

## ファージからのプラスミドの Pop out

1999年4月11日 門田 裕志

Hiroshi Qadota <qadota@zoology.ubc.ca>

### 用意するもの

#### ・NZY プレート

NaCl	2.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g
Yeast Extract	2.5 g
NZ amine	5 g
Agar	7.5 g
H <sub>2</sub> O	500 mL

#### ・NZY liquid

NaCl	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4 g
Yeast Extract	1 g
NZ amine	2 g
H <sub>2</sub> O	200 mL

#### ・NZY Top Agar

NZY liquid	50 mL
Agarose	0.35 g (オートクレーブ後 55°C のインキュベーターへ)

#### ・SM buffer

NaCl	0.58 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
1M Tris·Cl (pH7.5)	5 mL
2% Gelatin	0.5 mL
H <sub>2</sub> O	95 mL

すべて、オートクレーブする

### Procedure

#### 1 使用する E. coli をおこす (Day -2)

XPORT on NZY  
XLOLR on LB+Tet 37°C o/n

#### 2 E. coli の Preculture (Day -1)

XPORT in 2 mL NZY  
XLOLR in 2 mL NZY

#### 3 E. coli の Culture (Day 1)

Preculture を 1/10 dilution する  
0.5 mL Preculture  
4.5 mL NZY  
37°C で 5 ~ 6 時間程度 (OD=2.0 になるまで)

#### 4 Rapid Excision の操作 (Day 1)

- ・Culture を室温で 30 min 放置 (1.5 mL のチューブに移す)
- ・使用する NZY プレートを 37°C のインキュベーターにいれる
- ・ファージの希釈

1/1, 1/100, 1/10000 with SM buffer

- ・15 mL チューブに

XPORT	50 mL
704 (helper phage)	10 mL
phage	1 mL

をこの順番で入れる

- ・XLOR 5 mL を加える
- ・NZY Top Agar を 3 mL 加え、NZY プレートにまく
- ・ 37.°C で培養する

## 5 プラークのピックアップ (Day 2)

適度にプラークの出ているプレートから、プラークをつつく  
LB+Amp (100 mg/mL)+Tet (25 mg/mL) 2mL にうえる  
増殖に時間がかかる場合が多いので、早めについておく  
37.°C で培養する

## 6 ミニプレップ (Day 3)

いつもの方法

チェックは、EcoRI, XhoI でおこなう。

参考文献 : Rapid Excision Kit INSTRUCTION MANUAL (Stratagene)

## 参考

### 1 ファージの増やし方

E. coli は、PLK-F'を使う。

1-1 LB+maltose 50mL に PLK-F'をうえる。37.°C で培養する。

1-2 E. coli を回収する。0.01 M MgSO<sub>4</sub> 20 mL に Suspend する。4.°C で保存する

1-3 0.1 mL Bacteria と 3 mL LB TOP AGAR をまぜて、LB plate にまく

1-4 固まったら、ファージをスポットする。37.°C で培養する。

1-5 500 mL SM buffer + 20 mL Chloroform を 1.5 mL チューブに作っておき、そこにファージのプラークをピックアップして、Suspend する。Vortex して、4.°C で保存する

### 2 helper phage の増やし方

#### 2-1 helper phage のタイターチェック

- ・1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000 dilution をつくる。
- ・PLK-F' 0.1 mL+LB TOP AGAR 3 mL をまぜて、LB plate にまく。
- ・固まったら、dilution した phage 10 mL をスポットする。37.°C で培養する。
- ・スポットの中に、Single plaque のある dilution を採用する。

#### 2-2 ファージの培養と回収

- ・2xYT+Kanamycin (70 mg/mL) 3 mL x 10 本に Single plaque をつついてうえる。
- ・37.°C で培養する。激しく攪拌する。1 2 ~ 1 6 hr。
- ・15 mL チューブに移し、3000 rpm 10 min で遠心する。
- ・2.5 mL ずつ回収する。1.5 mL チューブ 18 本に移す。
- ・遠心 15000rpm 10 min
- ・1.3 mL ずつ、50 mL チューブに移す。

#### 2-3 増幅した helper phage のタイターチェック

・1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000, 1/10000000, 1/100000000 の dilution をつくる。

- ・dilution したファージ 1 mL, XPORT 100 mL, LB TOP AGAR 3 mL をまぜて、LB plate にまく。37.C で培養する。
- ・Single plaque を数えて、pfu/mL を計算する。( pfu: plaque formation unit )