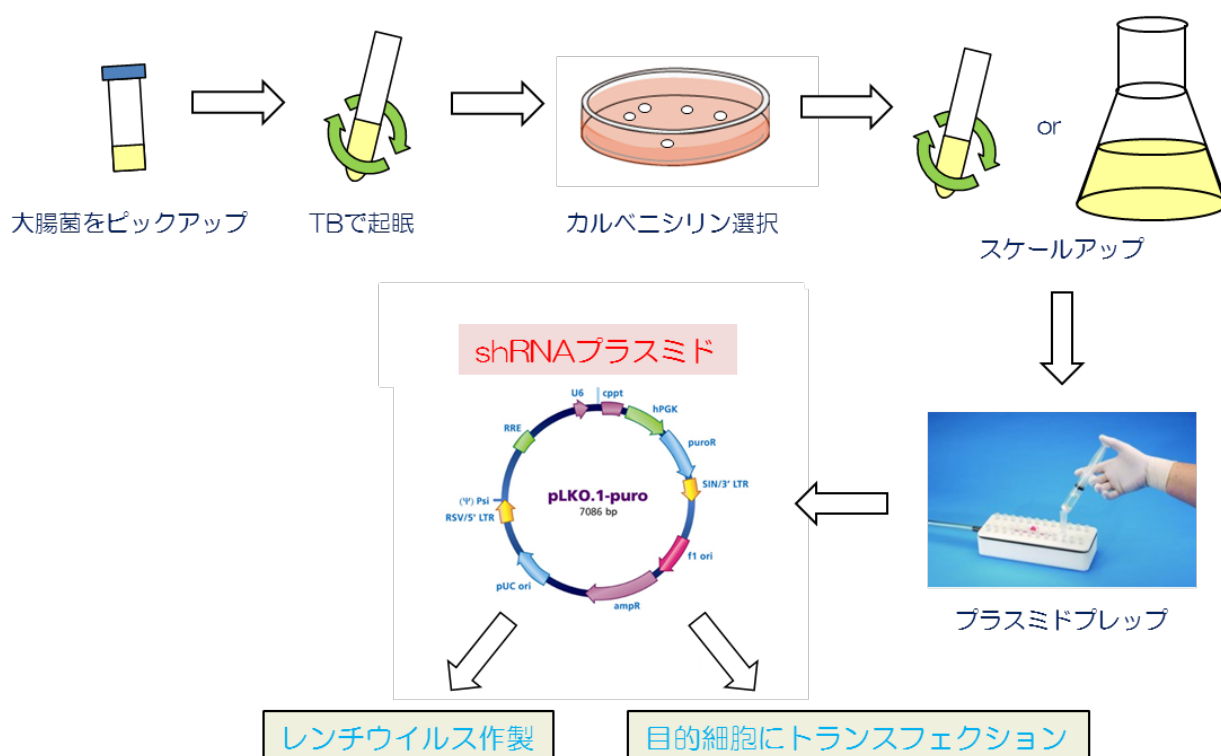


Mission shRNA 大腸菌グリセロールストックから プラスミド DNA の抽出方法

概要

一度ご購入いただき、正しく保管いただければ、何度でもご利用になれます。抽出したプラスミド DNA は目的の細胞へトランスフェクションしたり、レンチウイルスパーティクルを調製し細胞へ感染させることができます。

shRNA調製方法



方法

大腸菌の培養

大腸菌グリセロールストックチューブを開ける前に軽くスピンドウンしてください。

1. 50～100μL の氷片状の大腸菌を 0.5mL の滅菌済抗生物質不含 TB 液体培地(製品番号 [T5574](#), [T9179](#))に入れます。
2. 37°Cで 15～30 分間、振盪培養します。
3. Carbenicillin (製品番号 [C3416](#)、最終濃度 100μg/mL)を含む LB 寒天培地（製品番号 [L2897](#), [L7025](#)）に大腸菌培養液 25～50μL を播きます。
4. 37°Cで 15～20 時間培養します。
5. シングルコロニーをピックアップし、スケールアップしてプラスミド DNA を抽出します。

