

私にもできた

● ライフサイエンス実験シリーズ ● ● ● VOL.1

# LIFE SCIENCE SERIES

## PCRを用いる 遺伝子クローニング編

### はじめに

技術の多様化にともなって、日々の研究におけるライフサイエンス研究用試薬・キットの占める役割はますます高まっているのではないのでしょうか。その中で、今回の実験にはどういう種類の試薬を使ったら良いのか、また、この用途に一番ぴったりくる試薬はどの試薬なのかなど、パンフレットやカタログの山を眺めつつ頭を悩ますことも多いかと思えます。このシリーズは、そうした情報をひとまず整理し、初心者の方にも分かりやすく効果的にライフサイエンス実験を解説できないか、との趣旨から企画されました。

弊社ライフサイエンス事業部では、今日まで様々なライフサイエンス研究用試薬を開発し、先生方に供給するという重要な役割の一部を担わせていただいております。また当然ではありますが、弊社研究員も東洋紡製品を用いて日々の研究に取り組んでおります。入手の簡便さから、我々研究員の自社製品の使用頻度は高く、研究員の中で様々な工夫がなされてきています。しかし残念ながら、それらのほとんどが社内止まりの状況にあります。

そこで今回、研究員の実験のノートなども参照しながら、市販のノウハウ本や実施例集ではカバーできなかったような『生の事例』を紹介することで、より身近にライフサイエンス実験を感じていただければと考えています。

その第一回目として今回は、『PCRを用いる遺伝子クローニング』を取り上げさせていただきます。ポストゲノム時代と呼ばれる昨今ですが、意外とDNAを扱う実験が多いという研究者の方が多いのではないのでしょうか。また、ポストゲノム時代になってから、初めて遺伝子実験をされるような方もいらっしゃるはずですが、本稿が、そのような研究者の方々の一助になれば幸いです。



T社バイオ研究所



研究所の近くの海辺の風景

TKさん  
チームリーダー



A子さん  
T社 新人研究員

# 1 どの酵素を使ったらいいの？

## —PCR用酵素とその特徴—

遺伝子のソースや情報が簡単に入手できるようになり、材料さえあればPCRを使って2、3日で目的遺伝子を(サブ)クローニングできる時代になりました。また、プラスミドのインサートのチェックやシーケンス解析も、PCRをうまく用いることで飛躍的にスピードアップさせることができます。PCR法の出現により、今まで煩雑だった作業が飛躍的に効率化され、本当に便利になりました。

一方、PCRに用いられる耐熱性ポリメラーゼの種類は年を追うに従って多様化し、一見とても複雑になりました。当然、それぞれの耐熱性ポリメラーゼには得手不得手があり、うまく実験を進めるためにはそれぞれの用途にピッタリあった酵素を選択する必要があります。そのあたりが特に初心者の方に分かりにくくなっているようです。それは、メーカーの責任かも知れません。酵素の特徴を的確に見分けるためには、それぞれのポリメラーゼの性質を少し知っておくと便利です。

### 1-1 PCRに用いられるポリメラーゼには大きく分けて2種類ある

現在PCRに用いられている酵素は、高度好熱性の細菌(主に *Thermus* 属)、もしくは超好熱アーキア(主に *Thermococcus* 属や *Pyrococcus* 属などの Euryarchaeota) 由来の耐熱性ポリメラーゼです。前者で有名な酵素は、TaqやTth DNAポリメラーゼ、後者で有名な酵素は、KODやPfu DNAポリメラーゼなどです。

配列のホモロジーからDNAポリメラーゼは少なくとも6つのファミリーに分類されますが、高度好熱性細菌から分離されたポリメラーゼは大腸菌の Polymerase I と同じグループ(Aファミリー)に、アーキアから分離されたポリメラーゼは真核生物の Polymerase  $\alpha$  や、 $\delta$ 、 $\epsilon$  などと同じグループ(Bファミリー)に分類されます。それぞれ PolII型、 $\alpha$  型と呼ばれることもあります。同じファミリーに分類されるポリメラーゼは系統樹解析では近くにプロットされますが、酵素の性質や役割は様々です。とはいっても耐熱性ポリメラーゼの中では、同じファミリーに分類される酵素は似たような性質を示すので、酵素を選択するときの指標になります。

### 1-2 ポリメラーゼの正確性の鍵は？ — 3'-5' エクソヌクレアーゼ活性 —

DNAポリメラーゼの性質を大きく左右する活性は、『3'-5'エクソヌクレアーゼ活性』です。これは校正活性ともよばれ、PCRの正確性に大きく寄与します。アーキア由来のBファミリー酵素(KODやPfu DNAポリメラーゼ)は強い校正活性を有しています。一方、好熱細菌由来のAファミリー酵素(TaqやTth DNAポリメラーゼ)は、この校正活性を欠いています。よって、PCRに正確性を求める場合は、Bファミリーの酵素を使う必要があります。ただ、残念ながら一般的に校正活性を有する酵素のPCR効率は校正活性をもたない酵素に比べ低い傾向にあります。最近の酵素ではこれらの欠点を克服するための様々な改良が加えられており、それらを用いることでかなり効率的に正確性の高いPCRを行うことが可能になっています。弊社の製品としては、『KOD -Plus-』や『KOD -Plus- Ver.2』がそれに相当します。これらの酵素には常温でポリメラーゼ活性や校正活性によって予期せぬ反応が起きないように、それぞれの活性を中和する抗体が混合されています。これらの抗体はPCRの変性段階で変性し、PCR反応は阻害しません。



また、紛らわしいのですが、校正活性を欠損させた(exo-)のBファミリー酵素も種々販売されています。これらはBファミリー由来でも正確性はまったく良くありません。ご注意ください。

### 1-3 TdT活性と校正活性は共存しない？

TaqやTthなどのAファミリーのPCR酵素は、terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)活性を有しています。この活性は、増幅したDNAの3'末端にアデニンなどを一塩基付加する活性です。この性質を利用したクローニング方法がいわゆるTAクローニングです。一方、上述したBファミリーのPCR酵素は、TdT活性で塩基付加を起こしたとしても、結果的に校正活性が強くそれを削ってしまいます。よって、このPCR酵素で増幅したDNAの末端は平滑末端(ブランチエンド)で、そのままでは当然TAクローニングすることはできません。逆に、TaqやTth DNAポリメラーゼで合成したDNAはブランチエンドライゲーションの効率が著しく低くなっていますので、注意が必要です。



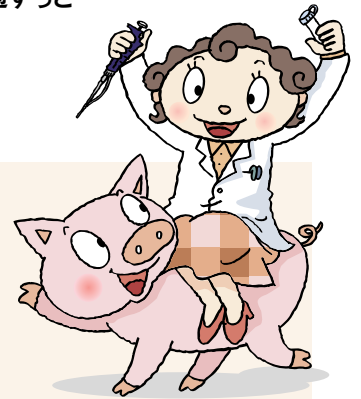
### 1-4 混合型の酵素って？

校正活性のない酵素に校正活性を有する酵素を微量混合することで、長いターゲットのPCR効率が向上する現象が報告されています。誤って取り込まれた塩基の一部を校正活性によって修復することが、効率の向上につながっているようです。その原理を応用したのが混合型の酵素です。弊社の酵素でいうと、『KOD Dash®』や『Blend Taq®』がそれに相当します。KOD Dash®は校正活性を欠損させたKOD DNAポリメラーゼと(exo+)KOD DNAポリメラーゼの組み合わせ、Blend Taq®はTaq DNAポリメラーゼと(exo+)酵素の組み合わせです。KOD Dash®はKOD DNAポリメラーゼの特徴を生かした高速PCR、Blend Taq®は通常のTaqでは難しいターゲットの増幅などに用いることができます。ただ、これらの酵素へ混合されている(exo+)の酵素は微量ですので、増幅の正確性では上で紹介した100%校正活性を有する酵素には及びません。その証拠にこれらの酵素によって増幅されたDNA断片はTAクローニングすることが可能です。

# 2 実践！遺伝子クローニング

A子さんは今年T社バイオ研究所のライフサイエンス試薬開発グループに配属された新人研究員です。数ヶ月間の基礎研修を終え、本来ならばすぐに配属が決まるところですがA子さんは、大学で少し異なる分野の研究を行っていたため、これから試薬を開発するにあたって、しばらく様々なチームで研修をすることになりました。まずは、プロテオミクス研究チームで数ヶ月間研修をおこないます。

早速、チームリーダーのTKさんからは、A子さんに下のような課題が出されました。TKさんは今週ずっと出張なので、A子さんはその間に実験プランを立てることになりました。皆さんもA子さんと一緒に考えてみてください。



## 課題:

- **ブタ組織由来のmRNAをソースとして、Porcine citrate synthase (アクセッションNo.M21197)のオープンリーディングフレーム(ORF)を無細胞タンパク質合成用のpEU3-NIIベクターにクローニングすること。**
- **シーケンス確認後、大腸菌発現用のpETベクターに遺伝子を移し変えること。**

**条件** : シグナルペプチド部分を除いたクローンを構築すること。

**ヒント** : pEU3-NIIベクターのEcoR Vサイト(平滑末端を生じる)をうまくつかうこと。

## ベクターのマルチクローニングサイト(MCS)情報:

⇒**pEU3-NIIベクター**\*:Ω配列(翻訳増強配列)の直下にMCS(EcoRVを頭にBamHIやNotIサイトなどがある)を有し、そのどこかにORFを挿入する。翻訳開始点はΩ配列の近くが好ましいが、それほどシビアではなく、またフレームをあわせる必要もない。

⇒**pETベクター**:RBS(リボゾームバインディングサイト)の直下にNdeI-BamHIもしくはNcoI-BamHIをクローニングサイトとしてもつ。NdeIもしくはNcoIの認識配列中のATGが翻訳開始点となるようにする必要がある。

