

Plasmid Mini Prep

2017.11 ver.2

by Goto, Takeda & Tanimura

1. 簡易法

プラスミドベクター内に目的のインサートが組み込まれているかを確認する際に用いる。

1-1. 試薬の調製

Sol I (4 °C 保存)	stock	
50 mM Glucose		0.9 g
25 mM Tris-HCl (pH 8.0)	1 M	2.5 mL
10 mM EDTA	0.5 M	2.0 mL
100 µg/mL RNase A*	100 mg/mL	100 µL
Milli-Q H ₂ O		up to 100 mL

*RNase A (Sigma #R4875-100MG) : Milli-Q H₂O 1 mL に溶解し、100 µL ずつ分注して凍結保存。

Sol II (用時調製：使用前まで室温に置く)	stock	
0.2 N NaOH	5 N	40 µL
1% SDS	10%	100 µL
Milli-Q H ₂ O		up to 1 mL

Sol III (4 °C 保存)		
3 M 酢酸カリウム		29.5 g
酢酸		11.5 mL
Milli-Q H ₂ O		up to 100 mL

1-2. 培養

培養チューブ (Eiken) に抗生剤入り LB 培地 2 mL を入れ、そこに爪楊枝でかき取った大腸菌コロニーを入れる。

→ 37 °C にて振とう培養 (overnight)

☞ 通常、Ampicillin: 50 µg/mL (Stock 100 mg/mL), Kanamycin: 10 µg/mL (Stock 50 mg/mL)

1-3. Mini Prep

培養チューブから 1.5 mL チューブに培養液 1 mL を移す。

→ 3,000 rpm × 3 min

→ デカンテーションで上清を捨てる。

→ 100 µL の Sol I を加え、Vortex または Micro Tube Mixer にて十分に懸濁する。

→ 200 µL の Sol II を加え、6 ~ 8 回程度、転倒混和する。(☞ Vortex は使わないこと。)

→ On ice 3 min

- 150 μ L の Sol III を加え、6 ～ 8 回程度、転倒混和する。(☞ Vortex は使わないこと。)
- On ice 3 min
- 15,000 rpm $\times$ 10 min
- 上清を新しい 1.5 mL チューブに移す。
- 回収した溶液と等量 (400 μ L 程度) のイソプロパノールを加え、やや激しく転倒混和する。
- RT 2 min
- 15,000 rpm $\times$ 10 min
- ペレットを乱さないよう上清を取り除く。
- 70% EtOH 1mL を静かに加える。
- 15,000 rpm $\times$ 1 min
- ペレットを乱さないよう EtOH を取り除く。
- Dry up (チューブを逆さにして静置。)
- TE 50 μ L に溶解。 (☞ 定量する必要はない。)

1-4. 制限酵素消化によるチェック

- | | | |
|---|---------------------------|--------------------|
| { | Mini Prep 産物 | 2.0~3.0 μ L |
| | 10 $\times$ buffer (適宜設定) | 1.5 μ L |
| | 制限酵素 I (適宜設定) | 0.2 μ L |
| | 制限酵素 II (適宜設定) | 0.2 μ L |
| | Milli-Q H ₂ O | up to 15.0 μ L |
- 37 $^{\circ}$ C $\times$ 1 hr
 - 電気泳動にてチェック

2. カラム法

シーケンシング用のプラスミド調製の際に用いる。

< Viogene #GF2002 Mini Plus Plasmid DNA Extraction System を使用 >

2-1. 培養

培養チューブ (Eiken) に抗生剤入り LB 培地 2 mL を入れ、そこに爪楊枝でかき取った大腸菌コロニーを入れる。

→ 37 °C にて振とう培養 (overnight)

2-2. Mini Prep

培養チューブから 1.5 mL チューブに培養液 1.2 mL を移す。

→ 3,000 rpm × 3 min

→ デカンテーションで上清を捨てる。

→ 200 µL の MX1 Buffer を加え、Vortex または Micro Tube Mixer にて十分に懸濁する。

→ 250 µL の MX2 Buffer を加え、6 ～ 8 回程度、転倒混和する。(☞ Vortex は使わないこと。)

→ RT 2 ～ 5 min

→ 350 µL の MX3 Buffer を加え、6 ～ 8 回程度、転倒混和する。(☞ Vortex は使わないこと。)

→ 15,000 rpm × 10 min

→ 上清をカラムへ加える。

→ 7,000 x g (≈ 9,000 rpm) × 1 min → Flow-through を捨てる。

→ 500 µL の WN Buffer をカラムへ加える。

→ 7,000 x g (≈ 9,000 rpm) × 1 min → Flow-through を捨てる。

→ 700 µL の WS Buffer をカラムへ加える。

→ 7,000 x g (≈ 9,000 rpm) × 1 min → Flow-through を捨てる。

→ 10,000 x g (≈ 13,000 rpm) × 3 min

→ 新しいチューブに替え、Elution Buffer 25 µL をカラムの中心部に、ピペットチップがメンブレンに触れないように注意しながらアプライする。

→ RT 2 min

→ 10,000 x g (≈ 13,000 rpm) × 3 min

→ カラムを捨て、溶出液中の DNA を定量する。