

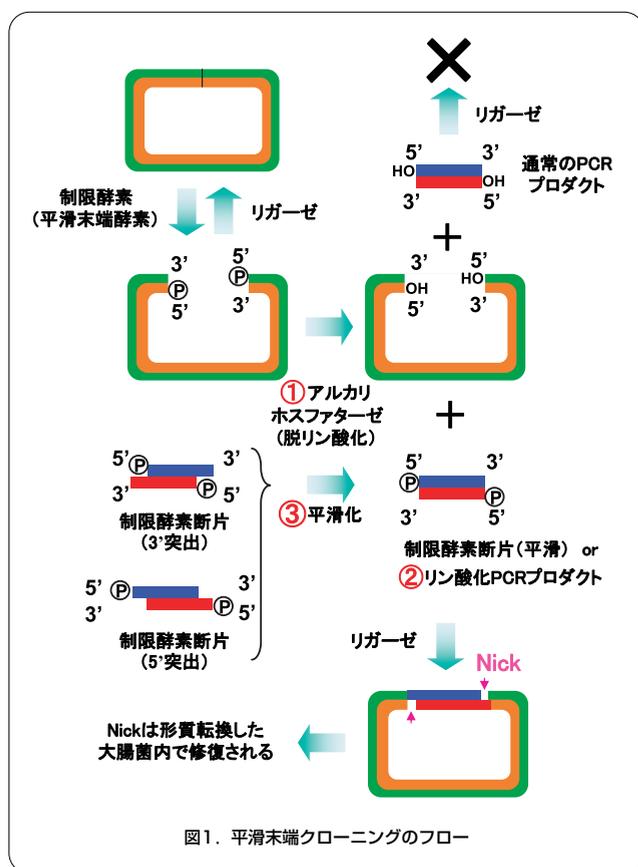
平滑末端クローニング

知っているようで、少し自信がない。本コーナーでは、そのようなプロトコルを詳しく解説いたします。

はじめに

最近、KOD DNA polymeraseなどの平滑末端を生じる高正確性酵素を用いて増幅を行う機会が増え、平滑末端クローニングを行う回数も多くなっているのではないのでしょうか？今回は、そのような平滑末端を有するDNA断片のクローニング方法および周辺技術について詳しく解説いたします。

今回説明する作業を以下のように図式化しました。ここでは、主にこのフロー図に沿って説明いたします。



方法

1. ベクターの脱リン酸化

[*E. coli* Alkaline Phosphatase (Code No.:BAP-111)]

平滑末端サイトを用いてDNA断片をクローニングする場合、ベクターがセルフライゲーションしないようにベクターを脱リン酸化して使用することが一般的です。制限酵素で消化したDNAの5'末端にはリン酸基が残っており、リン酸基を除去することでライゲーションされなくなります。

以下に、*E. coli* Alkaline Phosphataseを用いるプロトコルを示します。この酵素は耐熱性が高く容易に失活しないため、反応後の精製が必要ですが、手間を惜しまなければ最も確実な方

法です。以下に方法をご紹介します。

(1) 制限酵素処理

1~5μgのベクターを、制限酵素を用いて完全消化します。このとき、切れ残りがあると、クローニングの効率が低下しますので、電気泳動で切れ残りが確認できなくなるまで念入りに消化します。精製時のロスを考えて少し多めのベクターでスタートすることをお勧めします。

(2) 精製

アルカリホスファターゼ処理を確実にを行うために精製*を行います。精製後、DNAを80μlの滅菌水中に溶出(溶解)してください。

*精製には、磁性ビーズを利用したDNAフラグメント精製キット「MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up- (Code No.:NPK-601)」が便利です。

(3) アルカリホスファターゼ処理(脱リン酸化処理)

精製DNA溶液 (0.5~2.5μg)	80 (μl)
10×Buffer	10
<i>E. coli</i> Alkaline Phosphatase (0.1~1U/μl)*	10
Total	100 μl

↓
平滑末端、3'突出末端 → 60°C, 60min
5'突出末端 → 37°C, 60min

*目安として5~20pmolesの5'末端に対して2Uですが、添加できる最大量(最終液量の10%)を添加することでほとんどの場合、問題なく脱リン酸化できます。

(4) アルカリホスファターゼ処理後のベクターの精製

〈この精製は必ず行ってください〉

酵素が残留すると以下の実験に大きな影響を及ぼします。実験書などではフェノール/クロロホルム処理が必要であると書かれていますが、MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-*を用いると簡単に精製可能です。

