

## パッケージングエキストラクトの調製とλファージの *in vitro* packaging

Ver1.2 (2011.1.17)

[Ref. page on 2.95 ~ in “Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL/2<sup>nd</sup> edition”  
Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989]

[Ref. Nucleic Acids Research, 1993, Vol. 21, No. 16, 3903-3904 ]

SE(sonicated extract) from induced NM759 cells

F<sup>T</sup>TL(frozen-thawed lysate) from induced BHB2688 cells

### SE (sonicated extract)の調製

- 1) NM759 を NZY 寒天培地に植え、30°Cで一晩培養する。  
(single colony isolation を行う。)
- 2) 1 コロニーをとり、NZY broth 100 ml の入った 500 ml 容三角フラスコ (計 2 本) に植菌して、30°Cで激しく振とうしながら一晩培養する (約 110 rpm)。  
(菌は、1 ないし 2 日前に isolation を行った fresh なものを用いる。)
- 3) Overnight culture 25 mlを、NZY broth 500 mlの入った 2 l容三角フラスコ (計 2 本) に植菌して、OD600 を確認 (約0.05~0.15) した後、30°Cで激しく振とうしながらOD600=~ 0.3 まで培養する (約 110 rpm)。(2.5~4 hr程度かかる。)
- 4) 吸光度が達したら、培地の温度をすみやかに 45°Cへ上げるため、あらかじめ 65°Cに設定した water bath にフラスコを移し、手でかくはんしながら、時々アルコール消毒した温度計で直接フラスコ内の培地の温度を測りつつ、45°Cまで上げる (温度は数分で上昇する)。温度が 45°C に達したら、直ちにフラスコを 45°Cの water bath に移し、振とうしながら 15 min インキュベートする。
- 5) フラスコを 39°Cの water bath に移し、激しく振とうしながら 2 hr 培養する (約 110 rpm)。  
(Induction of lysogen の確認: 1 時間程たったら、試験管 2 本に培養液を 1 ml ずつ分取し、片方には数滴の chloroform を加えて vortex し、数分静置する。chloroform を加えた方の培養液が透明になっていることを確認する。)
- 6) 氷中にフラスコを移し、手で回しながら冷やす。あらかじめ氷中で冷やした遠心チューブに培養液を移し、4000 g、4°Cで 10 分間遠心 (BECKMAN HP-25, JA-14 or JA-10 rotor) して菌を回収する。

(以降の操作は全て氷中で行う。)

7) 遠心後、上清をデカントで捨てる。さらにキムワイプとピンセットを使って遠心チューブの内壁に残った培地をよくふき取る。(ルーズな沈殿も含めて培地を出来るだけ完全に除く。)

8) 500 ml 培養液につき 3.6 ml の冷 sonication buffer を加え、ピペッティングにより沈殿を懸濁する。懸濁液を透明な遠心用ポリチューブに移す。

9) NaCl を入れた氷中にチューブを置き、マイクロチッププローブを懸濁液に充分浸してソニケーションをかける。(液が飛ばない程度の最高出力で、5 sec かけて 15 sec 休み、計 5 回繰り返して細胞を破碎する。) ソニケーションによって懸濁液の粘度は下がり、透明度が上がる。(ソニケーションの程度によって SE の出来が決まる。器具等に応じて条件検討の余地あり。)

10) 破碎液を 12000 g、4°C で 10 分間遠心 (BECKMAN HP-25, JA-20 rotor アダプタ使用) して上清を回収する。この際に volume を測っておく。

11) 回収した上清と等 volume の冷 sonication buffer と、上清の 1/6 volume の冷 packaging buffer を加え、手で振って混合する。

12) 4°C に冷やしておいた 1.5 ml エッペンドルフチューブ (green) に 60  $\mu$ l ずつ分注し、液体窒素中で凍結した後、-80°C で保存する。(約 200 本 / 1 culture)

### **FTL (frozen-thawed lysate) の調製**

1) BHB2688 を NZY 寒天培地に植え、30°C で一晩培養する。

(single colony isolation を行う。)