\*無細胞タンパク質合成キット「PROTEIOS™ Ver.2」専用のベクターです。

まずA子さんは、DDBJのホームページ(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>)にアクセスして配列をダウンロードし、解析ソフトを用いてORFの情報を変換しました。また、どの部分がシグナルペプチドに相当するかも調べました(図1下線部)。A子さんの戦略はpEU3-NIIベクターのEcoRVサイト(平滑末端)にKOD-Plus-(Code No:KOD-201)を用いて増幅したDNA断片をそのままブランエンドライゲーションをするというものです。プライマーの設計では、きちんと開始コドンのATG(赤字)も入れましたし、ミスマッチがある分上流プライマーを少し長めに設計しました。後々、pETベクターに移し変えることも考えると、制限酵素サイトを入れたプライマーを設計する必要があるのかとも考えましたが、どれくらい発現している遺伝子がよく分からなかったため、まずpEU3-NIIにクローニングしてから、それをPCRでさらに加工してpETベクターに移し変えようと考えています。A子さんは早速プライマーを発注しました。

プライマーは水曜日には届いたので、A子さんは既に受け取っていたブタ組織由来のPoly(A)<sup>+</sup>RNAの逆転写物をKOD-Plus-を用いて増幅してみることにしました。結果、なんと一回できれいな増幅がみられました。

この成功で勢いを得たA子さんは同じチームの先輩AKさんに試薬の場所を教わりつつ、翌日にはpEU3-NIIベクターとDNA断片のライゲーション反応を終え、その日の夕方には大腸菌JM109株への形質転換まで終了させてしまいました。ベクターは、AKさんがEcoRVカットし精製したものを持っていたので、それを少し分けてもらいました。A子さんはなかなか戦力になりそうです。

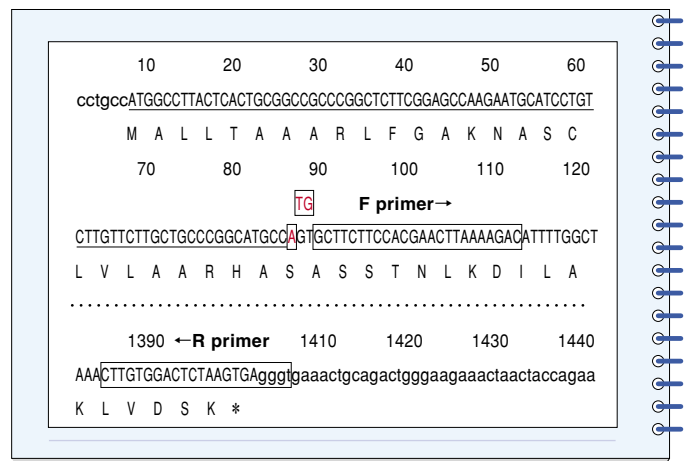


図1 M21197のcDNA配列、アミノ酸配列、およびA子さんが選んだPCRプライマー配列(□)。



## 2-1 あれ？なんでコロニーが・・・。

### — 脱リン酸化処理とプライマーリン酸化の関係 —

翌日、A子さんは出社するといち早くインキュベーターに向かいコロニーをチェックしました。しかし、何度もプレートに光にかざして確認しましたが、ほとんどコロニーはありません。がっかりです。こんな日に限ってAKさんはどこへ行ったのか見当たりません。

翌週、A子さんは使った試薬をすべてチェックするように指示を受めました。そして一時間後、原因がわかりました。A子さんが先輩からもらったEcoRV切断したベクターは、セルフライゲーションを防止するためにアルカリホスファターゼ(AP)によって脱リン酸化されたものでした。A子さんはそれを知らずに、そのベクターに普通のプライマーを使って増幅したPCR産物をライゲーションしてしまったのでした。これではうまくいけません。

そもそも、ライゲーション反応が成立するには、少なくとも一方のDNAの5'末端がリン酸化されている必要があります。一般的な制限酵素切断で生じるDNAの5'末端はリン酸が付加された状態になっています。一方、通常PCRに使われるプライマーの5'末端はリン酸化されていません。PCR法はかなり一般化していますが、このような基本的なことをついつい忘れがちです。

今回A子さんは、リン酸化プライマーを用いてPCRするか、多少のセルフライゲーションを覚悟でアルカリホスファターゼ処理していないベクターを用いる必要がありました。

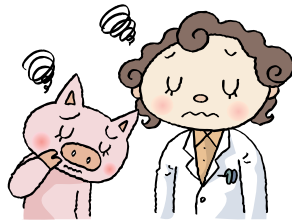
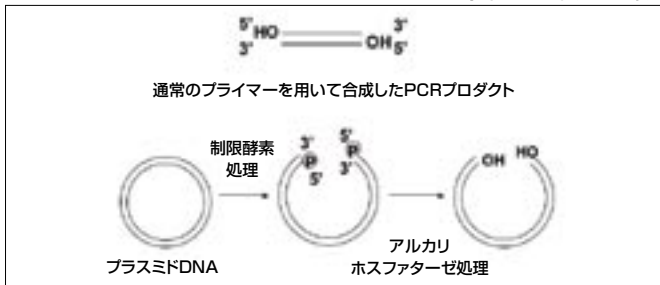


図2 DNA末端のリン酸化の有無



## 2-2 プラントエンドは意外と便利

### — 方向性を持たせたクローニング —

TKさんは次のようなプライマーを提案しました。

```

        TG F primer→
61:..... CTTGTTCTTGCTGCCCGGCATGCCAGTGCCTTCCACGAACCTAAAAGACATTTGGCT
        L V L A A R H A S A S S T N L K D I L A
        NcoIサイト
        .....
        ←R primer  GGC
1381: AAAC TTGTGGACTCTAAGTGAgggtgaaactgcagactggaagaaactaactaccagaa
        K L V D S K * BamHIサイト
    
```