*実験のコツを「私にもできた! ライフサイエンス実験シリーズ Vol.1」に紹介しています:弊社ウェブサイトwww.toyoobo.co.jp/bioの「実験お助けコーナー」でご覧いただけます。

2. リン酸化PCR産物の調製

[T4 polynucleotide kinase (Code No.:PNK-111), rATP (Code No.:ATP-111)]

一般的にPCRに用いられているプライマーの5'末端はリン酸化されていません。よって、KOD -Plus-などの平滑末端PCR産

物*は、そのままでは脱リン酸化処理したベクターにはクローニングすることができません。ここでは、プライマーをあらかじめリン酸化しておいてPCRを行う方法と、PCR産物をリン酸化する方法をご紹介します。

*3'-5'エキソヌクレアーゼ活性(校正活性)を有する高正確性酵素で増幅したDNA断片の末端は平滑化されています。

●リン酸化プライマーを用いる場合

(1) 50pmole/ μ l (μ M)以上のPrimer溶液を準備します。

(2) 以下のように混合、反応させます。

Primer (50pmole/ μ l [50 μ M])	14 (μ l)
10 \times Protruding End Kinase Buffer*1	2
10mM rATP*2	2
T4 Polynucleotide Kinase (5~20U/ μ l) *3	2
Total	20 μ l

↓

37 $^{\circ}$ C, 1h反応

↓

95 $^{\circ}$ C, 5min (T4 Polynucleotide Kinaseを失活)

↓ ← 50 μ l 滅菌ミQ水を添加

10pmole/ μ l [10 μ M] primer溶液として使用します*4*5

↓

高正確性酵素を用いてPCRを行います

*1 T4 Polynucleotide kinaseに添付されています。
 *2 別途準備する必要があります。
 *3 Kinaseは添加できる最大量を添加します(最終液量の10%)。
 *4 このままPCR反応に使用します。
 *5 凍結して何度でも使用可能です。

●PCR産物をリン酸化する場合

(1) 高正確性PCR酵素で増幅したPCR産物を精製します。

(2) 以下のように混合、反応させます。

精製PCR産物 (~1 μ g)	35 (μ l)
10 \times Blunt End Kinase Buffer*1	5
10mM rATP*2	5
T4 Polynucleotide Kinase (5~20U/ μ l) *3	5
Total	50 μ l

↓

37 $^{\circ}$ C, 1h反応

↓

精製*4

*1 T4 Polynucleotide kinaseに添付されています。
 *2 別途準備する必要があります。
 *3 Kinaseは添加できる最大量を添加します(最終液量の10%)。
 *4 MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up- (Code No. NPK-601)を用いることができます。

3. DNA断片のブランディング (平滑化)

[Blunting high (Code No.:BLK-101)]

Blunting highは高効率なブランディングキットです。本キットに用いられているKOD DNA polymeraseは、3'突出部分を削り、5'突出部分を埋める活性を有しています。このキットには、

高効率ライゲーションキット:Ligation highも含まれており便利です。ブランディングのプロトコールは以下のとおりです。

DNA溶液	X (μ l)
10 \times Blunting Buffer	1
KOD (2.5U/ μ l)	1
滅菌水	8-X
Total	10 μ l

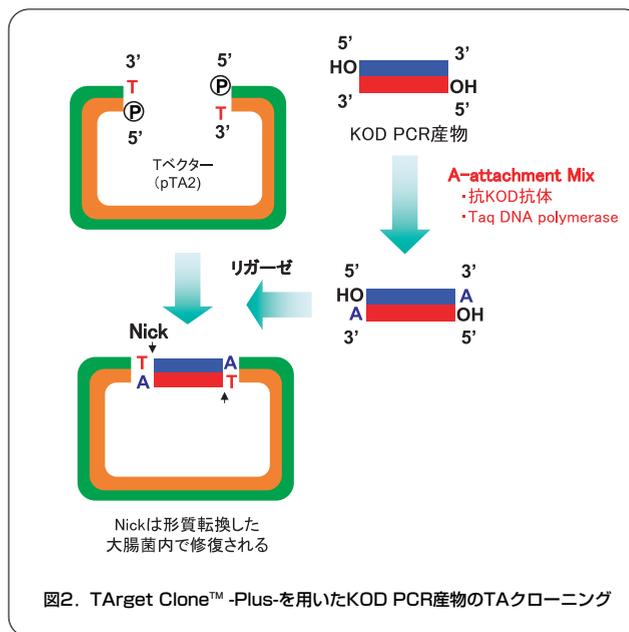
↓

72 $^{\circ}$ C, 2min

4. TAクローニング

[TARget Clone™ -Plus- (Code No.:TAK-201)]