2) 1 コロニーをとり、NZY broth 100 ml の入った 500 ml 容三角フラスコ (計 2 本) に植菌して、30°C で激しく振とうしながら一晩培養する (約 110 rpm)。

(菌は、1 ないし 2 日前に isolation を行った fresh なものを用いる。)

3) Overnight culture 25 ml を、NZY broth 500 ml の入った 2 l 容三角フラスコ (計 2 本) に植菌して、OD600 を確認 (約 0.1~0.2) した後、30°C で激しく振とうしながら OD600 = ~ 0.6 ま

で培養する (約 110 rpm)。(1.5~2.5 hr 程度かかる。)

4) 吸光度が達したら、培地の温度をすみやかに 45°C へ上げるため、あらかじめ 65°C に設定した water bath にフラスコを移し、手でかくはんしながら、時々アルコール消毒した温度計で直接フラスコ内の培地の温度を測りつつ、45°C まで上げる (温度は数分で上昇する)。温度が 45°C に達したら、直ちにフラスコを 45°C の water bath に移し、振とうしながら 15 min インキュベートする。

5) フラスコを 39°C の water bath に移し、激しく振とうしながら 2 hr 培養する (約 110 rpm)。

(Induction of lysogen の確認: 1 時間程たったら、試験管 2 本に培養液を 1 ml ずつ分取し、片方には数滴の chloroform を加えて vortex し、数分静置する。chloroform を加えた方の培養液が透明になっていることを確認する。)

6) 氷中にフラスコを移し、手で回しながら冷やす。あらかじめ氷中で冷やした遠心チューブに培養液を移し、4000 g、4°C で 10 分間遠心 (BECKMAN HP-25, JA-14 or JA-10 rotor) して菌を回収する。以降の操作は全て氷中で行う。

7) 遠心後、上清をデカントで捨てる。さらにキムワイブとピンセットを使って遠心チューブの内壁に残った培地をよくふき取る。(ルーズな沈殿も含めて培地を出来るだけ完全に除く。)

8) 500 ml 培養液につき 1 ml の冷 sucrose buffer を加え、ピペッティングにより沈殿を懸濁する。懸濁液をまとめ、超遠心チューブに移す。この際に volume を測る。(volume 測定のため、懸濁時にあまり泡立てないように努力する。)

9) 採取量の 1/20 volume の冷 lysozyme solution を加え、手で軽く混ぜる。

10) チューブを液体窒素中に浸し試料を凍結する。(この段階で、-80°C で数日間保存可能。)

11) 氷上に超遠心チューブ (40PA) を約 30 min おいて溶かす。(シャーベット状程度。溶かしすぎない。) その後、前述の lysozyme solution と等量の冷 packaging solution を加える。

12) 超遠心 (45000 g, 1 hr, 4°C) (当 lab. では HITACHI 55-P7, RP50-T rotor, 21000 rpm, 1.5 hr at 4°C) を行い、上清をポリチューブに回収する。

13) 4°C に冷やしておいた 1.5 ml エッペンドルフチューブ (yellow) に 30  $\mu$ l ずつ分注し、液体窒素中で凍結した後、-80°C で保存する。(約 40 本 / 1 culture)

### λファージの *in vitro* packaging

※ピペッティング操作には全て wide bore tip を使用する。

1) FTL (yellow tube : 30  $\mu$ l) と SE (green : 60  $\mu$ l) を-80°Cフリーザーから取り出し氷中で溶かす。

2) FTL が溶けたら、その 15  $\mu$ l を 1.5 ml エッペンドルフチューブに取る。

3) FTL 15  $\mu$ l に対して DNA 溶液 (0.5~1.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) 5  $\mu$ l を加え、数十回ピペッティングして混合する。(泡立てないこと。)