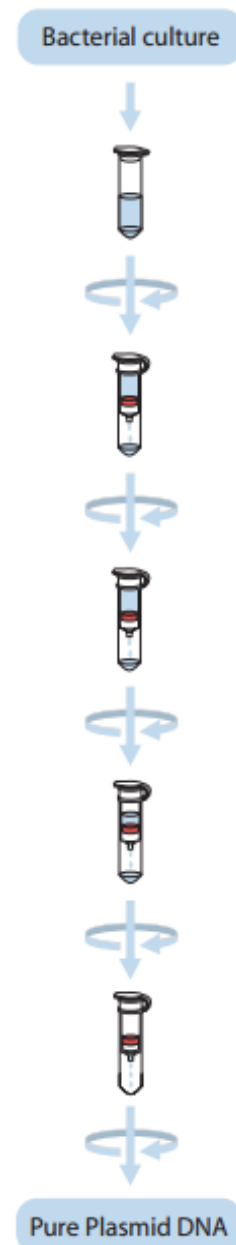
プラスミド DNA の精製 例）製品番号 [NA0150](#) （for 70 preparations、Spin Method）

詳しいプロトコールは [BULLETIN](#) をご参照ください。

<事前に調製が必要な試薬>

- ・ ご使用前に各溶液中に沈殿物が生じていないか確認してください。沈殿物があった場合は、55-65°Cで溶解してください。その後室温に戻してご使用ください。
- ・ Resuspension Solution に 78 μL の RNase A Solution を混合します。
- ・ Wash Solution 2 に 48mL の 95～100%エタノールを混合します。

1. 集菌および溶解
<ul style="list-style-type: none"> 1-5mL の大腸菌を$\geq 12,000\times g$ で 1 分間遠心分離し集菌します。上清は廃棄します。 200μL の Resuspension Solution containing RNase A を加え、vortex もしくはピペティングで完全に懸濁します。 チューブに 200μL の Lysis Buffer を加え、6-8 回転倒混和し、溶解します。 ※vortex はしないでください。5 分以上置かないでください。
2. 溶解液の調製
<ul style="list-style-type: none"> 350μL の Neutralization/Biding Buffer を加え、4-6 回転倒混和します。 $\geq 12,000\times g$ もしくは最大速度で 10 分間遠心分離します。
3. カラムの準備
<ul style="list-style-type: none"> チューブに Miniprep Binding Column をセットし、500μL の Column Preparation Solution を加えます。 $\geq 12,000\times g$ で 30 秒～1 分間遠心します。フロースルーは除去します。
4. プラスミド DNA のカラムへの結合
<ul style="list-style-type: none"> ステップ 2 で得られた溶解液をカラムに加え、$\geq 12,000\times g$ で 30 秒～1 分間遠心します。フロースルーは除去します。
5. 洗浄
<ul style="list-style-type: none"> 500μL の Wash Solution 1 を加え、$\geq 12,000\times g$ で 30 秒～1 分間遠心します。フロースルーは除去します。 750μL の Wash Solution 2 を加え、$\geq 12,000\times g$ で 30 秒～1 分間遠心します。フロースルーは除去します。 $\geq 12,000\times g$ で 1 分間追加遠心します。
6. プラスミド DNA の溶出
<ul style="list-style-type: none"> カラムを新しいチューブにセットします。 100μL の Elution Solution もしくは、分子生物学グレードの滅菌水をカラムに加えます。 $\geq 12,000\times g$ で 1 分間遠心し、DNA を溶出させます。 溶出した DNA は-20℃で保存できます。



他製品の場合は、説明書に従ってご使用ください。 [弊社取扱いのプラスミド DNA 精製キット](#)

shRNA プラスミド調製の注意点・改善点

① 抗生物質の選択

- ・カルベニシリン(製品番号 [C3416](#))を使用します。（注意：アンピシリンでは非特異的コロニー発生の可能性があります）

② 大腸菌の増殖が不十分な場合

- ・スケールアップしてください。
- ・TB 培地(製品番号 [T5574](#), [T9179](#))を使用してください。

③ shRNA プラスミドの回収効率が低い場合

- ・Maxiprep kit (製品番号 [NA0400S](#), [NA0400](#), [NA0410](#))を使用してプラスミドを抽出してください。
- ・推奨する大腸菌株(GC5, GC10, HB101, DH10, DH5)に変更してください。

シグマ アルドリッチ ジャパン リサーチ事業部 〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社はメルクのグループ会社です。

E-mail: jpts@merckgroup.com Tel: 03-6756-8245

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2020年8月時点の情報です。©2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Merck, the vibrant M, and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.

Lit. No. TSM004-2011-K