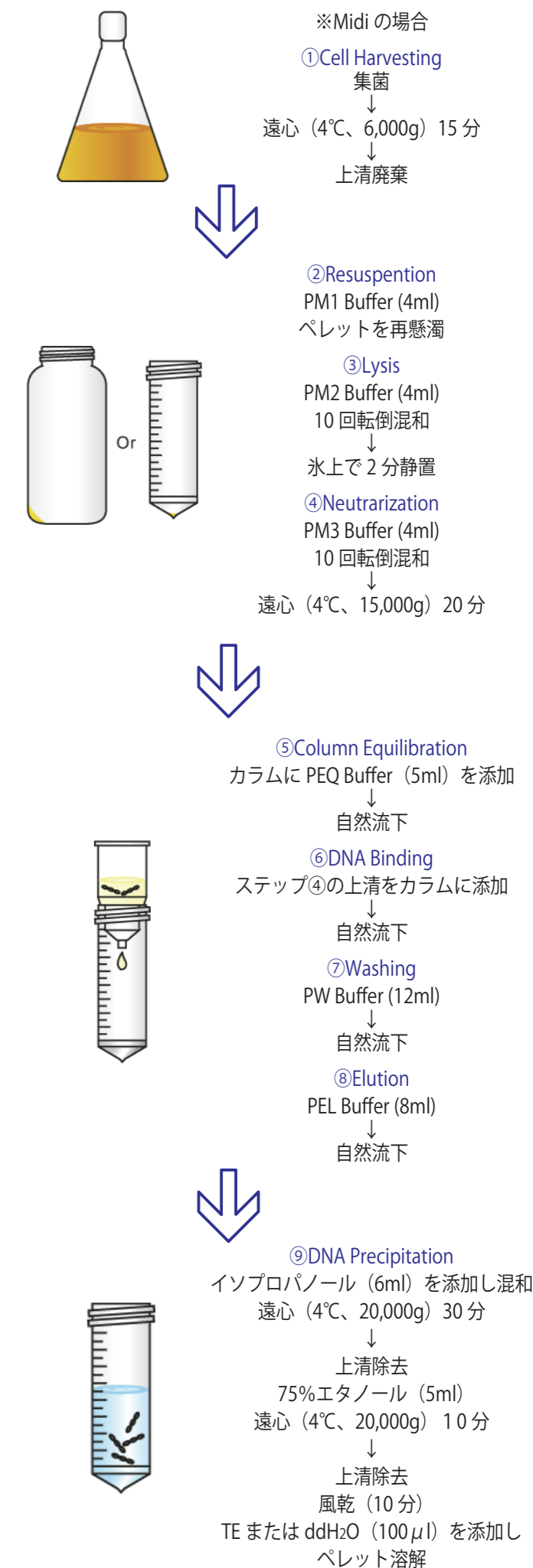
粗溶液中のプラスミド DNA は、自然流下により適切な塩濃度および pH 条件下で陰イオン交換樹脂に結合します。

最後に、高塩濃度の緩衝液により精製プラスミド DNA は溶出され、イソプロパノール沈殿により脱塩されます。

全ての手順は、超遠心、HPLC または有害な溶液を使用することなく 120 分で完了することができます。

◎品質管理

ATP™ Plasmid Midi/Maxi Kit の品質はロットごとに検査されています。キットは、pBluescript を導入した E.Coli DH5α (A600 >2 units/ml) の培養液 50 ml/100 ml からプラスミド DNA を単離することにより検査されます。分光光度計で定量化し、125/400μg 以上のプラスミド DNA が回収されることを確認しています。精製されたプラスミド DNA の 1 μg を使用して Eco RI で制限酵素処理し、切断した DNA をアガロースゲル分析により確認しています。



ATP™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit



Introduction

ATP™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit は、アガロースゲルおよび PCR または他の酵素反応溶液からの DNA 断片 (50bp ~ 10kb) を回収または濃縮するために設計されています。

この方法では、アガロースゲルを溶解および酵素を変性するためにカオトロピック塩 (チオシアン酸グアニジン) が使用されます。

カオトロピック塩中の DNA 断片は、緩衝液により最適化された塩濃度および pH 条件のもと、スピナカラム内に独自設計されたグラスファイバーマトリックスに結合します。

一方、塩、酵素、プライマー等結合していない塩基、ダイおよびエチジウムブロマイドのような他の不純物は、カラムを通過し簡単かつ確実に反応液から除去されます。

洗浄ステップの後、低塩濃度の Elution Buffer または水により精製 DNA 断片は溶出されます。

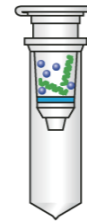
全ての手順において、DNA フェノール抽出およびアルコール沈殿の必要はなく、20分で完了することができます。

◎品質管理

ATP™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit の品質はロットごとに検査されています。DNA の回収効率、水溶液またはアガロースから様々な大きさの DNA 断片を単離することにより検査されます。精製された DNA はアガロースゲル分析により確認しています。

※PCR 産物精製の場合
①Sample Preparation
PCR 産物 (ex. 100 μl)
↓
DF Buffer を 5 倍量 (ex. 500 μl) 添加
ボルテックス

