

プロトコール 4 パルスフィールド電気泳動用染色体 DNA の調製

〈大腸菌〉

大腸菌

← LB broth
37°Cで定常期まで振とう培養
600 × g, 4°C, 10分間

沈殿

← 37°Cに温めた 50 mmol/l EDTA 溶液 (pH 8.0)
懸濁 (EDTA 溶液 : 沈殿 = 6 : 4)
← 懸濁液と等量の 50°Cに保温しておいた 1% Agarose GB 溶液^{注1)}
を混合し、型に注ぐ
4°C, 20分間放置し、固化させる。

ゲルブロック

20 倍量の Solution A^{注2)} に浸し 37°C一晩ゆるやかに振とう
20 倍量の Solution B^{注3)} に移し 50°C、24 ~ 48 時間ゆるやかに振とう
10 倍量の Solution C^{注4)} で 1 時間洗浄 (2 回)

ゲルブロック^{注5)}

〈酵母〉

酵母

← YPD 培地^{注6)}
30°Cで定常期まで振とう培養 (36 ~ 42 時間)
600 × g, 4°C, 10分間

沈殿

← 50 mmol/l EDTA 溶液 (pH 8.0)
懸濁 (EDTA 溶液 : 沈殿 = 6 : 4)
← Zymolyase (2 mg/ml) 100 μl を 300 μl の懸濁液に添加
37°C、20分間酵素反応を行う
← 懸濁液と 3 倍量の 50°Cに保温した 1% Agarose GB 溶液^{注1)}
を混合し、型に注ぐ
4°C, 20分間放置し、固化させる。

ゲルブロック

20 倍量の LET バッファー^{注7)} に浸し 37°C 24 時間ゆるやかに振とう
20 倍量の NDS バッファー^{注8)} に移し 50°C 24 時間ゆるやかに振とう
← 50 mmol/l EDTA 溶液 (pH 8.0)
室温で 15 分間洗浄
← 50 mmol/l EDTA 溶液 (pH 8.0)
室温で一晩洗浄 (2 回)

ゲルブロック^{注9)}

〈制限酵素による切断〉

ゲルブロック

ウェルのサイズに合わせて切断する

ゲルブロック切片

50 倍量の 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8.0)、
0.1 mmol/l EDTA (pH 8.0) に浸し、
室温で 20 分間ゆるやかに振とう
20 ~ 50 倍量の制限酵素反応バッファー^{注10)} に浸し、
室温で 30 分間ゆるやかに振とう

(1.5 ml エピENDORF 型チューブへ移す)

← 制限酵素反応バッファー 200 μl
← 5 ~ 30 units/μg DNA の制限酵素 (酵素反応)
← Bromophenol Blue を含む 100 mmol/l EDTA 溶液 200 μl

パルスフィールド電気泳動用サンプル

〈パルスフィールド電気泳動〉

パルスフィールド電気泳動用サンプル

← 電気泳動用アガロースゲルのウェルに入れ
0.8% Agarose GB 溶液ですきまを埋める

パルスフィールド電気泳動

注 1) 0.125 mol/l EDTA 溶液 (pH 7.5) で 1% Agarose GB を調製する。

注 2) Solution A

10 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5), 1 mol/l NaCl, 100 mmol/l EDTA (pH 7.5), 0.2% Sodium Deoxycholate (Wako), 0.5% Sodium N-Lauroyl Sarcosinate (Wako), 20 μg/ml RNase (DNase free), 1 mg/ml Lysozyme

注 3) Solution B

100 mmol/l EDTA (pH 8.0), 1% Sodium N-Lauroyl Sarcosinate, 1 mg/ml Proteinase K (Wako)

注 4) Solution C

10 mmol/l Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/l EDTA (pH 8.0), 1 mmol/l Phenylmethylsulfonyl Fluoride (Wako)

注 5) ゲルブロックは Solution D の中で 4°C 保存する。およそ 1 年間保存可能である。

Solution D : 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8.0), 100 mmol/l EDTA (pH 8.0)

注 6) YPD 培地

1% Yeast Extract (Difco), 2% Glucose, 2% Bacto Tryptone (Difco)

注 7) LET buffer

0.5 mol/l EDTA (pH 8.0), 0.01 mol/l Tris-HCl (pH 7.5), 7.5% 2-Mercaptoethanol

注 8) NDS buffer

0.5 mol/l EDTA (pH 8.0), 0.01 mol/l Tris-HCl (pH 7.5), 1% Sodium N-Lauroyl Sarcosinate, 1 mg/ml Proteinase K

注 9) ゲルブロックは 0.05 mol/l EDTA 溶液 (pH 8.0) の中で保存する。およそ 1 年間保存可能である。

注 10) ニッポンジーンの制限酵素には 10 倍濃度の酵素反応バッファーが添付されているのでこれを利用するとよい。