

1、スクリーニング等で得たファージプラークを爪楊枝の先で突き刺し新たにトップアガロース（ボトムはアガーを使用）を用い広げた指示菌のうえに1cm四方位に爪楊枝の先をなでつけファージを植え付ける（指示菌はλEMBL系はMRAP2等、λgt22はLE392等のO/NカルチャーをLBで作成、遠心で集菌後元の培地の半分量の10mMMgSO<sub>4</sub>に希釈する。4度で2-3週間は保存できる。O/Nカルチャーを作るときにはとくにマルトース入れなくても大丈夫）。37度で一晩培養。

2、できたラージプラークをブルーチップの裏側で突き刺し200μlのSMにつき抜いたアガープラグを入れ室温で20分放置。

3、新鮮な指示菌のO/Nカルチャー（上記の作り方でなく培養液そのままでもいい）を150μlに加え37度で20分吸着。5mlのLB（含10mMMgSO<sub>4</sub>）を加え37度でできるだけ激しく振盪培養。

4、明確な溶菌が見られるまで（通常3時間から6時間）、ないしは、溶菌が見られないときは6時間後に培養を止め5μlのクロロホルムを入れさらに5分振盪後、3Krpm15分の遠心で菌を落とし上清を保存。この上清1.5ml（もちろん5ml全部保存しておいても構わない）をエッペンドルフに移しファージストック溶液とし4度で保存。

5、4、で得られたファージストック液10μlを再び上記の3、のように新鮮な指示菌のO/Nカルチャーを150μl（あまりにも早く溶菌するときには200μl程度に増やす）に吸着させ4、の操作まで行い5mlのファージ溶菌液を得る（2段階の増幅を連続して行うときは最初の溶菌液を遠心する必要はなく溶菌液そのものを10μl用い2段階目の培養を始める）。ここよりDNAを抽出する。プレートのアガーまたはアガロースの影響が少しでも残ると、いかに丁寧にDNA抽出をおこなっても得られたDNAが制限酵素で切れなくなる。それを避けるため面倒でも上記のように液体で2回（またはそれ以上）の増幅を繰り返す。

6、遠心の済んだ5ml溶菌液に5μl DNase I（1mg/ml）、2μl RNase（10mg/ml）を加えて37度で40-60分保温。

7、100μl、2M ZnCl<sub>2</sub>を加え37度で5分保温後、3Krpm、10分遠心し上清をデカンテーションで捨てる。チューブを逆さまにしたままキムワイプ等の上に置きよく培養液を除く。

8、0.5mlのTES（0.1M Tris-HCl(pH8), 0.1MEDTA, 0.3%SDS）に沈澱を完全に溶かす。0.25μlのProteinase K(20mg/ml)をいれ、60度で15分保温。

9、60 $\mu$ lの5MKOAcを加え氷上に15分置き、3Krpmで15分遠心。上清をエッペンドルフにデカンテーションで移す。

10、等量のPCI（フェノール、クロロホルム、イソプロパノール）を入れよく混和し15krpm、5分遠心後、上層を新しいチューブに移す。

11、等量のイソプロパノールを加えよく混合し室温で15分放置（よく増えている時はこの時点でほこりの様な沈澱がみえる、見えなくても心配いらない）、15krpm、15分遠心しDNAを沈澱させる。

12、70%エタノールで洗った後風乾し50 $\mu$ lのTEに溶解。収量はファージごとに異なるが、通常5 $\mu$ l程度を制限酵素処理に用いればバンドが見える。

#### 付記

あまり入ファージ自体が使われなくなり利用価値は少ないかもしれませんが。

この方法の特徴は高タイターのファージを液体で感染させ増やす事、およびファージの沈澱にZnCl<sub>2</sub>を用いている事です。ZnCl<sub>2</sub>による沈澱はオリジナルではなく、すでに報告があったものの流用です。