

=====

■■■ コスミドクローンの取扱い ■■■

=====

■ コスミドクローンの取扱いは熟練した技術が必要？ しかし、いくつかの注意点を知れば、プラスミドと同じように扱うことができます。今回はそのお話をします。

■ コスミドで形質転換した大腸菌は、LB プレートでも LB 液体培地でも増やすことができます。LB 液体培地で増やした形質転換大腸菌からコスミドを調製するには、プラスミド調製用のアルカリ法を利用して、全く同じ試薬と同じ手順で - 若干の留意点を除けば - 問題ありません。

■ プラスミドの場合、アルカリ法の Solution I, II, III と処理し、エタノール沈澱と 75% エタノールによる沈澱の洗浄の後、沈澱を滅菌水か TE バッファーに溶かし、そのまま制限酵素処理や塩基配列解析に用いても問題ない場合が多いのですが、コスミドの場合は、このようなショートカットはできないことが多いようです。フェノール抽出による DNA の精製は必要です。また、沈澱を乾燥しすぎると、再び滅菌水に溶解するのは困難になりますので、遠心後の上清をピペットチップ等で丁寧に除き、どうしても壁面に残る滴はろ紙かティッシュペーパー等のこよりで吸い取って、沈澱が湿っているうちに溶解して下さい。もし、乾燥し過ぎてしまったら？溶かそうとして激しく攪拌や震盪をしますと、DNA が長いだけに物理的損傷が心配です。解けにくくなった場合は、37 °C に保温して、ゆっくり溶かして下さい。

■ コスミドで形質転換した大腸菌を長く継代していると、コスミドの欠失や大腸菌からの脱落が起きやすくなります。そこで、コスミドは形質転換した大腸菌をグリセロールストックで保存するよりは、DNA で保存し、必要な時に大腸菌を形質転換することをお勧め

します。コスミドによる大腸菌の形質転換にはコスミドのパッケージングエキストラクトが必要になります。

■ プラスミドもそうですが、コスミドの場合は特にクローンの増殖のための培養時間が長くなり過ぎないように注意が必要です。培養開始時の植菌量が少ないと、どうしても液体培養の時間が長くなり、コスミドが脱落する傾向があります。同様に、数百 ml の培養をする際の前培養が長くなると、本培養で菌が十分増えていてもコスミドの収量がとても少なくなる傾向があります。多少菌の増殖が悪くても、前培養も本培養も 6-8 時間程度にした方が無難です。

■ 当バンクから組換えアデノウイルス作製用シャトルベクターの提供を受けた方からのクレームで比較的多いのは、

「クローンを確認するためにマップを見て制限酵素で切ったが期待されるインサートサイズのバンドがない。遺伝子が抜け落ちたのではないか？」

というものです。当バンクで扱っている組換えアデノウイルス作製用シャトルベクターは 40 kbp 前後有り、そこに各種遺伝子の cDNA が搭載されています。そこで、プラスミドと同じような感覚で 100 ng 程度を制限酵素で切り挿入された cDNA 断片をアガロースゲル電気泳動で検出しようとしても、例えば 1 kbp のインサートであれば 2.5 ng しかありませんので、バンドがとても見えにくいのです。そのことを考慮して、インサートを確認するには多めの DNA を使って下さい。(T.M.)

(Mail News 2005.08.30 掲載記事)

=====

発行

理化学研究所・バイオリソースセンター

遺伝子材料開発室

dnabank@brc.riken.jp

<http://www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/>

=====