

Wizard® SV 96 DNA Purification Systemを用いた96ウェルフォーマットでの 高分子量ベクター(コスミドやBAC)の単離

Wizard® SV 96 DNA Purification Systemは、96個のサンプルから高品質のプラスミドを迅速に精製するシステムです。ここでは、このシステムの構成品を使い96個のサンプルからの高分子量ベクター(コスミドやBAC)の精製方法をご紹介します。この方法で得られたDNAを使って、良好な蛍光シーケンスの解析結果を得られることが確認されています。

マニュアル操作による単離プロトコール 1mlピペッター - (マルチチャネル等)を使用する場合

Biomek® 2000 (Beckman Coulter)による単離プロトコール

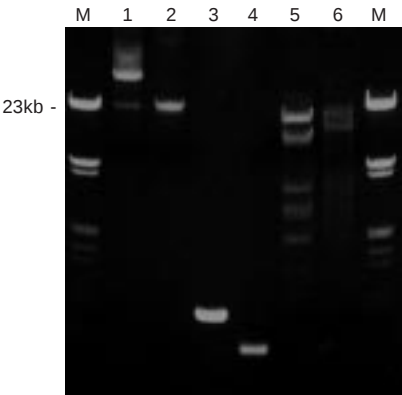
1. 96 ディープウェルプレートを用いて2mlのTerrific Broth + Antibioticsで一晩培養(37℃、16~18時間)。
2. 1,500 × gで10分間遠心した後に、上清を廃棄。

3. 300µlのWizard® SV 96 Cell Resuspension Solutionを加え、5分間静置。ピペッティング10回により細胞ペレットを再懸濁。
4. 300µlのWizard® SV 96 Cell Lysis Solutionを加え、500µl × 4回のピペッティングにより混和。室温に5分間静置。
5. 300µlのWizard® SV 96 Neutralization Solutionを加え、500µl × 4回のピペッティングにより混和。室温に10分間静置。
6. 新品の96 ディープウェルプレート上にVac-Man® 96 Vacuum Manifoldのカラーを設置し、さらにその上にWizard® SV 96 Lysate Clearing Plateを設置。
7. Wizard® SV 96 Lysate Clearing Plateにステップ5で調製したサンプルを移し、10~20分間吸引 (ウェル内の溶液がなくなるまで)。
8. 回収したサンプル (~ 800µl) に0.7倍量のイソプロパノール (560µl) を添加。
9. 1ml × 5回のピペッティングにより混和し、室温に10分間静置。

-ここからは自動.....
3. 150µl × 2回でWizard® SV 96 Cell Resuspension Solutionを加え、5分間静置。ピペッティング7回により細胞ペレットを再懸濁。
4. 150µl × 2回でWizard® SV 96 Cell Lysis Solutionを加え、ピペッティング4回により混和。
5. 150µl × 2回でWizard® SV 96 Neutralization Solutionを加え、ピペッティング4回により混和。5分間静置。
6. あらかじめ新品の96 ディープウェルプレート上にVac-Man® 96 Vacuum Manifoldのカラーを置き、さらにその上にWizard® SV 96 Lysate Clearing Plateを設置。
7. Wizard® SV 96 Lysate Clearing Plateにステップ5で調製した溶液を180µl × 5回で移し、10~20分間吸引 (ウェル内の溶液がなくなるまで)。
8. 回収したサンプル (~ 800µl) に0.7倍量のイソプロパノール(560µl; 185µl × 3回)を加え、185µl × 3回のピペッティングにより撹拌。
9. 室温に10分間静置。
-ここまでは自動.....

10. 2,500 × gで30分間遠心し、上清を廃棄。
11. 500µlの冷70%エタノールを加え、再び2,500 × gで5分間遠心し、上清を廃棄。
12. オーバードライにならないように、10分間ほど風乾。50µlのTE bufferに溶解。プレートシェーカー等で穏やかに撹拌。

注意点：
○ ディープウェルプレートを遠心操作する際は、クロスコンタミネーションを防ぐ為にウェル上部をシーリングすることをお勧めします。
○ 宿主大腸菌はDH-5αを推奨します (溶菌したときの粘性が低い為)。
○ 菌体量が多い場合、フィルターの目詰まりや溶菌が不完全になる場合があります。あらかじめ適した大腸菌量を決定してください。



単離したコスミドとBACの解析結果
回収液から10µlを採り、環状のコスミド(レーン1)とBAC(レーン2)を、次に1µlのコスミド(レーン3)とBAC(レーン4)を鋳型とし、それぞれの薬剤耐性遺伝子の一部を増幅するプライマーを用いたPCR反応液(100µl)から10µlを、また、10µlのコスミド(レーン5)とBAC(レーン6)をEcoRIで消化し、1%TAEアガロースゲルを用いて電気泳動した。レーンMは1µgのLambda DNA/HindIII Marker (カタログ番号G1711)。

単離したコスミドとBACの解析結果

本稿で紹介したプロトコールにしたがって単離したコスミドやBACは、基本的な分子生物学の手法(制限酵素消化やPCR反応)に適用できることが確認されました。また、ここにデータを載せることはできませんが、自動蛍光シーケンサーを用いた解析においても500bp以上の解読が可能であることが確認されています。
このように、96サンプル同時の半自動化の高分子量ベクター単離がこのプロトコールにより実現できます。

製品案内			
製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Wizard® SV96 Plasmid DNA Purification System	96ウェル分 5 × 96ウェル分	A2250 A2255	37,000 142,000
Collar for Vac-Man® 96 Manifold	1個	A2311	20,000
Wizard® SV96 Lysate Clearing Plates	10枚	A2241	80,000
Wizard® SV96 Cell Suspension Solution	500ml	A7113	20,000
Wizard® SV96 Cell Lysis Solution	500ml	A7123	15,000
Wizard® SV96 Neutralization Solution	500ml	A1481	15,000