

LAMBDA INN *in vitro* Packaging Kit

Code No. 317-01741 (3 回用)

本品は、ラムダ DNA を効率よく *in vitro* パッケージングするためのキットです。Freeze/Thaw Lysate と Sonicated Extract が 1 本のチューブに含まれているので操作が簡便です。

パッケージングは大まかに、①外殻前駆体形成、②cos site で連結して concatemer を形成している λ ファージ DNA の外殻前駆体への挿入、③cos site での切断、④ファージ粒子の成熟という過程で進みます。

パッケージング効率:

1×10^8 pfu/μg Standard λ DNA 以上

保存:

Store at -80°C

内容:

Packaging Extract 30 μL × 3 本 (黄色チューブ)
Standard λ DNA 20 μL × 1 本 (透明チューブ)
Indicator *E. coli* VCS257 10 μL × 1 本 (青色チューブ)

- * 製品到着後はすぐに -80°C フリーザーの奥に保管して下さい。
- * 液体窒素は使用しないで下さい。
- * 一度溶かした Packaging Extract は保存できません。使用前に融解し、すぐに使い切ってください。

備考:

- 本品は、わずかながらメチル化された DNA を制限する活性が存在するので、高度にメチル化されたゲノム DNA のパッケージングの場合に効率が低下することがある。
- アルコール沈殿共沈剤 (エタ沈メイト等) を使用した DNA の場合も効率が低下する。

用途:

- λ ファージ DNA の *in vitro* Packaging
- cDNA ライブラリー構築
- コスミドベクター (Charomid DNA) の *in vitro* Packaging

使用例:

本キットに含まれている Standard λ DNA (0.04 μg/μL) を使用する対照実験の手順を裏面に示します。

本品は、試薬 (試験研究用) として販売しているものです。
医薬品の用途には使用しないでください。

< λファージ DNA の *in vitro* Packaging >

ピペティングやチップ先で溶液を混合する際には、泡立たないように先端口径が広いチップ（またはチップ先端を約 0.5 cm カットしたもの）を使用する。

A パッケージングの反応

- ① Packaging Extract を -80℃ のフリーザーから氷中に移し、速やかに溶かす。（タッピングをしないこと）
- ② DNA 溶液（～1 μg/μL）*1) を 1～6 μL 加え、チップ先で混ぜる。（泡立てないこと）
- ③ 室温（約 22℃）で 1～2 時間放置する。
- ④ SM Buffer (Phage Buffer) *2) を 0.5～1 mL 加え、穏やかに転倒混和する。（数日 4℃ に保存する場合にはクロロホルムを 1 滴加える）

B-1 宿主菌の調製

- ① 2 mL の LB broth に 20% マルトースを 70 μL 加えて調製した培地へ、コロニーアイソレーション*3) で得られた *E. coli* VCS257 の単一コロニーを植菌し、37℃ にて一晩振とう培養する。
- ② 菌液 1 mL を 1.5 mL チューブに取り、遠心（1500 × g, 5 min）して上清を残さないように取り除き、得られた沈殿に 0.5 mL の 10 mM MgCl₂（または MgSO₄）を加えてタッチミキサーで懸濁し氷中に置く。（ここで希釈した菌液はすぐに B-2② で使用すること）

B-2 宿主菌への導入

- ① パッケージング反応後のファージ液を軽く遠心（3000 × g, 5 sec）して残渣を落とし、上清を SM Buffer で 10⁵ 倍（100,000 倍）希釈*4) する。
- ② 15 mL チューブに B-1② で調製した菌液 100 μL と、B-2① で 10⁵ 倍希釈したファージ液 100 μL を入れてピペティングにて混合し、室温（約 22℃）にて 15 分間放置する。
- ③ 約 50℃ に保温しておいた 3 mL の M Top Agar (LB top agar) *5) と速やかに混合し、すでに固化している LB-plate に重層する。
- ④ 重層した M Top Agar が十分固化した後、培地部分を上にして 37℃ で一晩静置培養する。
- ⑤ 生じたプラーク数を数え、パッケージング効率を算出する。

*1) 対照実験の場合、Standard λ DNA (0.04 μg/μL) を 5 μL [0.2 μg] 加える。対照実験のパッケージング効率より、組換え DNA のパッケージング効率が低下すると考えられる場合には、DNA 溶液の濃度を検討する。

*2) **SM Buffer (Phage Buffer):**

NaCl	2.9 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	25 mL
2% Gelatin	2.5 mL

以上に H₂O を加えて 500 mL とし、オートクレーブ処理し、4℃ にて保存する。

*3) LB agar プレート（抗生物質は入れない）上で線画培養し、他のコロニーと離れた単独のコロニーを選ぶ。

*4) 希釈例（タッチミキサーでよく混合すること）:

希釈倍率	10 ⁻¹	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
SM Buffer	450 μL	495 μL	450 μL	450 μL
上清(希釈液)	50 μL	5 μL	50 μL	50 μL

*5) **M Top Agar (LB top agar):**

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
Agar	7.5 g

以上に H₂O を加えて 1 L とし、オートクレーブ処理し、4℃ にて保存する。

使用時には電子レンジ等で溶かし、必要量を分取し濾過滅菌済みの 1 M MgCl₂ を終濃度 10 mM となるように添加して約 50℃ の水浴で保温しておく。