

1. Midi Prep (Promega #A2492 PureYield Plasmid Midiprep System ; 期待収量 100~200 µg)

遺伝子発現実験等のプラスミド調製の際に用いる。

日本語簡易プロトコール http://www.promega.co.jp/pdf/lit/PureYield_Midi_eprot_v.pdf

1-1. 培養

三角フラスコに抗生剤入り LB 培地 100 mL を入れ、グリセロールストックよりイノキュレーショングループでかき取った大腸菌を入れる。

(☞ 大腸菌の増殖が悪い場合には、グリセロールストックを抗生剤入り LB 培地 2 mL にてあらかじめ 5~8 時間程度培養した後に、100 mL の LB 培地に添加する。)

(☞ プラスミドの収量に応じて 50~250 mL のスケールにて培養する。)

(☞ 200 mL 以上の培養スケールの場合には、下記の Cell Resuspension Solution、Cell Lysis Solution、Neutralization Solution がそれぞれ 6、6、10 mL となるので注意すること。)

→ 37 °C にて培養する (Overnight 16 ~ 21 hr)。

1-2. Midi Prep

【大腸菌抽出液の調製】

培養液を 200 mL チューブ (TOMY SRX-201 Rotor #TA-13 用) に回収する。

→ 5,000 g (5,650 rpm) (TOMY SRX-201 Rotor #TA-13) × 10 min

→ デカンテーションで上清を捨てる。

→ 3 mL の Cell Resuspension Solution を加え、Vortex あるいはピペッティングにて十分に懸濁する。

(☞ ここまでの操作に用いた実験器具と廃液は、オートクレーブ処理後に処分、あるいは洗浄する。)

→ 懸濁した大腸菌溶液を、50 mL チューブ (Himac CR22E Rotor #28 用) に移す。

→ 3 mL の Cell Lysis Solution を加え、3~5 回程度、転倒混和する。(☞ Vortex は使わないこと。)

→ 室温にて 3 min 静置する。

→ 5 mL の Neutralization Solution を加え、5~10 回程度、転倒混和する。(☞ Vortex は使わないこと。)

→ 15,000 g (10,800 rpm) (Himac CR22E Rotor #28) × 15 min (室温)

→ 50 mL の遠心チューブに Clearing Column (青色) を挿入する。

→ 上清 (大腸菌抽出液) を Clearing Column に注ぎ、2 min 静置する。

→ 1,500 g (3,000 rpm) (Hitachi Centrifuge 03P Swing rotor) × 5 min (室温)

(☞ 大腸菌抽出液が Clearing Column 上に残っていれば、再度遠心を繰り返す。)

【カラムへの吸着】

→ 新しい 50 mL 遠心チューブに Binding Column (白色) を挿入する。

→ 大腸菌抽出液を Binding Column へ注ぐ。

→ 1,500 g (3,000 rpm) × 3 min (室温) → Flow-through を捨てる。

【カラムの洗浄】

→ 5 mL の Endotoxin Removal Wash (イソプロパノール添加剤) を Binding Column に加える。

- 1,500 g (3,000 rpm) × 3 min (室温) → Flow-throughを捨てる。
- 20 mL の Column Wash Solution (エタノール添加済) をBinding Column に加える。
- 1,500 g (3,000 rpm) × 3 min (室温) → Flow-throughを捨てる。
- 1,500 g (3,000 rpm) × 10 min (室温) → Flow-throughを捨てる。
(☞ メンブレン上に残っている Column Wash Solution を完全に取り除く。)

【遠心による溶出】

- Binding Column を新しい 50 mL の遠心チューブにセットする。
- 600 μ Lの Nuclease-Free Waterを、メンブレンにしみ込ませるように加える。
- 1 min 静置させる。
- 1,500 g (3,000 rpm) × 5 min (室温)
(☞ 約 400 μ Lが溶出される。)
(☞ 10 kb 以上の長鎖プラスミドを溶出させる場合は、あらかじめ65°Cに加熱した Nuclease-Free Water を用いることでメンブレンから核酸の解離を促進することができる。)
- カラムを捨て、溶出液中の DNA を定量する。

