

■ DNA シーケンス用のプラスミド抽出の方法

各社より市販されているプラスミド精製キットを用いれば確実ですが、以下の方法で精製したプラスミドを用いても各ステップを丁寧に行えば 500b~700b まで読めています(クラボウ自動 DNA 抽出装置と同程度の精製)。

- 1) LB 培地 2ml (Low コピーのプラスミドの場合 5~10ml) で大腸菌を終夜培養。
- 2) 1.5ml をエッペンドルフチューブ(10ml 遠心用チューブ) へ移し、集菌(10,000 rpm、4°C、5 分)。上清を完全に除去し、氷中へ置く。
- 3) 大腸菌(沈殿)に TE/RNase バッファー 200µl (1ml) を加えてボルテックスで懸濁。
- 4) Sol 2, 200µl (1ml) を添加し、転倒混和を 10 回行い室温で 5 分静置 (Total 5 分、変性)。
- 5) 更に、Sol 3, 200µl (1ml) を添加し転倒混和を 10 回行い、氷中で 5 分以上静置 (中和)。
- 6) 15,000 rpm、4°C、5 分間遠心し、上清を新しい 1.5 ml エッペンドルフチューブに移す。
(白い沈殿物が入らないように注意する)
- 7) 移した上清にフェノール・クロロホルム 500µl を加え、転倒混和 3 分。
- 8) 15,000 rpm、4°C、5 分間遠心し、下層のフェノール層を除去する(少し残っても構わない)。
- 9) そこにクロロホルム 500µl を加え、転倒混和 3 分。
- 10) 15,000 rpm、4°C、5 分間遠心し、上清を新しい 1.5 ml エッペンドルフチューブへ移す(中間層を取らないように注意)。
- 11) 等量のイソプロパノールを加え十分に攪拌後、室温 30 分静置後、15,000 rpm、4°C、20 分間遠心し、上清を廃棄する。
- 12) 沈殿の DNA に 500µl の 70% エタノールを加え、15,000rpm、4°C、5 分間遠心し、上清をできるだけ除去し、風乾 2 分。乾燥しすぎないように注意する。
- 13) 沈殿の DNA に 20µl の dH₂O (TE) を入れ、氷中 2 分静置後タッピングで溶解する
- 14) DNA を 1µl *1 電気泳動し、DNA マーカー(サイズだけではなく、濃度も分かるマーカー) のバンドと比較しておおよその濃度を算出する *2。吸光度(OD260) の測定もする。
- 15) シーケンス用プロトコールに従い、シーケンス反応を行う。

「注意点」

*1 大腸菌の中でコピー数の少ない(pBR322 系) プラスミドの場合は 2µl 電気泳動して下さい。

*2 吸光度 OD260 は、染色体の残骸や RNA も入ってきますので過剰に加味されます。きれいな DNA だとアガロースゲル電気泳動の値と吸光度計の結果はほぼ同じです。

試薬リスト

TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA-Na₂, pH 8.0

TE/RNase: TE containing 2 U/ml RNase

Sol 2: 0.2 M NaOH, 1 % SDS

Sol 3: 3M KOAc, pH 4.8

フェノール・クロロホルム: TE で飽和させたフェノール:クロロホルム=1:1 で mix
クロロホルム