### 図3 戦略-A

目的のmRNAがある程度発現している場合の戦略。  
pETベクターのNcoI-BamHIサイトに移し変える事を念頭においてNcoIサイトとBamHIサイトをプライマーに挿入した。  
BamHIサイトは、PCRプロダクトの段階で切断する必要があるため、配列の外側に少なくとも1つ以上塩基が必要。

```

        TG F2 primer→
61:..... CTTGTTCTTGCTGCCCGGCATGCCAGTGCCTTCCACGAACCTAAAAGACATTTGGCT
        L V L A A R H A S A S S T N L K D I L A
        NcoIサイト
        .....
        ←R2 primer  GGC ←R1 primer
1381: AAAC TTGTGGACTCTAAGTGAgggtgaaactgcagactggaagaaactaactaccagaa
        K L V D S K * BamHIサイト
    
```

### 図4 戦略-B

目的のmRNAの発現量が少ない場合の戦略。  
F1とR1の増幅産物を1/50量持ち込んで、さらにF2とR2で増幅する(Nested PCR)ことで、感度および特異性良く増幅可能。勉強のため、F2とR2のプライマーデザインは上のものと少し変えてみた。Nested PCRの場合、最初の増幅は100%マッチのものを使うことができるのがメリットである。

### ワンポイントメモ ①

制限酵素の選定にあたっては、インサート配列中にその制限酵素がないかの確認が必要です。上の例では、配列中にNdeIサイトがあったため、NcoIを選定しました。ただ、NdeIの方が便利な場合の方が多いようです。ちなみにNcoIとNdeIは認識サイトにATG配列を含む代表的な制限酵素です。

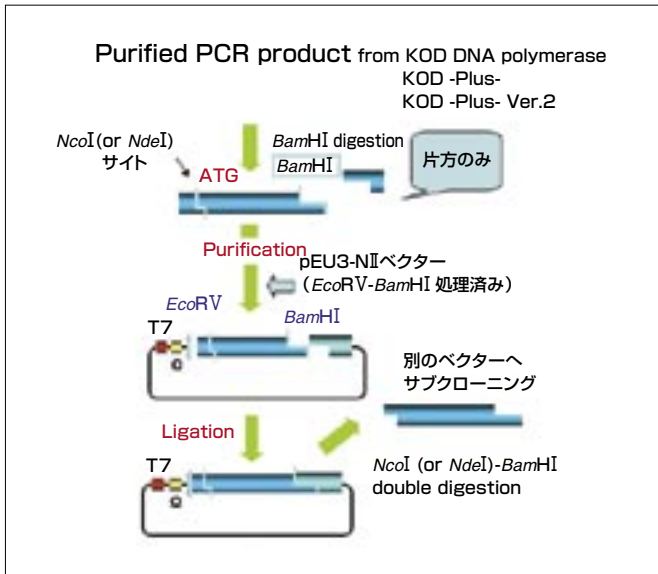
### ワンポイントメモ ②

プライマー設計の理想は20~24mer(GC: 50~60%)で、ミスマッチ塩基がある場合、その分だけ特異的配列部分を長く設定します。この手法を応用して、短いタグ配列や組換え配列などを仕込むこともできます。C末端側にタグを仕込むときには、終止コドンを忘れずに!

最初A子さんには少し理解できませんでしたが、図5をみた瞬間なるほどと理解しました。この方法だとプライマーをリン酸化しておく必要もありませんし、ベクターのセルフライゲーションもありません。

また、たいていのベクターには平滑末端を生じる制限酵素サイトがあるので、例えば取扱いの簡単なpUC18/19やpBluescript®に一度ベースキャンピング的に遺伝子をクローニングしてシーケンスを確認し、そこから目的の配列を制限酵素で切り出して、本命のベクターにつながる使い方をしてもおそらくとても便利です。当然、他のベクターからPCRを用いてインサートを移し変えるようなときにも使えそうです。

また最低、片方だけに制限酵素サイトを入れておけば良いので、両端を制限酵素処理しなければならない方法よりも絶対簡単です。A子さんは、学生時代DNA断片末端の制限酵素処理でかなり苦戦した経験があります。



**図5 セミプラントライゲーションの一例 (戦略-A, Bの場合)**  
必ず導入しなければならない制限酵素サイトは一箇所だけです(この場合 *Bam*HI)。あとは場合によって、自由に設定します(この場合 *Nco*I)。ベクターは平滑末端と付着末端を形成する制限酵素で切断しておきます(上の場合、*Eco*RVと*Bam*HI)。

### ワンポイントメモ ③

DNAの末端に制限酵素サイトがある場合、制限酵素の種類によっては切断性はかなり低下します。一般的にはその外側に2塩基ほど余分な配列を付加することにより解決しますが、それでも切断性の低い酵素も存在します。NEW ENGLAND Biolabs社のカタログのAppendixに末端の切断性の情報が掲載されているので、それを参考にすると便利です。

末端切断性の悪い酵素(図5では*Nde*I)を末端に設計し、PCR増幅後その末端を切断して目的サイトにライゲーションするような実験をすると学生時代のAさんのように困難を極めることになります。セミプラント法はそのような場合にも便利です。

