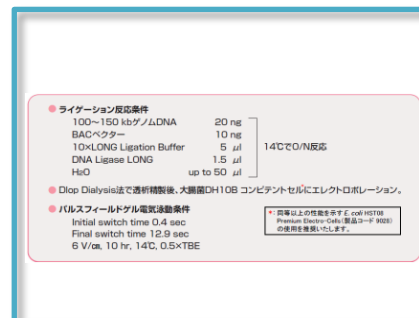


タイトル: 血液サンプルからのBAC Library作製

カテゴリ: クローニング
 キーワード: BACライブラリーの作製、ライゲーション、
 データソース: タカラバイオ株式会社

方法:

10 mlのヒト由来血液から白血球を分取し、DNA plugを調製後、*Bam*H Iを用いて部分消化した。その後100~150 kbのDNA画分をゲルから回収し、TaKaRa DNA Ligation Kit LONG (製品コード [6024](#)) を用いてBACベクター (pCC1BAC、EPICENTRE) に組み込んだ。Drop Dialysis法で精製した後、エレクトロポレーションにより大腸菌を形質転換し、寒天培地上で得られたコロニーからランダムに12個をピックアップした。培養後、アルカリ法でBAC DNAを抽出し、*Not* Iで消化してパルスフィールド電気泳動を行い、インサートDNAの断片を分離・確認した。



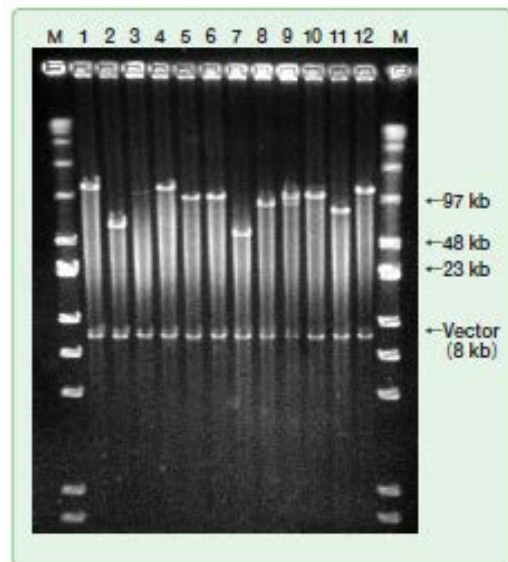
結果:

12クローンの全てにおいてインサートが確認された。
 平均インサートサイズ 約90 kb
 90 kb以上のクローン 9/12 clones (75 %)
 60 kb以下のクローン 1/12 clone (8.3%)

TIPS:

今回の実験により、長鎖DNAのライゲーション反応に最適化されたTaKaRa DNA Ligation Kit LONGを使用することで、これまで難しいとされていたBACライブラリーの作製が効率よく簡便に行えることが確認できた。DNAは長鎖になるほど物理的な衝撃を受けやすいため、ピペッティング時にはチップの先を切ったものを使用してゆっくりと操作することが必要である。また、フェノール抽出やエタノール沈殿はDNAを剪断する原因となるので避ける。

TaKaRa DNA Ligation Kit LONGのパフォーマンスを十分に発揮させるには、物理的に破壊されていないDNAを調製することが重要である。



備考: