

プラスミド抽出

大腸菌などの菌体を溶解し、プラスミドDNAを抽出する方法で、精製度は高くないが操作が簡便な抽出方法である。プラスミドや菌株にもよるが、培養液数1-2mLで数百ナノグラムスケールのプラスミドDNAが得られる。

1. プレートからコロニーを拾って、液体培地で一晚培養
2. 培養液をチューブに移して遠心して回収。(1min at 4°C 15,000rpm)
3. 0.2mLのSolIを加え、ボルテックスで分散。
4. 0.4mLのSolIIを加え、軽く浸透して氷上でインキュベート。
(5minくらいたっても透明～半透明の溶液にならない場合は菌体量が多すぎる)
5. 0.3mLのSolIIIで中和する。ここでDNAは溶解したままアルカリ性で溶けていた分子(タンパク質など)が凝集する。
6. 遠心で不溶物を沈殿させる。(15min at 4°C 150,000rpm)
7. 上清を新しいチューブに移してRNaseAを2 μL添加して37°C 20minインキュベート。
8. [フェノール・クロロホルム抽出](#)
9. [イソプロパノール沈殿](#)
10. [エタノール沈殿](#)

溶液調製

SolI

組成	量	目的
1M Tris-HClバッファー(pH8.0)	5 mL	
0.5M EDTA	4 mL	DNase活性の抑制

H₂Oで200mLにメスアップ。

グルコースは特に必要ない。細胞壁のペプチドグリカンを分解するために[リゾチーム](#)を添加したり、RNAを分解するために[RNase](#)を添加することもある。(酵素を加えない場合、単に菌体を洗って分散するためのバッファーと考えてよいでしょう)

SolII

組成	量	目的
NaOH	1.6g	脂質の可溶化、タンパク質の変性・可溶化、RNAの塩基触媒的加水分解
SDS	2g	脂質の可溶化、タンパク質の変性・可溶化

H₂Oで200mLにメスアップ。プラスチックボトルに保存。

SolIII

組成	量	目的
酢酸カリウム	58.9g	SolIのアルカリを中和
酢酸	24mL	SolIのアルカリを中和
H₂O	106mL	

[実験プロトコル](#)

ブ
ラ
ス
ミ
ド
抽
出

Last update: 2013/06/09 09:08 <https://bio.edu-wiki.org/%E3%83%97%E3%83%A9%E3%82%B9%E3%83%9F%E3%83%89%E6%8A%BD%E5%87%BA>

From:
<https://bio.edu-wiki.org/> - BioWiki

Permanent link:
<https://bio.edu-wiki.org/%E3%83%97%E3%83%A9%E3%82%B9%E3%83%9F%E3%83%89%E6%8A%BD%E5%87%BA>

Last update: **2013/06/09 09:08**

