

遺伝子工学用培地・試薬組成

〈培地〉

★LB培地	
polypeptone	10 g
yeast extract	5 g
NaCl	10 g
(agar	15 g)(pH 7.4)
	1 L autoclave
★2×YT培地	
polypeptone	16 g
yeast extract	10 g
NaCl	5 g
(agar	15 g)(pH 7.2)
	1 L autoclave
★青白コロニー選択用培地	
polypeptone	10 g
yeast extract	5 g
NaCl	5 g
(agar	15 g)(pH 7.4)
	1 L autoclave
100mM IPTG	1 ml
25mg/ml Amp.	1 ml
2% X-gal	2 ml
	冷却後混合する。
★MMI 培地	
bacto tryptone	12.5 g
bacto yeast extract	25 g
NaCl	8.5 g
1M Tris-HCl(pH7.2)	20 ml
glycerol	4 ml(pH 7.2)
	1 L autoclave
★Super broth培地	
tryptone	32 g
yeast extract	20 g
NaCl	5 g
1N NaOH	5 ml
	1 L autoclave
★M9 培地	
Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g
(agar	15 g)
	500 ml autoclave
1M MgSO ₄	1 ml
2M Glucose	5.6 ml
1% VitaminB ₁ (Thiamine)	1 ml
1M CaCl ₂	0.1 ml
	別殺菌し(Thiamineは フィルトレーション)、 冷却後(55~56℃)混 合する。
★SOC 培地	
bacto tryptone	20 g
bacto yeast extract	5 g
1M NaCl	10 ml
1M KCl	2.5 ml(pH 7.4)
	1 L autoclave
1M MgSO ₄	10 ml
1M MgCl ₂	10 ml
2M Glucose	10 ml
	別殺菌し、 冷却後混合する。
★NZY培地	
NaCl	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g
yeast extract	5 g
NZ amine(casein hydrolysate)	10 g
(agar	15 g)(pH 7.5)
	1 L autoclave
★YPD培地	
Difco peptone	20 g
yeast extract	10 g
(agar	15 g)(pH 5.8)
	1 L autoclave
40% dextrose	50 g
	別殺菌し、冷却後 (55~56℃)混合する。

〈RNA抽出 AGPC法〉

★Solution D	
Guanidium thiocyanate	25 g /50ml
0.75M-Sodium Citrate(pH7.0)	0.76ml/
10%(W/V)Sodium N-Lauroyl Sarcosinate	2.64ml/
0.1M 2-mercaptoethanol	0.36ml/

〈プラスミド抽出〉

★Solution I	
1M Tris-HCl(pH8.0)	25 ml
250mM EDTA	40 ml
Glucose	9 g
	1 L autoclave
★Solution II	
2N NaOH	10 ml/100ml
10% SDS	10 ml/
★Solution III	
CH ₃ COOK	29.4 g
CH ₃ COOH	11.5 ml
	100 ml autoclave
★TE	
1M Tris-HCl(pH8.0)	10 ml
250mM EDTA	4 ml
	1 L autoclave
★RNase A	
RNase	10 mg/ml
1M NaOAc	10 μl/
	(100℃ 10min.)

〈ファージ希釈〉

★SM buffer	
1M Tris-HCl(pH7.5)	50 ml
NaCl	5.8 g
MgSO ₄	2 g
2% Gelatin	5 ml
	1 L autoclave
★TM buffer	
1M Tris-HCl(pH7.5)	50 ml/L
1M MgSO ₄	10 ml/

〈DNA電気泳動〉

★10×TBE buffer	
Tris	108 g /L
Boric acid	55 g /
EDTA	7.5 g /
★25×TAE buffer	
Tris	121 g /L
CH ₃ COONa	10.3 g /
EDTA	9.3 g /
★BPB·XC solution	
BPB	10 mg /10ml
XC	10 mg /
Sucrose	5 g /
250mM EDTA	0.04 ml /
★EtBr solution	
EtBr	10 mg/ml 暗所保存
★30%アクリルアミド溶液	
Acrylamide	29 g /100ml
BIS	1 g /