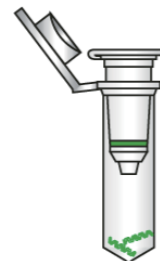
※ゲルからの DNA 断片精製の場合
①Gel Dissociation
ゲル切片 (300mg 以下)
↓
DF Buffer (500 μl)
ボルテックス
↓
60℃、10 ~ 15 分
インキュベート
2 ~ 3 分毎に転倒混和
↓
溶液を室温に戻す



②DNA Binding
カラムに添加
遠心 (13,000rpm) 30 秒



③Washing
Wash Buffer (600 μl)
遠心 (13,000rpm) 30 秒
↓
廃液を捨て遠心 (最高速) 3 分



④DNA Elution
Elution Buffer または
水 (15 ~ 50 μl)
2 分静置
↓
遠心 (最高速) 2 分

ATP™ Genomic DNA/Total RNA Mini Kit (Blood/Cultured cell)



Introduction

ATP™ Genomic DNA Mini Kit (Blood / Culture Cell) は、全血、血漿、血清、軟膜、他の体液、リンパ球、細菌および培養細胞からトータル DNA (ゲノム、ミトコンドリアおよびウイルス DNA を含む) を迅速かつ経済的に精製する方法を提供します。

本手順では、無核赤血球を除去し、ヘモグロビンの混入を少なくするため RBC Lysis Buffer が用いられます。この方法では、細胞およびタンパク質を分解するためにカオトロピック塩 (塩酸グアニジン) が使用され、対してカオトロピック塩中の DNA はカラム内のグラスファイバーマトリックスに結合します。

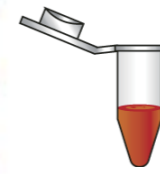
混入物を洗い流した後、低塩濃度の Elution Buffer または水により精製ゲノム DNA は溶出されます。

全ての手順において、フェノール/クロロホルム抽出およびアルコール沈殿の必要はなく、40分で完了することができます。

DNA の平均収量は、200 μl のヒト全血から最大 6 μg、200 μl の軟膜、5 × 10⁶ 個のリンパ球、または培養細胞からは 50 μg です。おおそ 20 ~ 30 kb の精製 DNA が PCR または他の酵素反応に適しています。

◎品質管理

ATP™ Genomic DNA Mini Kit (Blood / Culture Cell / Bacteria) の品質はロットごとに検査されています。キットは 200 μl のヒト全血からゲノム DNA を単離することにより検査されます。精製された DNA は分光光度計で定量され、ゲノム DNA の収量は 4 ~ 6 μg で A260/A280 の吸光度比は 1.6 ~ 1.8 です。

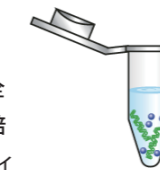


Genomic DNA

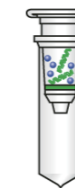
※血液サンプルの場合
①RBC Lysis
サンプルに 3 倍量の RBC Buffer を添加
転倒混和 (ボルテックスしない)
↓
R.T. 5 分インキュベート
↓
遠心 (3,000g) 2 分
↓
上清を廃棄
↓
RBC Buffer (100 μl)
ペレットを再懸濁



②Cell Lysis
GB Buffer (200 μl)
ボルテックス
↓
70℃、15 分インキュベート



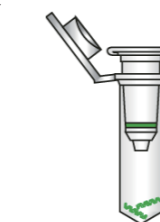
③DNA Binding
エタノール (200 μl) 添加
ボルテックス
↓
カラムに添加
遠心 (最高速) 3 分



④Washing
W1 Buffer (400 μl)
遠心 (最高速) 30 秒
↓
Wash Buffer (600 μl)
遠心 (最高速) 30 秒
↓
廃液を捨て遠心 (最高速) 3 分



⑤DNA Elution
Elution Buffer (100 μl)
3 ~ 5 分静置
↓
遠心 (最高速) 30 秒



Total RNA

※血液サンプルの場合
①RBC Lysis
サンプルに 3 倍量の RBC Buffer を添加
転倒混和 (ボルテックスしない)
↓
R.T. 5 分インキュベート
↓
遠心 (2,500rpm) 2 分
↓
上清を廃棄
↓
RBC Buffer (100 μl)
ペレットを再懸濁

②Cell Lysis
RB Buffer (400 μl)
ボルテックス
↓
R.T. 5 分インキュベート
↓
フィルターカラムに添加
遠心 (最高速) 2 分
↓
濾液を新しいチューブに移す

③RNA Binding
70%エタノール (400 μl) 添加
ボルテックス
↓
カラムに添加
遠心 (最高速) 2 分
※2 回繰り返す

④Washing
W1 Buffer (400 μl)
遠心 (最高速) 30 秒
↓
Wash Buffer (600 μl)
遠心 (最高速) 30 秒
↓
廃液を捨て遠心 (最高速) 3 分

⑤RNA Elution
RNase フリー水 (50 μl)
3 ~ 5 分静置
↓
遠心 (13,000rpm) 1 分