

Kerolab Midi-Prep Protocol

2011/10/19 modified

(Solutions: Qiagen社のP1-P3を用いても良い) P1: 50 mM Tris-Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA P2: 200 mM NaOH, 1% SDS P3: 3M Potassium Acetate, pH 5.5	(PEG溶液) 要オートクレーブ ポリエチレングリコール 65 g 塩化ナトリウム 23.4 g miliQ 416.6 ml
---	--

☐01. 50 mlスケールで大腸菌を培養し、遠沈管で遠心して沈殿だけにする

☐02. 3 ml のP1に懸濁する

☐03. 10 µlの10 mg/mlのRNaseAを加えてよく混ぜる
*QiagenのP1を用いる際はRNaseが含まれているので省略できる

☐04. P2を3 ml加えて、優しく混ぜる

☐05. 5分間室温に置く

☐06. P3を3 ml加えて、優しく混ぜる (計9 ml)

☐07. 20分間室温に置く (RNAの十分な分解に必要)

☐08. 6000 rpm, 10 min

☐09. デブリが入らないように水相だけを別の遠沈管に移す

☐10. 1 mlの5M NaClを加えてよく混ぜる

☐11. フェノール/クロロホルム(DNA用)を10 ml加えてVortex

☐12. 5 min静置後、6000 rpm, 5 min

☐13. 水相を0.8 mlずつ1.5 mlチューブに分抽していく (8~9本)

☐14. 各チューブに0.6 mlのイソプロパノールを加えてVortex

☐15. 13000 rpm, 10 min
*得られる沈殿は目的のDNAの他にバラバラのRNA, dNTP, NTPsが含まれる

☐16. 70% EtOH wash

☐17. 沈殿をmiliQに溶解させ、1本にまとめる(計500 µlになるように)
*コンストラクト作成用などであれば、この時点で保存しても良い

☐18. 500 µlのPEG溶液(組成上述)を加えてVortex

☐19. 13000 rpm, 10 min
*沈殿は透明でドロツとしている (エタ沈のものとは全く違う)
*100 bp以下は殆ど沈殿しないので、DNAだけとなる

☐20. 上清を捨て、1 mlの70% EtOHを用いて沈殿をwashする

☐21. 100 µlのmiliQに溶解する
*ちゃんとやれば、最低でもtotal 50 µg程度は得られる (最大500 µg程度)