KOD -Plus-やKOD FXなどの高正確性PCR酵素で増幅したDNA断片は、そのままではTAクローニングすることができませんが、TARget Clone™ -Plus-を用いることで、高効率にTAクローニングすることが可能です。原理を図2に示します。抗KOD DNA polymerase抗体でKOD DNA polymeraseの3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を抑えておき、Taq DNA polymeraseのTdT活性によってPCR産物にdAを付加して、そのままTベクターに連結することができます。



PCR産物	9 (μ l)
10 \times A-attachment Mix*	1

→ 60 $^{\circ}$ C, 10min

*Taq DNA polymeraseと抗KOD抗体が含まれます。

DW	(3-X) (μ l)
2 \times Ligation Buffer	5
pTA2 Vector	1
上記反応物	X
T4 DNA Ligase	1

→ 室温, 30min → 形質転換

5.方向性の確認

【Blend Taq® (Code No.BTQ-101)】

平滑末端クローニングやTAクローニングを行った場合、DNAが両方向に挿入されるため、方向性の確認が必要です。インサートの確認は通常、ベクター上に設計したプライマーを用いるコロニーダイレクトPCRなどによって確認しますが、その方法ではインサートの有無だけのチェックしかできません。片方をベクター上、もう片方をインサート上に設計したプライマーを用いるPCRを行うことによって、インサートの有無と同時に方向性を確認することが可能です。以下に、Blend Taq®を用いるコロニーダイレクトPCRの例をお示しします。Blend Taq®はコストパフォーマンスに優れた高性能PCR酵素であり、KOD Dash®とともにコロニーダイレクトPCRに適している酵素です。

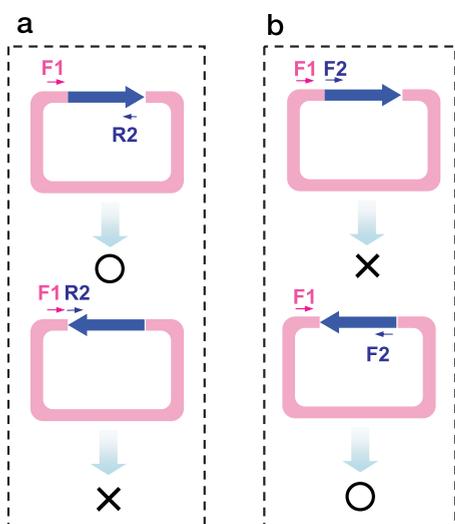


図3. PCRによる方向性の確認

ベクター、およびインサート上に設計したプライマーを用いてPCRを行います。aもしくはbの組み合わせで得られる増幅パターンより方向性を確認できます。

チップを使用。好ましくはクリスタルチップを用いる。



菌体を持ち込みすぎないのがコツ。(菌が見えない程度でOK)



PCR反応

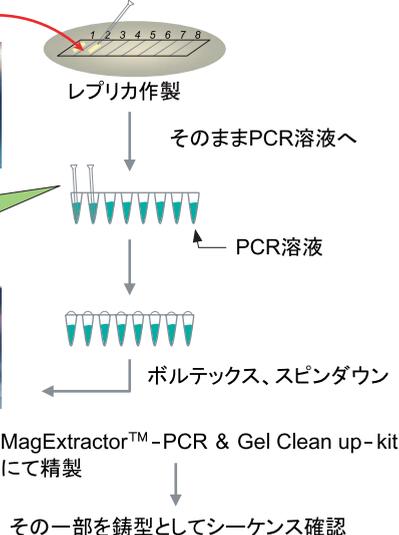


図4. コロニーダイレクト PCRの操作フロー

D.W.	21.9 (μl)
10×Buffer for Blend Taq®	3
2mM dNTPs	3
Forward primer (10pmole/μl)	0.9
Reverse primer (10pmole/μl)	0.9
Blend Taq®	0.3
Total	30 μl

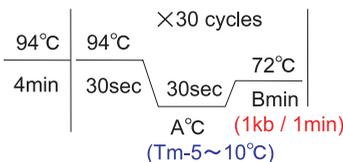


図5に、TAクローニング後にコロニーダイレクトPCRによってインサートの方向性を確認した例をご紹介します。F1-R2、およびF1-F2の組み合わせにおいて、インサートの方向性に依って増幅が認められます(それぞれ相補的な関係になっています)。この方法を用いることで、インサートチェックの段階でクローンを絞り込むことができ、その後の解析をよりスムーズに進めることができます。