ロータの半径、回転数、遠心力の算出方法は、下記サイトを参照のこと。

<http://www.kubotacorp.co.jp/calc/>

2. Maxi Prep (Viogene #GMV2002 Maxi Plus Ultrapure Plasmid Extraction System ; 期待収量 500 µg 以上)

遺伝子発現実験等のプラスミド調製の際に用いる。

オリジナルプロトコール http://www.viogene.com/product_pic/20120215154813GDVGMV.pdf

2-1. 培養

三角フラスコに抗生剤入り LB 培地 200 mL を入れ、グリセロールストックよりイノキュレーショングループでかき取った大腸菌を入れる。

(☞ 大腸菌の増殖が悪い場合には、グリセロールストックを抗生剤入り LB 培地 2 mL にてあらかじめ 5~8 時間程度培養した後に、200 mL の LB 培地に添加する。)

(☞ プラスミドの収量に応じて 100~500 mL のスケールにて培養する。)

→ 37 °C にて培養する (Overnight 12 ~ 16 hr)。

2-2. Maxi Prep

【大腸菌抽出液の調製】

培養液を 200 mL チューブ (TOMY SRX-201 Rotor #TA-13 用) に (必要があれば分注して) 回収する。

→ 6,000 g (6,190 rpm) (TOMY SRX-201 Rotor #TA-13) × 15 min

→ デカンテーションで上清を捨てる。

→ 10 mL の VP1 Buffer を加え、Vortex あるいはピペッティングにて十分に懸濁する。

(☞ ここまでの操作に用いた実験器具と廃液は、オートクレーブ処理後に処分、あるいは洗浄する。)

→ 懸濁した大腸菌溶液を、50 mL チューブ (Himac CR22E Rotor #28 用) に移す。

→ 10 mL の VP2 Buffer を加え、6~8 回程度、転倒混和する。(☞ Vortex は使わないこと。)

→ 室温にて 5 min 静置する。

→ 10 mL の氷冷した VP3 Buffer を加え、6~8 回程度、転倒混和する。(☞ Vortex は使わないこと。)

→ 20,000 g (12,500 rpm) (Himac CR22E Rotor #28) × 15 min (4°C)

【カラムの平衡化と吸着】

→ 50mL 遠心チューブに Maxi-V500 Column をセットする。(☞ 青色のアダプターをつける。)

→ 5 mL の 99.5% EtOH を加えてカラムを平衡化する。→ Flow-through を捨てる。

→ 10 mL の VPN Buffer を加えてカラムを平衡化する。→ Flow-through を捨てる。

→ 大腸菌抽出液 (上清) を Maxi-V500 Column へ加える。→ Flow-through を捨てる。

【カラムの洗浄と溶出】

→ 30 mL の VPN Buffer を加えてカラムを洗浄する。→ Flow-through を捨てる。

(☞ 培養スケールが 200 mL 以上だった場合は、さらに 15 mL の VPN Buffer にて洗浄する。)

→ Maxi-V500 Column を新しい 50mL の遠心チューブにセットする。

→ 10 mL の VPE Buffer を加えて DNA をカラムから溶出する。

→ 溶出した DNA 溶液を新しい 50 mL チューブ (Himac CR22E Rotor #28 用) に移す。

→ 7 mL の Isopropanol (室温) を加えて 6~8 回程度、転倒混和する。。

→ 15,000 g (10,800 rpm) (Himac CR22E Rotor #28) × 30 min (4°C)

→ 上清を注意深く捨てる。(☞ DNA の沈殿が滑りやすいので特に注意すること。)

→ 10 mL の 70% EtOH (室温) を加える。

→ 15,000 g (10,800 rpm) (Himac CR22E Rotor #28) × 10 min (4°C)

- 上清を注意深く捨てる。(☞ DNAの沈殿が滑りやすいので特に注意すること。)
- 10 min 程度、風乾した後に、250 μL のTEに溶解する。