

Trouble shooting

분리된 Plasmid DNA양이 적을 경우

-너무 많은 박테리아를 사용한 경우

Lysis 부족으로 분리된 plasmid DNA 양이 적을 수 있습니다.

항생제가 포함된 배지에서는, 배양물을 A600=2~4로 배양하는 것이 좋습니다. 시료의 배양량이 많을 경우 배양량을 줄이는 것이 좋습니다. (low copy 플라스미드에서는 10 ml, high copy 플라스미드에서는 최대 5 ml)

-Low copy plasmid를 분리하는 경우

Copy 수가 적은 플라스미드 5 ml를 overnight culture하면 0.5 μ g정도를 얻을 수 있는데 가능하면 10 ml 또는 높은 copy 수의 플라스미드를 사용하는 것이 좋습니다.

- P1 buffer 사용시 박테리아 pellet이 충분히 현탁되지 않은 경우

박테리아 pellet은 P1 buffer에서 충분히 현탁되어야 합니다.

- P2 buffer의 침전

37 °C에서 buffer를 녹여줍니다.

-P4, P5 buffer에 ethanol을 첨가하지 않은 경우

P4, P5 buffer는 반드시 적당량의 volume이 absolute ethanol로 희석해주어야 합니다.

Chromosomal DNA contamination

-P2 buffer를 넣은 후 vortexing을 하거나 세게 흔들지 않습니다. 또한 P2 buffer를 넣은 후

lysis 시간은 5분 이상을 넘기지 않는 것이 좋으며, P3 buffer를 넣고 바로 섞어주는 것이 좋습니다.

제한효소 반응 저해

-Column을 air-drying(protocol 8번)스텝을 꼭 실행해야 합니다. Ethanol이 남아있을 경우

결과에 문제가 생길 수 있습니다.

HiQuant™ Plasmid Mini Prep Kit

Instruction Manual

Cat. No. HQP-200

For research use only

HiQuant™ Plasmid Mini Prep Kit Protocols

제품 소개

HiQuant™ Plasmid Mini Prep Kit는 박테리아 세포로부터 plasmid DNA를 쉽고 빠르게 추출할 수 있는 제품입니다. 짧은 시간 안에 plasmid DNA를 분리할 수 있으며 많은 종류의 샘플을 동시에 정제할 수 있습니다. 또한, PCR반응을 방해할 수 있는 단백질과 같은 오염물질을 제거하여 PCR의 효율성을 향상시키고, 얻어진 plasmid DNA는 제한효소처리 및 다양한 용도로 사용이 가능합니다.

제품 구성

구성 성분(Cat.HQP-200)	용량(200 preps)
Spin column	200
Collection tube	200
P1 Buffer	55 ml
P2 Buffer	55 ml
P3 Buffer	75 ml
P4 Buffer(option)	70 ml
P5 Buffer	43 ml
EB (Elution Buffer)	13 ml
RNase A	0.7 ml

실험 전 주의 사항

- 최초 사용 전에 제공된 RNase A 모든 용량을 P1 buffer에 첨가 후 4 °C에 보관합니다.
- 최초 사용 전에, 용기 라벨에 기재되어 있는 용량의 absolute ethanol을 P4와 P5 buffer에 첨가합니다.
- 모든 원심분리 과정은 마이크로 원심분리기의 최고 속도 (>10,000 x g 또는 10,000 ~ 14,000 rpm)로 실온에서 실시합니다.
- P2와 P3 buffer는 침전이 생길 수 있으니 사용하기 전에 흔들어서 완전하게 혼합시킵니다. 주변 온도가 낮을(겨울철) 경우 P2와 P3 buffer는 침전이 발생할 수 있습니다. 침전이 발생하면 60 °C water bath에서 녹여서 사용합니다.

실험 방법

1. 박테리아 배양액, 1~3 ml을 tabletop 원심분리기에서 10,000 x g 속도로 5분 동안 원심 분리하여 침전시킵니다. 상층액은 최대한 제거합니다.
2. RNase A가 첨가된 P1 buffer, 250 µl을 첨가하여 침전된 박테리아 pellet을 완전하게 현탁 시킵니다.
3. P2 buffer, 250 µl를 첨가하고, 튜브를 4회 이상 inverting해서 혼합시킵니다. (vortexing 금지)
4. P3 buffer 350 µl를 첨가하고, 바로 튜브를 4~6회 inverting하여 혼합시킵니다. (vortexing 금지)
5. 10분 동안 원심분리 합니다.
6. 주의해서 상층액을 spin column으로 옮기고 1분 동안 원심분리 합니다. Spin column을 제거하고 통과한 용액을 버립니다. Spin column을 collection 튜브에 다시 끼웁니다.
7. endA+ strains을 사용할 경우, 7A와 7B 과정을 계속 진행합니다. endA- strains을 사용할 경우 7C 과정을 실시합니다.

The genotype of various <i>E.coli</i> strains
EndA+ strains; BL21 (DE3), CJ236, HB101, JM83, JM101, JM110, LE392, MC1061, NM series, P2392, PR series, RR1, TB1, TG1, BMH71-18, EP1301, wildtype, etc.
EndA- strains; BJ5183, DH1, DH20, DH21, DH5α, JM103, JM105, JM106, JM107, JM108, JM109, MM294, SK1590, SRB, XL1-Blue, XLO, etc.

endA+ strains

- 7A. P4 buffer 500 µl를 처리하고 30초 동안 원심 분리합니다. Spin column을 제거하고, 통과한 액을 버립니다. Spin column을 collection 튜브에 다시 끼웁니다.
- 7B. P5 buffer 750 µl를 처리하고 1분 동안 원심 분리합니다. Spin column을 제거하고, 통과한 액을 버립니다. Spin column을 collection 튜브에 다시 끼웁니다. Protocol 8번을 실시합니다.

endA- strains

- 7C. P5 buffer 750 µl를 처리하고 1분 동안 원심 분리합니다. Spin column을 제거하고 통과한 액을 버립니다. Spin column을 collection 튜브에 다시 끼웁니다.
8. 통과한 액을 버리고, 잔여 wash buffer를 제거하기 위하여 추가로 2분 동안 원심 분리합니다. Spin column을 새 1.5 ml 튜브로 옮깁니다.
9. EB buffer나 증류수 50 µl를 첨가하고, 1분 동안 방치하고 2분 동안 원심 분리합니다.
10. 분리된 Plasmid DNA는 -20 °C 에서 보관합니다.