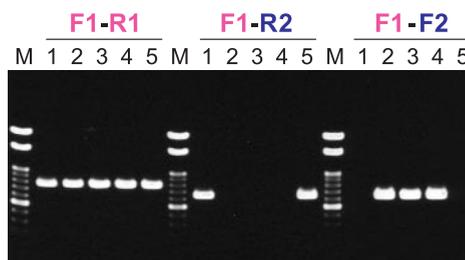


図5. コロニーダイレクトPCRの一例

0.5kbのPCRプロダクトをTAクローニングした後、図3に示した様々なプライマーの組み合わせを用いてコロニーダイレクトPCRを行いました。(R1はベクター上に設計したリバースプライマー)

M : 100bpラダーマーカー
1~5 : 各コロニー

おわりに

今回は両方が平滑末端のDNA断片のクローニング方法を中心に解説しましたが、片方が平滑末端で、もう一方が付着末端の場合の便利なクローニング方法を「私にもできた! ライフサイエンス実験シリーズVol.1」に詳しく紹介しています(弊社ウェブサイト[www.toyobo.co.jp/bio]の「実験お助けコーナー」でご覧いただけます)。この方法で連結した場合、どこにNickができるかなど一度頭の中でシミュレーションしてみたいかがでしょうか。このシリーズでは、日常の実験に役立つ様々なプロトコールを紹介させていただきます。

関連商品

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
脱リン酸化酵素 E. coli Alkaline Phosphatase	100U×1本	-20℃	BAP-111	¥15,000
高効率DNA断片精製キット MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-	200回用	室温	NPK-601	¥25,000
磁性スタンド Magical Trapper	1個	室温	MGS-101	¥38,000
リン酸化酵素 T4 Polynucleotide Kinase	1,500U×1本	-20℃	PNK-111	¥15,000
rATP	50μmoles/0.5ml	-20℃	ATP-111	¥15,000
高効率平滑化+Ligation Blunting high	20回用	-20℃	BLK-101	¥25,000
KOD PCRプロダクトのTAクローニング TArget Clone™ -Plus-	10回用	-20℃	TAK-201	¥16,000
高効率ライゲーションキット Ligation high	375μl×2本	-20℃	LGK-101	¥20,000
TAクローニング効率をさらにアップ。-20℃で凍結しません。 Ligation high Ver.2 (本誌p.5)	750μl×1本	-20℃	LGK-201	¥22,000 NEW
高性能Taqポリメラーゼ Blend Taq®	250U×1本	-20℃	BTQ-101	¥19,000
高効率ポリメラーゼ KOD Dash®	250U×1本	-20℃	LDP-101	¥25,000
高効率コロニーダイレクトPCR試薬 InsertCheck -Ready- (プライマーフリー)	100回用	-20℃	PIK-151	¥29,000
高効率コロニーダイレクトPCR試薬(色素混合タイプ) InsertCheck -Ready- Blue(プライマーフリー)	100回用	-20℃	PIK-251	¥31,000
平滑末端を生じる代表的な高正確性ポリメラーゼ				
KOD -Plus-	200U×1本	-20℃	KOD-201	¥30,000
KOD -Plus- Ver.2	200U×1本	-20℃	KOD-211	¥32,000
KOD FX (本誌p.10)	200U×1本	-20℃	KFX-101	¥35,000 NEW

Web de 温故知新

過去に紹介した記事で、今号に関連のある記事をピックアップしてご紹介するコーナーです。

『ACP & MCP-tag』(本誌p.17-18掲載)

ACP/MCP-tagは、ACP/SFP synthase存在下、蛍光標識されたCoA誘導体に共有結合するユニークな約8kDaのタグです。膜タンパク質の細胞外ドメインなどとの融合タンパク質として発現させることにより、膜タンパク質を特異的に蛍光バースラベルすることができます。

このタグを開発したCovalys社 (<http://www.covalys.com/>) は、この他にも様々な性質を有するユニークなタグを開発しています。『SNAP-tag™』は約20kDaのタグであり、ベンジルグアニン誘導体を基質として共有結合する性質を有しています。ACP-tagに比べサイズは若干大きいですが、タグ自身が酵素活性を有するため、様々な用途に使用可能です。

膜タンパク質といえば、最近、膜タンパク質間での相互作用解析の研究が盛んです。Dualsystems社 (<http://www.dualsystems.com/>) では、スプリットユビキチンシステムを用いた、膜タンパク質間相互作用を検出できるユニークなYeast two-hybrid systemを販売しています (『DUALmembrane system』)。

興味のある方は、弊社のwebサイト (<http://www.toyobo.co.jp/bio/>) のサイト内検索に、『SNAP』『DUALmembrane』と入力してみてください。詳細情報をご確認いただけます。