

- 1, 目的のプラスミドを持った1mlのオーバーナイトカルチャーより15Krpm, 10secの遠心で菌を集める (エッペンドルフチューブ内で増やした物でいい)。
- 2, 50 $\mu$ l TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; 原報では20mM Tris) に溶解し50 $\mu$ l Phenol/Chloroform (1:1) を加え10sec ボルテックス。
- 3, 15Krpm, 3min 遠心後、水相より25 $\mu$ l 別のチューブに移す。
- 4, トータルで150 $\mu$ l、0.2N NaOH となるようにNaOHを加え (例えば30 $\mu$ l 1N NaOH、95 $\mu$ l DW) 沸騰水に3分間浸けた後、氷冷。
- 5, 20 $\mu$ l 3N NaOAc、2.5vol EtOHを加え-80度に20分以上放置 (原報では液体窒素に浸ける)。
- 6, 15Krpm, 10分遠心し沈殿を70%EtOHで洗った後風乾。5.5 $\mu$ l DWに溶解。

以下ABIシーケンスキットを用いた場合

- 7, 6、で得られたDNAに0.5 $\mu$ l プライマー (1.6 pmole)、4 $\mu$ l ABI シーケンス mixtureを加えPCR (説明書の半分の系、PCRは96度30sec, 50度15sec, 60度4分を25サイクル)。
- 8, PCR後エタ沈を行いシーケンサーにかける。

付記 (2003/1/21)

1、この方法はサイクルシーケンスが行われる前、RIを用いてシーケンスが行われていたころ開発されたものだが、現在のキットを用いたサイクルシーケンスにも使える。但し、シーケンス以外の用途 (制限酵素切断等) に使えるかは不明。

2、プラスミドシーケンスにはボーリング法でとった後、PEG沈したサンプルでも十分可能だが、多数のサンプルを、ただシーケンスしたいとき等、この方法は有効。またあまり知られていない方法なので紹介しました。