

1. ミニプレップ

注意；RNase を使用するので試薬、廃液をまき散らさないこと：RNA が取れなくなる。cDNA を多コピー含む大腸菌、プラスミドをまき散らさないこと：RT-PCR に重大な障害を起こします。チップはペットボトルケースに捨てて、終わったらケースごとポリ袋に入れて廃棄。廃液もすぐに処理する。

試薬の準備

溶液Ⅰ：100mM Tris (pH 7.5), 10mM EDTA, 400ug/ml RNase I

溶液Ⅱ：0.2M NaOH, 1%SDS

溶液Ⅲ：3M K/5M acetic acid (60ml 5M KAc+11.5ml acetic acid+28.5ml DW)

操作手順

1. 14-16 時間培養（適切な抗生物質を加える）した培養液 1.5ml をエッペンチューブに移し、15000rpm, 30 秒遠心
↓
2. 上清を除去し、200ul 溶液Ⅰを加え、ボルテックス
↓
3. 200ul 溶液Ⅱを加え、転倒混和。室温で 5 分放置（時間を正確に；ゲノムのコンタミが起こる）
↓
4. 200ul 溶液Ⅲを加え、転倒混和し。氷上で 5 分放置
↓
5. 室温で、15000rpm, 5 分遠心。上清を別のチューブに移す。
↓
6. 420ul (上清の 0.7 倍量)のイソプロパノール（室温）を加え、ボルテックス。室温 5 分放置
↓
7. 15000rpm, 10 分遠心。上清を除去し、チューブを逆さにして水分を除去
↓
8. 沈殿 DNA に 200ul TE buffer を加え、ボルテックスで溶解
↓
9. 200ul TE 飽和フェノールを加え、1 分間ボルテックスし、15000rpm, 5 分遠心
↓
10. 上清を別のチューブに移し、200ul CIA を加え、1 分間ボルテックスし、15000rpm, 5 分遠心
↓
11. 上清を別のチューブに移し、20ul 3M NaAc, 500ul EtOH を加え攪拌、-20C, 15 分
↓
12. 4C、15000 rpm, 15 分遠心。上清を除去し、1ml 70% EtOH でペレットを洗浄
↓
13. 2 分遠心、完全に EtOH を除去し、ペレットを風乾
↓
13. プラスミド DNA を 20ul TE buffer に溶解

2. 少容量でのプラスミドの増幅と精製 (DNA yield: 9-20ug) —Plasmid Mini Kit (QIAGEN)—

大腸菌の培養：

LB 培地 (3ml) に 1/1000 容量の amp ストック液を加える
コロニーをピペットチップの先端でピックアップし、14-16 時間培養

準備

Buffer P1 に RNase A solution を加える (添加後は 4C 保存)
Buffer P2 で SDS が沈殿していたら、37C に加温して溶解
Buffer P3 を氷冷

操作手順

1. 6000 rpm で 15 min 遠心し、培地を除去
↓
2. 0.3ml Buffer P1 を加え、菌体を懸濁
↓
3. 0.3ml Buffer P2 を加え、緩やかに混和 (4-6 回転倒)、**室温に正確に 5 分放置**
(ボトルのフタをすぐに閉めること)
↓
4. 氷冷した 0.3ml Buffer P3 を加え、緩やかに混和、5 分間氷冷
↓
5. 15000 rpm で 10 分遠心し、上清を別のチューブに移す
↓
6. QIAGEN-tip 20 カラムに 1ml Buffer QBT を添加し、自然落下させ、カラムを平衡化
↓
7. 4 の上清をカラムに添加し、自然落下
↓
8. カラムを 1ml Buffer QC で 4 回洗浄
↓
9. 0.8ml Buffer QF でプラスミド DNA を溶出
↓
10. 0.7 容量の室温イソプロパノール (0.56ml) を加え、即座に、15000 rpm で 30 分遠心
↓
11. 沈殿を 70%エタノールで洗浄し、5 分風乾。TE buffer 等に溶解

3. 中容量でのプラスミドの増幅と精製 (DNA yield: 20-100ug) —Plasmid Midi Kit (QIAGEN)—

大腸菌の培養：

LB 培地 (25ml) に 1/1000 容量の amp ストック液を加える
コロニーをピペットチップの先端でピックアップし、14-16 時間培養
6000 rpm で遠心し、培地を除去

準備

Buffer P1 に RNase A solution を加える (添加後は 4C 保存)
Buffer P2 で SDS が沈殿していたら、37C に加温して溶解
Buffer P3 を氷冷

操作手順

1. 6000 rpm で 15 min 遠心し、培地を除去
↓
2. 大腸菌ペレットを 4ml Buffer P1 に懸濁
↓
3. 4ml Buffer P2 を加え、緩やかに混和 (4-6 回転倒)、室温に正確に 5 分放置
(ボトルのフタをすぐに閉めること)
↓
4. 氷冷した 4ml Buffer P3 を加え、緩やかに混和 (4-6 回転倒)、15 分間氷冷
↓
5. 再度攪拌、12000 rpm, 4C で 30 分遠心し、上清を別のチューブに移す
↓
6. 再度、12000 rpm, 4C で 15 分遠心し、上清を別のチューブに移す
↓
7. QIAGEN-tip 100 カラムに 4ml Buffer QBT を添加し、自然落下させ、カラムを平衡化
↓
8. 6 の上清をカラムに添加し、自然落下
↓
9. カラムを 10ml Buffer QC で 2 回洗浄
↓
10. 5ml Buffer QF でプラスミド DNA を溶出
↓
11. 0.7 容量の室温イソプロパノール (3.5ml) を加え、15000 rpm, 4C で 30 分遠心
↓
10. 沈殿を 70%エタノール (2ml) で洗浄し、5 分風乾。TE buffer 等に溶解

