

平滑末端クローニング

1. 遺伝子クローニング方法の選択

遺伝子クローニングを検討する際に、操作の簡便さと効率の面で二種類（もしくは一種類）の制限酵素でそれぞれ切断したベクターとインサート DNA を用いた突出末端クローニングがよく選択されます。また、*Taq* DNA Polymerase などのターミナルトランスフェラーゼ活性を有する PCR 酵素で得られた増幅産物は、二本鎖 DNA の 3' 末端に 1 塩基だけ A が付加された形になるため、T ベクターを用いた TA クローニングが有効な選択肢の一つになります。一方、平滑末端になる校正活性を有する PCR 酵素で得られた増幅産物を使用する場合は、制限酵素サイトを持つリンカーを連結させて突出末端クローニングにするか、平滑末端ベクター DNA を用いた平滑末端クローニングが考えられます。

平滑末端クローニングは、目的の遺伝子とベクター DNA に適当な制限酵素サイトがない場合、DNA 末端が平滑であれば配列に依存することなくライゲーションすることができます。

2. 実験の流れ

ここでは、3' 末端に A が付加した PCR 産物を平滑化させて行う平滑末端クローニングの一例を、ニッポンジーンの商品を用いてご紹介します。

1) 平滑化ベクターの用意

平滑末端を作る適当な制限酵素で 1 ~ 10 μg のプラスミド DNA を切断する^{注1)}。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出およびエタノール沈殿で精製する。TE (pH 8.0) で溶解し、~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の DNA 溶液にする。

注1) DNA 溶液の一部をアガロースゲル電気泳動し、切断の程度やおおよその DNA 濃度を確認する。

① 脱リン酸化しない場合

ベクターの 5' 末端にはリン酸が付加しているため、このままライゲーション反応に使用するとセルフライゲーションの割合が多くなります。以下の 1)②のように、リン酸化インサート DNA を用意して、ベクターは脱リン酸化させてセルフライゲーションを減らす方法がありますが、操作が煩雑になるため、あえてバックグラウンドの高さを承知して脱リン酸化をしない方法も実験目的によっては可能です。

② 脱リン酸化する場合

Alkaline Phosphatase^{注2)}で脱リン酸化反応を行います。

平滑末端 DNA (~ 10 μg)	~ 44 μl ^{注3)}
10 × AP Buffer	5 μl
Alkaline Phosphatase	1 ~ 2 μl
Total	50 μl

↓
50°C で 30 ~ 60 分間反応

脱リン酸化反応液	50 μl ^{注4)}
ddH ₂ O	49 μl
0.5 M EDTA (pH 8.0)	1 μl (終濃度 5 mM)

↓
65°C で 30 分間または 75°C で 10 分間加熱

↓
室温に戻してから、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出を 2 回
クロロホルム抽出を 1 回
エタノール沈殿後、TE (pH 8.0) で溶解し ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の DNA 溶液にする。^{注5)}

注2) Alkaline Phosphatase の種類によって最適な反応条件(酵素濃度、温度、時間)と失活方法が異なります。必ず確認してから実験を最適化して下さい。

注3) 脱リン酸化反応の前に、DNA 溶液の一部をライゲーション反応のコントロール用に分取る。

注4) BAP の場合、キレート剤存在下の 100°C の加熱で一時的に失活するが、室温における静置で活性が復活する。CIP と比較して失活しにくい酵素であるため、フェノール/クロロホルム処理も数回必要である。

注5) 調製したベクターは、脱リン酸化の程度を確認してから保存する。

実験の用途によっては、Cloning Vector pTS1 DNA, *Hinc* II Treated (Code No. 301-10131) のようなあらかじめ平滑化と脱リン酸化済みのベクターを購入すると時間の短縮に便利です。

2) PCR 産物の平滑化

Taq のような PCR 酵素で得られる増幅産物は、二本鎖 DNA の 3' 末端に 1 塩基だけ A が付加された形になっているため、T4 DNA Polymerase で平滑化させます。本酵素は、3' → 5' Exonuclease 活性と 5' → 3' Polymearse 活性を持ち、5' 突出末端および 3' 突出末端のどちらの場合も平滑化できます。

Blunting-Convenience Kit (p.131) には T4 DNA Polymerase と dNTPs を含む最適化された 10 × Blunting Buffer が入っていますので、以下のプロトコールでは本キットを使用します。

PCR 産物 (0.1 ~ 10 pmol)	17 μl ^{注6)}
10 × Blunting Buffer	2 μl
T4 DNA Polymerase	1 μl
Total	20 μl

↓
37°C で 5 分間反応させる

↓
平滑化反応液を氷中に置いて反応を停止

すぐに使用しない場合はフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出、エタノール沈殿し、-20°C で保存

注6) 末端を平滑化したい DNA (DNA 末端濃度が 0.1 ~ 10 pmol) を 17 μl 用意します。例えば、pUC19 DNA (2,686 bp) 1 μg は、約 1 pmol of 5' end に相当します。約 1 pmol of 5' end \approx [0.000001 g / (2,686 bp × 660)] × 10¹² × 2

