

改良プラスミド精製法

研究協力者 荻 田 善 一
(富山医科薬科大学和漢薬研究所)

DNA 診断法におけるプローブとしての遺伝子のクローニングは多くの種類の遺伝子を準備しなければならない。したがって、経済的で簡単でしかも迅速な方法であることが必要である。そこでわれわれは、Mandel らの方法と Caruthers らの方法を組合せさらにこれに改良を加えることによって、プラスミドを短時間に効率よく精製する方法を確立した。

実験方法

培養法

プラスミド pBR322 またはコスミド pJB8 を含む大腸菌 HB101 の培養は、寒天培地上でのコロニー形成、試験管内液体培地での前培養を経て、最後に 1 l の大量培養という順序で行った。1 l 培養は 37°C で振盪しながら行い、定期的に吸光度を測定してゆき、OD₆₆₀ が 1.0~1.2 になったところで 150 µg/ml のクロラムフェニコールを加え、12~16 時間振盪した。次に遠心して菌体を集め TES 緩衝液に浮遊させて以下の方法でプラスミド DNA の分離を行った。

大腸菌からのプラスミドの分離

エチジウムブロマイド (EtBr) を使う過程では、光が当たらないように容器にはアルミ箔をはり、手にはゴム製手袋をつけて、操作は手速く行なう。操作中、試料の温度は 0~4°C に保った。(1)大腸菌は 1 l の培地で培養し、クロラムフェニコールでアンプリフィケーションをかけた後、遠心して集菌し 25% ショ糖を含む TES 緩衝液 15 ml に浮遊させた。次にリゾチーム、EtBr をそれぞれ 5 mg/ml 含む溶液を 3 ml 加えよく混和した。7 分後、0.25 M EDTA を 6 ml 加え、緩やかに攪拌して 5 分間インキュベートした。最後に、24 ml の Lysis Mixture を加え、緩やかに攪拌しながら 30 分間インキュベートした。その溶液を 480,000 g で 25 分間遠心し、上清をとり実験に用いた。この上清を「EtBr cleared lysate」とよぶ。(2) EtBr cleared lysate に SDS を 1% になるように加えて、65°C で 5 分間加熱した。室温にもどした後に、TES 緩衝液で飽和させたフェノールで 2 回抽出を行い、蛋白質を除去した。この操作により EtBr も同時にフェノール中に溶出した。水層をとりだし、等量のエーテルを加えて水層中よりフェノールを除去した。(3)最後に RNA の除去を行った。エーテル処理の終わった溶液に終濃度が 0.5 M になるように NaCl を加え、ポリエチレングリコール (PEG)6000 を 8% になるように加えて 3 時間緩やかに攪拌した。溶液を 4,000 g で 20 分間遠心するとプラスミド DNA は沈殿した。これをゲルろ過用の緩衝液に溶解し、Bio Gel A-50m を支持体とするカラムクロマトグラフィを用いて精製した。このときのカラムは、高速液体クロマトグラフィー

(ファルマシア社製)に設置した。分離したプラスミドはエタノール沈殿によって濃縮した。

アガロースゲル電気泳動法によるプラスミド DNA の分析

電気泳動は、1%アガロースゲルを用い、75 V 80 mA の条件で1時間行った。ゲルはあらかじめ0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の EtBr で染色しておいた。

結 果

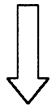
今回われわれが試した方法によって精製されたプラスミドは、大腸菌の1l 培養液当たり1.8~2.0 mg と以前の方法に比べて5~10倍に増収していることがわかった。また菌体回収から精製プラスミドを得るまでに要する時間も8時間程度であり、超遠心による方法(24~48時間)と比較してはるかに時間を短縮することに成功した。

このような遺伝子クローニング法を動物雑種細胞を用いる染色体クローニング法と組み合わせることによって、染色体 DNA ライブラリーの設立もより容易となるであろう。またビオチン標識の DNA プローブによる DNA 診断技術の開発と相まって、本法による遺伝子クローニング法は何ら特別な施設を必要としないことから、病院検査室における DNA 診断の展開もより容易となることが期待される。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



結果

今回われわれが試した方法によって精製されたプラスミドは、大腸菌の 1l 培養液当り 1.8 ~ 2.0mg と以前の方法に比べて 5~10 倍に増収していることがわかった。また菌体回収から精製プラスミドを得るまでに要する時間も 8 時間程度であり、超遠心による方法(24~48 時間)と比較してはるかに時間を短縮することに成功した。

このような遺伝子クローニング法を動物雑種細胞を用いる染色体クローニング法と組合せることによって、染色体 DNA ライブラリーの設立もより容易となるであろう。またビオチン標識の DNA プローブによる DNA 診断技術の開発と相まって、本法による遺伝子クローニング法は何ら特別な施設を必要としないことから、病院検査室における DNA 診断の展開もより容易となることが期待される。