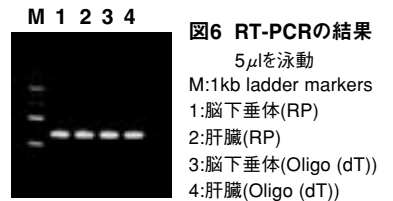
## 2-3 逆転写反応—PCR

Aさんは、TKさんのノートに書き込まれているプロトコルを参考にして一通り実験することにしました。実際にうまくいったプロトコルなので、安心してトレースすることができそうです。また、周りにはこれらのキットを開発した研究員の先輩達もいますので、いろいろと相談のってくれるはずですよ。

まず、ブタの脳下垂体と肝臓からAGPC法およびOligo (dT) ビーズ法にて精製したpoly (A)<sup>+</sup> RNAを材料として、逆転写反応を行いました。Oligo (dT) ビーズを用いるpoly (A)<sup>+</sup> RNAの精製には、MagExtractor™-mRNA-(Code No.NPK-801)を用いましたが、今回、詳細は割愛します。逆転写反応は、プロトコル#1に示したようにReverTra Ace -α® (Code No.FSK-101)を用いました。

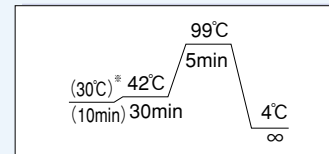
この試薬に使われているM-MLV RT (ReverTra Ace®)は、点突然変異により野生型酵素のRNaseH活性を低減し、かつ伸長性と耐熱性を向上させた改良型逆転写酵素です。TKさんはいつも、添付のランダムプライマー(RP)およびoligo (dT) プライマーを両方試すようにしているようです。

逆転写反応は直ぐ終了するので、その間にPCRの準備をします。今回は、前回既に十分に増幅がみられることを確認していたので、戦略-Aのプライマーを用いて増幅反応を行うことにしました。反応は、プロトコル#2に従い、アニーリング温度55°C、伸長時間を1.5分、35サイクルの条件でトライします。サンプルは逆転写反応液1μlをそのまま直接使います。この1μlというのがコツです。入れすぎてもあまり良いことはありません。PCRの結果、図6に示すようなきれいな増幅を認めました。これで一安心です。これらPCRプロダクトの末端はすべて平滑末端になっているはずですよ。



### 【プロトコル#1】ReverTra Ace -α®を用いるRT反応

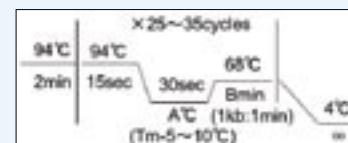
試薬	添加量
RNase Free H <sub>2</sub> O	11-Xμl
5×RT Buffer	4
Random primer (25pmole/μl) or oligo (dT) primer (10pmole/μl)	1
dNTPs	2
RNase inhibitor	1
Poly (A) <sup>+</sup> RNA (10~100ng) or Total RNA (10~1000ng)	X
ReverTra Ace® (逆転写酵素)	1
Total	20



\*Random primerを用いる場合に行います。

### 【プロトコル#2】KOD -Plus-を用いるPCR

試薬	添加量	( ) samples	✓
DW	33μl	( )	<input type="checkbox"/>
10×PCR Buffer for KOD -Plus-	5	( )	<input type="checkbox"/>
2mM dNTPs	5	( )	<input type="checkbox"/>
25mM MgSO <sub>4</sub>	2	( )	<input type="checkbox"/>
Forward primer (10pmole/μl)	1.5	( )	<input type="checkbox"/>
Reverse primer (10pmole/μl)	1.5	( )	<input type="checkbox"/>
KOD -Plus- (1U/μl)	1	( )	<input type="checkbox"/>
49μlずつ分注			
Genomic DNA (10~200ng)		1	<input type="checkbox"/>
Plasmid DNA (1~50ng)			<input type="checkbox"/>
逆転写反応溶液			<input type="checkbox"/>
Total	50		<input type="checkbox"/>



### ワンポイントメモ ④

増幅が見られなかった場合、二つの対策が考えられます。一つは、戦略Bに示したように、Nested PCRを行います。方法は簡単で、一度外側のプライマーで増幅した溶液1μlをサンプルとして、内側のプライマーで増幅します。それぞれのサイクル数は合わせて50サイクル前後が目安です。もう一つの対策は、DMSOの添加です。2~5%の添加で劇的に増幅がみられるようになります。DMSO添加によりポリメラーゼの正確性の低下がないことは確認しています。また、KOD -Plus- Ver.2を用いることも解決策の一つです。

## 2-4 PCRプロダクトの精製—ライゲーション

次に、A子さんはPCRプロダクトの精製を行うことにしました。精製には、MagExtractor™-PCR & Gel Clean up-(Code No.NPK-601)を用います。このキットは磁性ビーズへのDNAの吸着を利用して反応液やアガロースゲルから簡単にDNA断片を精製するキットです。磁性スタンド『Magical Trapper(Code No.MGS-101)』が必要ですが、一つ持っておくとMagExtractor™シリーズといわず磁性ビーズを利用する試薬すべてに応用できるので、重宝します。

