

Mid-Scale Plasmid prep (PEG ppt. method) by A. Watakabe

10/2/02

○ 試薬の準備

Solution I (常温保存)

| | |
|-----------------------|-----------------------------|
| 50 mM Glucose | 1.8 g |
| 25 mM Tris.HCl(pH8.0) | 5 ml (1M stock solution) |
| 10 mM EDTA (pH 8.0) | 4 ml (0.5 M stock solution) |

MiliQ 水を加えて 200 ml にし、オートクレーブする。

Solution II (直前に作る)

| | |
|------------|-------------|
| 0.2 N NaOH | 1 ml (10 N) |
| 1 % SDS | 5 ml (10 %) |

MiliQ 水を加えて 50 ml にする。

Solution III (常温保存)

| | |
|----------------------------|--------|
| 酢酸カリウム (potassium acetate) | 58.9 g |
| 氷酢酸 (glacial acetic acid) | 23 ml |

まず MiliQ 水で酢酸カリウムを溶かし、その後氷酢酸を加え、最後に MiliQ 水を加えて 200 ml にする。

PEG solution

| |
|---------------|
| 2.5 M NaCl |
| 20 % PEG 6000 |

その他の試薬

8 M LiCl

TE 10 mM Tris · HCl(pH8.0)、1 mM EDTA

3M NaOAc 3M 酢酸ナトリウム (氷酢酸で pH を 7 に合わせる)

フェノールクロロホルム

フェノール (TE 飽和 pH8.0) とクロロホルムを等量混和。

75% エタノール

エタノール

○ 前夜の準備

大腸菌をふやす。

LB 培地 50~100 ml に Ampicilin(100 mg/ml)を 1/2000 加える (final 50 ug/ml)。

爪楊枝で大腸菌をつついて培地に入れ 37℃オーバーナイト。

○ 当日の準備

Soution II を作成する。

Soution III を氷で冷やす。

遠心機を冷却しておく。

○ プロトコル

・集菌 Beckman Avanti J-25I を使用。250 ml のポリプロピレンチューブを使う。

5000 rpm 8 分間 遠心。上澄みを捨てる。

・ Solution I 1 ml にサスペンド。だまがなくなるまで。ボルテックスとピペッティングで。サスペンド後 15 ml のチューブに移す。

*ここで、凍らせて保存しておいて良い。

・ Solution II 2 ml を加え、すぐによく混和し、室温で 5 分置く。

*透明感が出てくる。

*かたまりができないように。

*激しく振ってはいけない。

・ Solution III 1.5 ml を加え、よく混和し、氷上に 20 分静置する。

*SDS とカリウムのもやもや固形物が析出する。

ここで凍らせても良い。

・ 3000 回転で遠心（低速遠心機）20 分。

・ 新しい 15 ml チューブを用意し、イソプロパノールを 4 ml ずつ分注しておく。

・ 上澄み液をチューブに移し混ぜる。

・ 室温放置 15 分以上。

・ 3000 回転で遠心（低速遠心機）20 分。

・ デカントで上澄みを捨てる。

・ 75%エタノール 500 ul にペレット（沈殿）をサスペンドし、1.5 ml チューブに移す。

- ・遠心 14000 回転 2 分。
- ・上澄みを捨てる。

- ・ 400 ul TE にペレットをサスペンドし、氷上に置く。
- ・ 400 ul のフェノールクロロホルムを加え、よく混ぜる。
- ・ 遠心 14000 回転 5 分。

この間に新しいチューブに 200 ul 8M LiCl を分注しておく。

- ・ 中間層を吸わないように、上層を移す。
- ・ 良く混和した後、すぐに遠心 15000 rpm 5 分 （高分子 RNA を除去）
- ・ 上澄み+600 ul イソプロパノール
- ・ 混和後、遠心 14000 回転 2 分。
- ・ 上澄みを捨てる。

#LiCl 沈殿のステップをやらないと最後に RNA が混入してくる事がある。

○ PEG 精製

***RNase を扱ったチップや、RNase を含む廃液は、専用の容器に捨てること。

- ・ ペレットを 400 ul TE に溶かす。
- ・ 100XRNaseA (2 mg/ml)を 4 ul 加える。
- ・ 37℃保温 30 分。

- ・ 氷冷した PEG solution を 400 ul 加え、よく混ぜる。
- ・ すぐに遠心 14000 回転 5 分。

- ・ 上澄みを捨てる。
- ・ もう一度遠心して、上澄みを完全に除く。
- ・ 75 %エタノール 500 ul 加えてリンスする。
- ・ 上澄みを捨てる。

#ペレットは壁に広がって見えにくい時がある。リンスの時に白く濁るのでそれが壁に張り付いていればよくサスペンドして遠心で落とすこと。

- ・ペレットを 400 ul TE に溶かす。
- ・400 ul のフェノールクロロホルムを加え、よく混ぜる。
- ・遠心 14000 回転 5 分。

この間に新しいチューブに 400 ul のフェノールクロロホルムを分注しておく。

- ・上層を移してよく混ぜ、遠心 14000 回転 5 分。

この間に新しいチューブに 400 ul のクロロホルムを分注しておく。

- ・上層を移してよく混ぜ、遠心 14000 回転 5 分。

この間に新しいチューブに 40 ul 3M NaOAc, 800 ul エタノールを分注しておく。

- ・上層移してよく混ぜ、遠心 14000 回転 2 分。
- ・上澄みを捨てる。
- ・75 %エタノール 500 ul 加えてリンスする。
- ・上澄みを捨てる。
- ・もう一度遠心して、上澄みを完全に除く。

- ・風乾もしくは真空乾燥で、ペレットを乾かす。

・ペレットを 200 ul TE に溶かし、吸光度を測定し TE を加えて 1 ug/ul に合わせる。たくさん取れているとなかなか溶けないのでよく溶かすこと。

○ 吸光度の測定方法。

Beckman の DU640

UV ランプをつけて安定化させておく（使用の 10～30 分くらい前）

DNA 溶液を 200 分の 1 に薄める（2ul DNA+398 ul TE）

100 ul の TE をキュベットに入れてブランクを測定。

100 ul のサンプルをキュベットに入れて 260 nm の吸光度 (OD260) を測定。
OD260 が 0.1 以下、もしくは 1 以上ならば薄めなおして再測定。

計算方法

$$\begin{aligned} \text{元の溶液の DNA 濃度} &= \text{OD260} \times 0.05 \text{ (ug/ul)} \times 200 \\ &= \text{OD260} \times 10 \text{ ug/ul} \end{aligned}$$

例) OD260 が 0.15 ならば、元の溶液は 1.5ug/ul。