

アルカリ SDS 法による大腸菌からのプラスミド DNA の調整

- () 菌培養液を、1.5 ml エッペンチューブに移し、5000 rpm, 2 min 遠心分離
- () デカンテーションにて上清をすて、残りの培養液をピペットマンでとりのぞく
- () ペレットを 200 μ l の P 1 (50mM Tris-HCl・10mM EDTA (pH8.0) : 10 mg/ml RNase) で懸濁する (ボルテックスを使って完全に懸濁する)
- () P 2 (0.2M NaOH・1% SDS) を 200 μ l 加え、ゆっくりチューブを逆さまにする操作を繰り返し、透明な溶菌液が得られるまで続ける
- () 2.5M KOAc 溶液を 200 μ l 加え、沈澱が粘性を失うまでよく混ぜる
- () 13000 rpm、10min 遠心分離を行い、上清をピペットマンで丁寧に回収する
(白い沈澱物が混ざらないように注意して、400 μ l を目安に回収)
- () DNA 抽出カラムをセットし、回収した上清を流し込む
- () 10000 rpm、1 min 遠心分離を行いカラム通過した溶液を捨てる
- () PE buffer を、500 μ l カラムに流し込む
- () 10000 rpm、1 min 遠心分離を行いカラム通過した溶液を捨てる
(カラム内部に PE buffer が残っていないか確かめる、残っていた場合はもう一度遠心分離を行うか、P20 のピペットマンで取り除く)
- () カラムを新しい、1.5 ml エッペンチューブにセットした後、30 μ l の蒸留水をカラムに流し込む
- () 10000 rpm、1 min 遠心分離を行い通過した溶液がプラスミド溶液となる
- () 抽出した plasmid 溶液から 5 μ l とて、制限酵素液と懸濁して 37 °C で処理(一晩)