4) さらに SE 30  $\mu$ l を加えて同様に混合する。

5) 37°C で 1.5 hr インキュベートする。

6) 上記反応液に、FTL 15  $\mu$ l を加えてピペッティングにより混合、SE 30  $\mu$ l を加えて同様に混合する。

7) 再び 37°C で 1.5 hr インキュベートする。

8) SM buffer (pH=7.5) を 400  $\mu$ l 加えて混合(vortex)し、4°C で保存する。(packaged phage は 4°C で 6 ヶ月以上安定。)

一度溶かした FTL、SE はその場で使い切る。そのため、*in vitro* packaging は同時に 2 本ずつ行うとよい。

パッケージングエクストラクト調製の準備：

菌株：

NM759 [*recA56*,  $\Delta$ (*mcrA*) e14,  $\Delta$  (*mrr-hsd-mcr*), ( $\lambda$ *imm434*, *clts*, *b2*, *red3*, *Dam15*, *Sam7*)/ $\lambda$ ]

BHB2688 [N205 *recA*-( $\lambda$ *imm434*, *clts*, *b2*, *red3*, *Eam4*.*Sam7*)/ $\lambda$ ]

培地・試薬：

NZY 寒天培地(1.5% Agar)：single colony isolation 用

100 ml NZY broth (500 ml 三角フラスコ) ×2：前培養用

500 ml NZY broth (2 l 三角フラスコ) ×2：本培養用

10%(w/v) Sucrose solution：FTL 1 日目、>2 ml/l culture

Lysozyme solution：FTL 1 日目、>200  $\mu$ l/l culture

Sonication buffer：SE、>15 ml/l culture

Packaging buffer：SE、>1.2 ml/l culture, FTL 2 日目、>200  $\mu$ l/l culture

※培地、試薬は全て用時調製。試薬はフィルター滅菌後、氷中で保存する。

・ NZY broth

NZY amine	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2 g

1 N NaOH で pH7.5 に調製し (約 4 ml)、DW で 1 l に fill up 後、

三角フラスコに分注してオートクレーブ。

(1.5 l 調製して 500 ml × 2, 100 ml × 2 に分注し、余りで NZY 寒天培地(1.5% Agar)を作るとよい。)

・ 10%(w/v) Sucrose solution

Sucrose	1 g
1 M Tris-HCl(pH8.0)	500 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	9.5 ml

final 10 ml

・ Lysozyme solution

Lysozyme (冷凍保存)	20 mg
1 M Tris-HCl (pH8.0)	100 $\mu$ l
DW	9.9 ml

final 10 ml

• Sonication buffer

1 M Tris-HCl (pH8.0)	400 $\mu$ l
0.5 M EDTA (pH8.0)	40 $\mu$ l
$\beta$ -メルカプトエタノール	7 $\mu$ l
DW	19.553 ml

final 20 ml

• Packaging buffer

1 M Tris-HCl (pH8.0)	15 $\mu$ l
Spermidine (冷凍保存) (Spermidine trihydrochloride: Sigma S2501)	32 mg
Putrescine (Putrescine dihydrochloride: Sigma P7505)	20 mg
1 M MgCl <sub>2</sub>	50 $\mu$ l
$\beta$ -メルカプトエタノール	5.25 $\mu$ l
0.1 M ATP (pH7.0)	0.75 ml
DW	1680 $\mu$ l

final 2.5 ml

• 1 M MgCl<sub>2</sub>

20.33 g MgCl<sub>2</sub> を H<sub>2</sub>O で 100 ml に fill up し、オートクレーブ。

• 0.1 M ATP (pH7.0) (用時調製)

60.5 mg ATP を 500  $\mu$  l DW に溶かす。1 N NaOH を volume を測りながら加えて pH7.0 に調製 (約 200  $\mu$  l) した後、DW を加えて final 1 ml とする。

機器その他

• インキュベーター (30°C)

寒天プレート培養用

• Water bath (30°C→(65°C)→45°C→39°C)

30°C, 45°C, 39°Cについては、21 三角フラスコ 2 本を振とうできるもの。

• 遠心機、ローター

使用前にローターを冷やしておく。

• 液体窒素

・ 1.5 ml エッペンドルフチューブ  
必要量滅菌しておく。

・ ソニケーター( for SE only)