PCRプロダクトは約45μl残っていたので、その全量をプロトコール#3に従って精製しました。溶出時の滅菌水は45μlとし、40μlを回収しました。回収したPCRプロダクトと挿入用のベクター(pEU3-NII)はプロトコール#4に従って、処理しました。

**【プロトコール#3】DNA断片の精製(節約バージョン)**

DNA溶液(～50μl)  
or アガロースゲル(～0.15g)

← 吸着液(200μl)  
＜ゲルは完全に溶解を確認する＞

← 磁性ビーズ(15μl)

2min吸着(ボルテックス)

磁性スタンドによる固液分離(B/F分離)

上清 ← 洗浄液(300μl)

10secボルテックス  
B/F分離

上清 ← 75%エタノール(1ml) ×2回

10secボルテックス  
B/F分離(デカンテーション)

軽くスピンドウン

エタノールを完全に除去  
蓋を開けて55℃、5min乾燥

← 滅菌水、ボルテックス  
(用途により適当な  
液量で溶出する)

B/F分離  
精製DNA溶液

**【プロトコール#4】制限酵素処理**

＜PCRプロダクトの切断＞

試薬	添加量
精製DNA断片	40μl
10×Buffer*	5
制限酵素1(e.g. BamHI)	5
Total	50

＜ベクターの切断＞

試薬	添加量
DW	37.5μl
10×Buffer*	5
ベクター-DNA(0.2μg/μl)	2.5
制限酵素1(e.g. BamHI)	2.5
制限酵素2(e.g. EcoRV)	2.5
Total	50

\*推奨バッファの種類にご注意ください。  
→37℃、1h反応

M 1 2 3

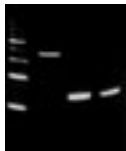


図7 制限酵素処理後精製したDNA断片

M : 1kb ladder markers  
1 : pEU-3NII <EcoRV-BamHI>  
2 : 脳下垂体(oligo(dT)) <BamHI>  
3 : 肝臓(oligo(dT)) <BamHI>  
(2, 3 : PCRプロダクト)

### 【プロトコール#5】ライゲーション

試薬	添加量
ベクター	Xμl
インサート	(3-X)
Ligation high	3
Total	6

→16℃、1hr反応  
ベクターとインサートのモル比は  
1 : 3～1 : 10程度をお奨めします。  
用いるベクター量としては  
5～50ng程度が適当です。

### 【プロトコール#6】形質転換

試薬	添加量
コンピテントセル	30μl
Ligation 反応液	1～3
軽く混合し、氷上30min	
42℃、30sec	
氷上2min	
SOC培地添加	270
37℃、1h(回復培養)	
50～100μlを植菌	

制限酵素処理したDNAは、再度プロトコール#3に従って精製しました。今度は、少し濃い目のDNAが回収したいので、溶出は15μlの滅菌水で行いました。そのうちの、2μlを確認のために電気泳動解析を行いました(図7)。その日、A子さんは、そのままライゲーション(プロトコール#5、ベクター:インサート=1μl:2μl)とJM109株を用いた形質転換(プロトコール#6)まで行って帰宅しました。

## 2-5 とことん楽しよう!

### —コロニーダイレクトPCRと直接シーケンス—



翌日、A子さんは無事たくさんのコロニーを確認することができました。ただ、これらのコロニーすべてにインサートが挿入されているわけではありません。確認が必要です。

研究所では、ほとんどの人がKOD Dash®(Code No.LDP-101)を用いるコロニーダイレクトPCRでインサートの確認を行っています。方法は図8に示すとおりです。まずコロニーをチップ先端でつついてプレーティングした後、PCR溶液を30μlずつ分注したPCRチューブに立てて行きます。最後に、チップを抜き蓋をしてPCRを開始します(プロトコール#7参照)。今回用いたプライマーの配列(ベクター上に設計)は割愛しますが、アニーリング温度60℃、伸長時間は45秒でPCRを行いました。KOD Dash®の特徴は、1kbの伸長時間が約30秒と非常に短い点です。コツとしては、コロニーのピックアップに爪楊枝ではなくチップ(好ましくはクリスタルチップ)を用いることと、菌をPCR溶液に持ち込み過ぎないことです。

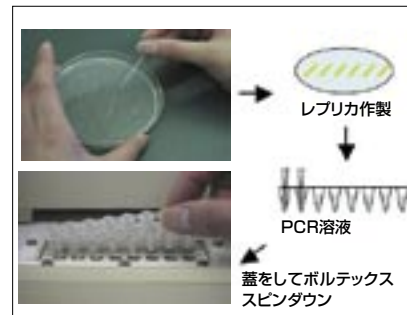


図8 コロニーダイレクトPCRの流れ

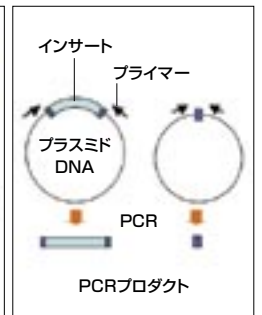
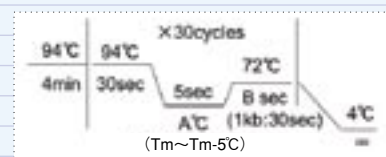