PAGE組成表(ml)

ゲル濃度(%)	3.5	5.0	8.0	12.0	20.0
30%アクリルアミド	11.6	16.6	26.6	40.0	66.6
5×TBE buffer	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
H ₂ O	67.7	62.7	52.7	39.3	12.7
10%APS	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
TEMED	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035



〈蛋白電気泳動〉

- ★分離ゲル buffer
Tris-HCl 181 g /liter(pH8.8)
- ★濃縮ゲル buffer
Tris-HCl 60 g /liter(pH6.8)
- ★分離ゲルアクリルアミド
Acrylamide 300 g /liter
BIS 8 g /
- ★濃縮ゲルアクリルアミド
Acrylamide 100 g /liter
BIS 2.5 g /
- ★10×running buffer
Tris 30 g /liter
Glycine 144 g /
SDS 10 g /
- ★4× Sample buffer
1M Tris-HCl(pH6.8) 2.1 ml/10ml
SDS 860 mg/
2-ME 2 ml/
Glycerol 2.8 ml/
BPB 1 mg/
- ★染色液
CH₃OH 225 ml/500ml
CH₃COOH 45 ml/
CBB 1.25 g /
- ★脱色液
CH₃OH 50 ml/500ml
CH₃COOH 35 ml/
- ★固定液
CH₃COOH 35 ml/500ml

濃縮ゲル組成表(ml)

濃縮ゲルアクリルアミド	3.0
濃縮ゲル buffer	3.0
10%SDS	0.12
1.5%APS	0.3
H ₂ O	0.57
TEMED	0.012

分離ゲル組成表(ml)

ゲル濃度(%)	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0
分離ゲルアクリルアミド	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0
分離ゲル buffer	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
10%SDS	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
1.5%APS	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
H ₂ O	16.2	13.7	11.2	8.7	6.2
TEMED	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015

〈ウエスタンブロッティング〉

- ★Blotting buffer
Tris 6.06 g /liter
Glycine 28.8 g /
- ★Skim milk soln.
Skim milk 50 g /liter PBS(-)
NaN₃ 100 mg/
- ★PBS(-)
NaCl 8.0 g /liter
KCl 0.2 g /
Na₂HPO₄ 1.15 g /
KH₂PO₄ 0.2 g /
- ★PBST
Tween-20 0.5 ml/liter PBS(-)
- ★TBS
NaCl 8.0 g /liter
KCl 0.2 g /
Tris 3 g / (pH7.4)

〈サザンブロッティング〉

- ★20×SSC
NaCl 175.3 g /liter
Sodium citrate 88.2 g / (pH7.0)
autoclave
- ★20×SSPE
NaCl 175.3 g /liter
NaH₂PO₄ 27.6 g /
EDTA 7.4 g / (pH7.4)
autoclave
- ★100×Denhardt's
Ficoll 400 20 g /liter
Polyvinylpyrrolidone 20 g /
BSA 20 g /

〈Hanahan法形質転換〉

- ★DnD
DTT 1.53 g /10ml
DMSO 9 ml/
1M CH₃COOK(pH7.5) 100 μl/
- ★TFB
KCl 7.4 g /liter
MnCl₂ ·4H₂O 8.9 g /
CaCl₂ ·2H₂O 1.5 g /
Hexamminecobalt chloride 0.8 g /
0.5M K-MES(pH6.3) 20 ml/
autoclave

〈酵母の形質転換〉

- ★PEG/LiAc Solution(用時調製)
50% Polyethylene glycol 8 ml/10ml
10× TE buffer(pH7.5)* 1 ml/
1M Lithium acetate(pH7.5) 1 ml/ } 別殺菌し、
混合する。

※10×TE buffer(pH7.5)
1M Tris-HCl(pH7.5) 10 ml/100ml
250mM EDTA 4 ml/
autoclave