コスミドの取り方

Hiroshi Qadota　　<qadota@zoology.ubc.ca>

2002.10.11

１　Alan Coulson からスタッブが届いたら

1-1 Immediate stock をつくる

作り方：LB+Amp or Kan+Glycerol (LB : 50% Glycerol　= 2:1) 100 mL にスタッブからかきとった大腸菌をまぜ、マイナス８０度にしまう。

1-2 プレートに起こす

やり方：LB+Amp or Kan のプレートにスタッブからかきとった大腸菌を塗る。３７度で一晩培養する。

２　コスミドの単離方法

2-1 前培養

できるだけ小さいコロニーをつついて、２mL の LB+Amp or Kan にうえる。３７度で培養する（朝から夕方まで）。最低２個のコロニーをチェックする。実際には、４個つついて、増殖の遅いものを２個使う。

2-2 本培養

５０mL LB+Amp or Kan に前培養を加える。３７度で一晩培養する。

2-3 精製方法

キアゲン（P１００カラム）で行う。回収前に、ストックをつくる。

2-4 チェック方法

制限酵素地図を調べて、幾つかの制限酵素で処理して電気泳動する。

３　２の方法で取れなかった場合

3-1 前培養

できるだけ小さいコロニーをつついて、５～１０mL の LB+Amp or Kan にうえる。３７度で一晩（８～１０時間程度）培養する。

3-2 本培養

Saturate していない前培養を１mL とって、５００mL の LB+Amp or Kan（または TB+Amp or Kan）にうえる。６～９時間程度３７度で培養して、少し濁ってきたところで回収する。

3-3 精製方法

キアゲン（P１００カラム）で行う。前培養からストックをつくる。