図9 インサートチェックPCRの原理

### 【プロトコール#7】KOD Dash®を用いるコロニーダイレクトPCR

試薬	添加量	( ) samples	✓
DW	23μl	( )	<input type="checkbox"/>
10×PCR Buffer	3	( )	<input type="checkbox"/>
2mM dNTPs	3	( )	<input type="checkbox"/>
Forward primer(10pmole/μl)	0.35	( )	<input type="checkbox"/>
Reverse primer(10pmole/μl)	0.35	( )	<input type="checkbox"/>
KOD Dash®(2.5U/μl)	0.3	( )	<input type="checkbox"/>

30μlずつ分注





脳下垂体 (oligo (dT))    肝臓 (oligo (dT))

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



図10 コロニーダイレクトPCRの結果

結果、図10に示すような増幅パターンが得られました。かなりの高確率でインサートが挿入されていたようです。ここで、通常ならばプラスミドを精製して、シーケンス解析をするところですが、この研究員は増幅産物をプロトコール#3に従って精製し(15 $\mu$ lの滅菌水で溶出)、その一部(2~4 $\mu$ l程度)を鋳型としてシーケンス解析を行っているようです。シーケンスには、インサートチェックで用いたプライマーをそのまま用いることができます。A子さんは、勢いによって夕方までにサイクルシーケンス反応を終了し、シーケンサーにサンプルをセットしてしまいました。翌朝、A子さんはシーケンスファイルを確認し、どのクローンもエラーなくクローニングできていることを確認しました。

次に、A子さんはpETベクターにサブクローニングを行うために、配列確認の終わった大腸菌クローンを培養しプラスミド抽出を行いました。そして、その約1 $\mu$ gを20 $\mu$ l反応系でNcoI-BamHI処理し、少し大きめのコームで作製した1%アガロースで電気泳動しました。pETベクターも同様です。その後、UV照射下で、ゲルから目的とするバンドをメスで切り出し、プロトコール#3に従って今度はアガロースゲルからDNA断片を精製しました。溶出は、ロスも考えて10 $\mu$ lで行いました。回収したDNA溶液2 $\mu$ lを用いて電気泳動したのが、図11です。A子さんはこの断片を用いてLigationおよび形質転換を行い(プロトコール#5・#6)、ついにpETベクターへのサブクローニングまでを一気に完了させてしまいました。やはり、A子さんはかなり優秀なようです。

週末、A子さんは近くの海辺にきています。秋を迎え、少し涼しく感じられるようになった風を受けてA子さんは少し新鮮な気持ちになりました。今後の活躍が楽しみです。

M 1 2

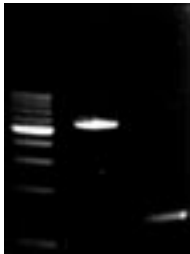


図11 ゲル切り出し後精製したDNA

M: 1kb ladder markers  
1: pET-11d (NcoI-BamHI)  
2: Citrate synthase (NcoI-BamHI)

ワンポイントメモ ⑤

ゲルからのDNA切り出しのコツは、UVを照射しすぎないことです。できる限り長波長で出力の低いUVをあて、迅速に切り出しを行うことにより効率を向上させることができます。トランスイルミネーター上に直接ゲルを置いて切り出すような事は厳禁です。必ずアクリル板などを挟んでください。

2-6 プラントエンドクローニングをするくらいなら  
—TAクローニング—

読者の皆さんの中には、PCRプロダクトを精製なしでクローニングできるTAクローニングがやはり簡単なので、KOD -Plus-等で増幅した平滑末端PCRプロダクトもTAクローニングできないかと言われる方もいらっしゃると思います。そのために開発されたのが、TArget Clone™ -Plus- (Code No.TAK-201)です。このキットの原理は、PCR終了後に残存するKOD DNAポリメラーゼの校正活性を抗体で抑えておき、同時に添加したTaq DNAポリメラーゼのTdT活性でA付加を行うというものです(図12)。Taq DNAポリメラーゼを用いますが、ポリメラーゼ反応は行いませんので、当然、正確性は増幅した時のままです。この方法は、例えば戦略AやBで設計したプライマーを用いて増幅したDNAを直接クローニングするような場合にも有効です。

ちなみに、Blend Taq®やKOD Dash®で増幅したDNA断片(元々末端にAが付加)には、TArget Clone™を用います。こちらはいわゆる通常のTAクローニングですので、詳しく解説する必要はないかと思います。

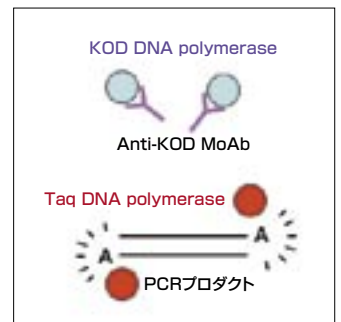


図12 TArget Clone™ -Plus-の原理

【プロトコール#8】  
KOD PCRプロダクトのTAクローニング

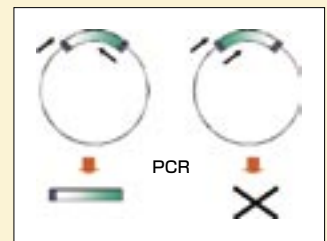
試薬	添加量
PCRプロダクト from KOD	9 $\mu$ l
10x A-attachment Mix	1
60C, 10min	

