

QIAGEN -Midi (up to 100 µg) Plasmid Purification

(by R.Kawai-Hirai)

0. 1サンプル当たり3本の10 ml遠心管をオートクレーブしておく。
1. Terrific Broth 5 mlで培養。
2. デカンテーションで、10 ml遠心管に移す。(5,000 rpm, 10 min, 4°C)
buffer P1 を室温に、buffer P3 を氷冷しておく。
3. 沈殿を3 ml buffer P1(Rnase+、ディスプレイペット使用)で分散(室温)。
4. 3 ml buffer P2を加え、静かに混合。 室温で5 min 静置。
5. 3 ml buffer P3を加え、静かに混合。 on iceで15 min 静置。
6. 20,000 g, 30 min, 4°C.
7. パスツールピペットで注意深く上清を取り、
上清のみ 20,000 g, 15 min, 4°C。
buffer QF (溶離バッファー) を50°Cに温める。
8. 4 ml buffer QBT をカラムに自然流下。
9. 上清をカラムに自然流下。
10. 10 ml buffer QC をカラムに自然流下。
11. 10 ml buffer QC をカラムに自然流下。
12. 5 ml buffer QF (50°C) をカラムに自然流下。
遠心管にplasmid溶液を受ける。
13. 3.5 ml iso-PrOHを加え、15,000 g, 30 min, 4°C
14. 2 ml 70% EtOHでwash。
15. 減圧乾燥。
16. 50 µl TE (またはdW) でサンプルを溶解, -20°Cで保存。
このうち1 µlをdWで希釈(30 - 100倍)して、核酸濃度を算出。