

PFGE 用にサンプルをアガロースに包埋したものをインサートと呼ぶ。

インサート調整

対数増殖期の細胞を集菌。

TE buffer (10 mM Tris-Cl pH7.5, 1 mM EDTA) で洗浄。

SE buffer (50 mM Tris-Cl pH7.5, 50 mM EDTA, 1 M sorbitol) 中、0.2 mg/ml Zymolyase を加え、36°Cで 30 分インキュベートする(これに、0.2% β -mercaptoethanol を加えることもある)。細胞が完全に spheroplast 化したことを確認し集菌。

spheroplast を 100 mM EDTA, 1.2 M sorbitol に懸濁し 100 mM EDTA, 1.2 M sorbitol を含む 1% 低融点アガロースを等量加え 1.5mm のスペーサーをはさんだ 2 枚のガラス板の間に流し込む。特に断わらない限りこのときの細胞の最終濃度は 5×10^8 cells/ml になるようにする。in situ digestion に用いる時は低融点アガロースとしてとくに Incert (何れも FMC 社製)を用いる。

固化後、5mmx5mm(厚さ 1.5mm)の大きさに切り 250 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl (pH7.5), 1% SDS に浸し 50°Cで 2~3 時間インキュベートする。

500 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl (pH9.5), 1 mg/ml Proteinase K に浸し、50°Cで夜もすがらインキュベートする。これをもう 1 度繰り返した後 4°Cで保存する。

電気泳動には特に断わらない限り 1 レーンに 1 個(5mmx5mmx1.5mm)のインサートを泳動するので 1 レーン当りの DNA 量は約 0.25 μ g である。

PFGE の泳動条件のうち最も重要なパラメーターはパルスタイム(秒)、電圧(V/cm)、泳動時間(時間)の 3 つである。パルスタイム(秒)、DNA 長(kb)、電圧(V/cm)の関係について次の実験式を参考にした。

$$\log_{10}(\text{DNA 長})=0.78\log_{10}(\text{パルスタイム})(\text{電圧})+0.68$$

in situ digestion 法

インサートを 50-200 倍の TE バッファーで 1 時間洗浄する。これをもう一度繰り返した後、50-100 倍の制限酵素を含まない反応バッファーで 1 時間洗浄する。インサート 1 個当り 250 μ l の反応溶液中で酵素処理する。制限酵素は DNA1 μ g 当り 10-20 unit。反応終了後はそのまま電気泳動ゲルにのせる。