試薬	添加量
DW	(3-X) $\mu$ l
2x Ligation Buffer	5
pTA2 Vector (50ng/ $\mu$ l)	1
上記反応物	X
T4 DNA Ligase	1
室温 (15~25C) , 30min	
プロトコール#6に従って形質転換	

Vector : PCRプロダクトは1:3以上に設定する。

ワンポイントメモ ⑥

TAクローニングやプラントエンドクローニングにおいて、遺伝子は二方向に挿入されます。インサートチェックPCR時に、ベクター上のプライマーとインサート上のプライマーを用いることにより方向性の確認を行うことができます。方法はプロトコール#7に従ってください。



# Q&A

A子さん

PCRでエキストラバンドが出てしまいます。その産物をそのままクローニングに用いても良いですか？

TKさん

経験上、ゲルから切り出す方が良いと思います。セミブラント法を用いる場合は最初のPCRプロダクト精製の時の溶出量を少なめに、20 $\mu$ 程度で制限酵素処理後、泳動して切り出すと効率的です。TAクローニングの場合はそのまま泳動して切り出します。

A子さん

ゲルから切り出すときにゲル断片がかなり大きくなってしまいました。

TKさん

プロトコール#3は節約バージョンなので、吸着液、磁性ビーズ、洗浄液の量を倍にしてください。

A子さん

TAクローニングの効率を向上させたいのですが、良い方法がありますか？

TKさん

実はアンチセンスプライマーの5'末端の塩基の種類によってTdT活性による塩基付加の効率に差があるようです。TaqやTthでは、末端をAかG、KOD Dash<sup>®</sup>やBlend Taq<sup>®</sup>では末端をAにしたときの効率が良い傾向にあります。以前、HKさんが調べたデータがあるので参照してください。⇒ <http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/olul/upld76/technical/blend76tr02.pdf> (UPLOAD Vol.76 P11~13)

A子さん

KOD-Plus-の反応条件やコツをもう少し知りたいのですが。

TKさん

この記事をご参考にしてください。⇒ <http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/olul/upld57/pickup/kod-plus-57pu01.pdf> (UPLOAD Vol.57 P18~19)

A子さん

KOD-Plus- Ver.2は何が改良されているのですか？

TKさん

PCRの確実性(リライアビリティ)が向上し、また、比較的長いターゲットの増幅効率も改善されています。正確性はほとんどVer.1と同じです。研究所では既にこの酵素のファンが増加中です。



## 製品紹介 (T社バイオ研究所における定番製品)

用途	品名	包装	Code No.	価格
高正確PCR	KOD -Plus-	200U×1本	KOD-201	¥30,000
〃 (さらに高効率)	KOD -Plus- Ver.2	200U×1本	KOD-211	¥32,000
インサートチェックPCR	KOD Dash <sup>®</sup>	250U×1本	LDP-101	¥25,000
正確性の不要なPCR全般	Blend Taq <sup>®</sup>	250U×1本	BTQ-101	¥19,000
〃 (Hot start可能)	Blend Taq <sup>®</sup> -Plus-	250U×1本	BTQ-201	¥21,000
高効率RT	RevaTra Ace - $\alpha$ - <sup>®</sup>	100回用	FSK-101	¥53,000
高効率Ligation	Ligation high	50回用	LGK-101	¥20,000
DNA断片の精製	MagExtractor <sup>™</sup> -PCR & Gel Clean up-	200回用	NPK-601	¥25,000
Poly (A) <sup>+</sup> RNAの精製	MagExtractor <sup>™</sup> -mRNA-	5回用	NPK-801	¥40,000
プラスミドの精製	MagExtractor <sup>™</sup> -Plasmid-	500回用	NPK-301	¥30,000
磁性分離 (磁性スタンド)	Magical Trapper	1個	MGS-101	¥38,000
TA Cloning	TARget Clone <sup>™</sup>	10回用	TAK-101	¥12,000
〃 (KOD/KOD-Plus-専用)	TARget Clone <sup>™</sup> -Plus-	10回用	TAK-201	¥16,000
高効率形質転換	Competent high JM109	0.1ml×10本	DNA-900	¥17,000
高効率形質転換	Competent high DH5 $\alpha$	0.1ml×10本	DNA-903	¥17,000
無細胞タンパク質合成	PROTEIOS <sup>™</sup> Ver.2	20回用	CPS-801	¥98,000

⚠印は消防法に基づく危険物です。本キットのパーツには、消防法における危険物が含まれます。

## TOYOBO 東洋紡績株式会社

PCRは  
東洋紡

ライフサイエンス事業部 (大阪)  
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号  
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833  
(E-mail) order\_lifescience@bio.toyobo.co.jp  
ライフサイエンス事業部 (東京)  
〒103-8530 東京都中央区日本橋小網町17番9号  
TEL 03-3660-4819 FAX 03-3660-4951  
(E-mail) order\_lifescience@bio.toyobo.co.jp

Toyoboテクニカルライン  
TEL 06-6348-3888  
(9:00~12:00 13:00~17:00(土、日、祝を除く))  
FAX 06-6348-3833  
(E-mail) techosk@bio.toyobo.co.jp  
Toyobo Web Site  
[http://www.toyobo.co.jp/bio]

取扱店