slot lysis protocol

【 Author 】 後藤 聡
(慶應義塾大学医学部生理学教室)

【 Homepage 】
【 Published 】 2011-11-14
【 Last Update 】 2011-11-14
【 Keywords 】

概要・原理

plasmid constructionの際、mini prepなしでinsertをもつ大腸菌を、安価に選択できる方法です。
大腸菌をmini prep用にseedし、薄く濁ってきたところで一部サンプリング、遠心してペレットにし、lysozyme入りのバッファーに懸濁した後、あらかじめアガロースゲルのウエルにアプライしておいたリシスバッファー上に重層して泳動します。Insertをもつプラスミドが入ったサンプルは、ベクターのサイズよりも大きくなるので、そのサンプルのみmini prepして、実際のinsertを確認することになり、手間が省けます。

装置・器具・試薬

【試薬】 Protoplasting Buffer; 30 mM Tris pH8.0 1 M Tris-HCl (pH8.0) 30 ul; 5 mM EDTA 0.5 M EDTA 10 ul; 50 mM NaCl 5 M NaCl 10 ul; 20% sucrose Sucrose 0.2 g; 50 ug/ml RNase 10 mg /ml RNase 5 ul; 50 ug/ml lysozyme 10 mg /ml lysozyme 5 ul/ml; Lysis Buffer; 1 x TAE 10 x TAE 100 ul; 2% SDS SDS 20 mg; 5% Sucrose Sucrose 50 mg; BPB BPB 適/ml

詳細

1. 集菌 E.coliが薄く増えてきたら、100 ulを取って15,000 rpm 1min supをアスピレート

2. あらかじめ泳動槽にセットしたゲルに、2 ulのLysis Bufferをアプライ

3. E.coli pptに5 ulのProtoplasting Bufferを加えてsuspend、そのままLysis Bufferの上に重層
（protoplasting Bufferはあらかじめ分注してはだめ。一枚のゲル分を素早く処理すること）

4. 最低のvoltで15 min泳動後、100 Vに上げて適当な位置まで泳動する。

工夫とコツ

E.coliが育ちすぎると菌体のlysisがうまくいかず、泳動が汚くなるので、早めにサンプリングすること。

参考文献