① PCR 産物のリン酸化

脱リン酸化済みのベクターを使用する場合(1)②参照)、ライゲーション反応にインサート DNA の 5' 末端のリン酸基が必須になります。制限酵素で切断させた末端と異なり、普通のプライマーで増幅させた PCR 産物の 5' 末端にはリン酸基が付加されていません。

PCR 産物のリン酸化には、プライマーをリン酸化してから PCR に使用する方法(一本鎖 DNA の 5' 末端 OH 基にリン酸基を付加)と、平滑化した PCR 産物をリン酸化する方法(二本鎖 DNA の 5' 末端 OH 基にリン酸基を付加)のどちらかになりますが、リン酸化反応は、平滑末端よりも一本鎖末端の方が効率良く行えます。

T4 Polynucleotide Kinase を用いたリン酸化のプロトコールは、Phosphorylation (p.441) を参照。

3) 平滑末端ライゲーション

Blunting-Convenience Kit または Ligation-Convenience Kit の 2 × Ligation Mix を使用します。2 × Ligation Mix は、T4 DNA Ligase、ATP、DTT などを含むプレミックスタイプのライゲーション用試薬です。

① DNA 溶液の調製 (モル比の検討)

ライゲーション反応液に持ち込む DNA 溶液の、ベクターとインサートのモル比はライゲーション効率に大きく影響します。以下は、ニッポンジーンで様々な長さのインサート DNA をライゲーション、形質転換した結果、下記の特定の条件で最も良い結果が得られたモル比を示した表です。

<平滑末端>

インサート長	200 bp	600 bp	1,000 bp	3,000 bp
ベクター	1	1	1	1
インサート	5	5	2~10	0.5~2

ベクター：Sma I で切断した pUC19 DNA (0.03 pmol)
 インサート：Sma I で切断したインサート DNA
 (0.015 pmol, 0.03 pmol, 0.06 pmol, 0.15 pmol, 0.3 pmol)
 ライゲーション反応：16°C、5分間

二本鎖 DNA の重量とモル数の簡易換算

$$\text{pmol} = \mu\text{g} \div \text{bp} \times 1,515$$

$$\mu\text{g} = \text{pmol} \times \text{bp} \times 0.00066$$

例) pUC19 DNA のサイズは 2,686 bp なので、0.03 pmol の DNA 重量は 53 ng に相当します。

② ライゲーション反応

インサート DNA	}	
DNA ベクター		
ddH ₂ O		to 10 μ l
2 × Ligation Mix		10 μ l
Total		20 μ l

↓
16°C で 5 ~ 30 分間反応

↓
氷上に反応液を置いて、そのまま形質転換に使用

4) 形質転換

2 × Ligation Mix で反応させた溶液は、そのまま形質転換に使用できます。形質転換に用いる反応液の量はコンピテントセルの 10% 以下にして下さい。反応液の量が 10% 以上になる場合は、ライゲーション反応後、エタノール沈殿によって DNA 溶液を濃縮してからご利用下さい。

また、ニッポンジーンの ECOS Competent *E.coli* を用いると高速 6 分間プロトコルが利用できます (プロトコルは p.158 参照)。ECOS Competent *E.coli* を使用する場合、反応液の量はコンピテントセルの 5% 以下にして下さい。また、6 分間プロトコルは薬剤にアンピシリンを使用した場合にのみ有効です。

5) コロニー PCR

ここでは、M13 系ベクター (pUC19 DNA など) のインサートチェックに Gene RED PCR Mix (p.62 参照) と 2 × M13 Primer Mix (Code No. 312-07651) を使用したコロニー PCR の使用例を紹介します。

必要本数分の Gene RED PCR Mix を 1.5 ml 容チューブに添加し、等量の 2 × M13 Primer Mix を加え軽くピペティングかタッピングで混合し、50 μ l ずつ PCR チューブに分注

Gene RED PCR Mix	25 μ l
2 × M13 Primer Mix	25 μ l
Total	50 μ l

↓
爪楊枝またはチップでコロニーを軽く突き、反応液中で懸濁 (コロニーは多量に持ち込まない)

↓
直ちに PCR を行う

94°C	3 分間	} 25 cycles
94°C	20 秒間	
55°C	20 秒間	
72°C	X 秒間 ^{注7)}	

↓
PCR 後、各反応液の 5 ~ 10 μ l をそのままアガロースゲルにアプライし、電気泳動^{注8)}

注7) X 秒間 = インサート DNA 1 kbp あたり 10 秒間。1 kbp 以下の場合は 10 秒間にします。

注8) Gene RED PCR Mix には Loading Dye と Glycerol が既に含まれているため、PCR 終了後の溶液をそのまま電気泳動に使用できます。

主な M13 系ベクター (no insert) の PCR 増幅産物サイズ

pUC18/19	121 bp	pGEM-T easy	250 bp	pT4Blue2	388 bp
pBluescript II	247 bp	pT7Blue	172 bp	λ ZAP II	244 bp

文 献

1) Michael R. Green and Joseph Sambrook : “*Molecular Cloning*”, A Laboratory Manual, 4th ed. (2012)