

QIAGEN -Mini (up to 20 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. LB 3 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 0.3 ml buffer P1(Rnase+、ディスポピペット使用)で分散(室温)。
4. 0.3 ml buffer P2を加え、静かに混合。 室温で5 min 静置。
5. 0.3 ml cold buffer P3を加え、静かに混合。 on iceで10 min 静置。
6. 15,000 rpm, 15 min, 4°C.
7. パスツールピペットで注意深く上清を取り、
上清が濁っている場合 15,000 rpm, 10 min, 4°C。
(buffer QF (溶離バッファ)を50°Cに温める。)
8. 1 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. 1 ml buffer QC をカラムに自然流下。
11. さらに3回 1 ml buffer QC をカラムに自然流下。
12. 0.8 ml buffer QF (50°C) をカラムに自然流下。
エッペンチューブにplasmid溶液を受ける。
13. 560 µl iso-PrOHを加え、15,000 rpm, 30 min, 4°C
14. 1 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(10 - 50倍)して、核酸濃度を算出。