

Минипреп - выделение плазмидной ДНК, пригодной для проведения реакции секвенирования

1. С вечера засевают культуру бактерий в 5 ml LB с антибиотиком (150 гамм ампициллина на миллилитр), оставляют на ночь на столе.
2. С утра культура дорастивается на качалке при +37°C, интенсивном перемешивании, до оптической плотности 0.6 - 0.8 (важно не перерастить!)
3. Осадить клетки в эппендорфе.
4. Прилить 300 µl раствора 1 - Tris-Cl pH 8 50 mM, EDTA pH 8 10 mM, добавить лизоцим (10 µl 50 mg/ml) и РНКазу (100 г/мл).
5. Инкубировать на +37°C без встряхивания полчаса, несколько раз заморозить/оттаять в азоте.
6. Прилить 300 µl раствора 2 - SDS 1%, NaOH 0.2M, аккуратно перемешать переворачиванием.
7. Инкубировать 5 минут.
8. Прилить 300 µl раствора 3 - KAc 3M pH 5.2, перемешать
9. Инкубировать 5 минут во льду
10. Аккуратно перемешать, осадить осадок 5-6 минут на максимальных оборотах
11. Обработать фенол-хлороформом два раза, без последующей отмывки чистым хлороформом.
12. Прилить 0.6 объема изопропанола. Осадить на максимальных оборотах, 20 минут. Промыть осадок плазмиды 70% этанолом два раза по 500 µl, один раз 96% этанолом. Сушить в блоке на +65°C до отпадения осадка от стенок пробирки. Растворить в деионизованной воде (не в TE, поскольку EDTA ингибирует реакцию секвенирования).

Из 5 мл культуры получается около 5 гамм плазмидной ДНК.

Расчет на 1 мл растворов:

Раствор 1: Tris-Cl 1M pH 8 - 50 µl, EDTA 1M pH 8 - 20 µl, MilliQ water - 930 µl

Раствор 2: SDS 10% - 100 µl, NaOH 1M - 200 µl, MilliQ water - 700 µl