

組換えタンパク合成用発現ベクターへのサブクローニング
-PCRでインサートを増幅する場合-

1) PCR プライマーの設計

1. 遺伝子解析ソフト (Genetyx) で、cDNA に存在する制限酵素サイトを調べる
↓
2. 発現ベクターにインフレームでインサート DNA が入るように、発現ベクターに挿入する領域の5'、3'末端を決める。
↓
3. インサート DNA 増幅用に、両末端から内側に向かって 20bp の配列を 5'、3'プライマーとして設定する。GC 含量が 40-60%程度ならよい。極端に偏る場合、20bp より長くして調節
↓
4. 発現ベクターのマルチクローニングサイトにある制限酵素サイトから、インサート DNA を切断しない制限酵素とそのサイトを2カ所リストアップする。2カ所以上サイトがある場合、制限酵素の基礎知識 (BioLabs: 第一化学薬品) の“DNA 断片 (オリゴヌクレオチド) 末端付近の切断”を参考にして、切断効率の良い制限酵素を選ぶ。また 5'突出末端を形成する酵素を選ぶ
↓
5. 5'上流側の制限酵素サイトにライゲートするように、5' PCR プライマーに制限酵素認識配列 (6塩基) を付加する。制限酵素により効率よく切断されるように、“制限酵素の基礎知識” (BioLabs: 第一化学薬品) 参考にして、制限酵素認識配列の上流にさらに3-8塩基を付加する
↓
6. 下流側の制限酵素サイトにライゲートするように、3'プライマーに制限酵素サイト (6塩基、NotI なら8塩基) の配列を付加する。“制限酵素の基礎知識” (BioLabs: 第一化学薬品) の“DNA 断片 (オリゴヌクレオチド)”を参考にして、さらに3-8塩基を付加する

2) PCR によるインサート DNA の増幅

1. cDNA が挿入されたベクターをテンプレートにして、制限酵素サイトを付加したプライマーで PCR を行う (100ul の系で、25 サイクル程度)。PCR により、インサート DNA の両末端に制限酵素サイトが付加される
↓
2. 電気泳動で、増幅を確認する
↓
3. PCR purification kit (方法はPCR産物の精製—1に記載) を使って、PCR産物を精製する。100ul で溶出する

3-1) ダブルダイジェクションで制限酵素消化する場合

1. 制限酵素サイトに選んだ2種類の酵素でダブル・ダイジェクションする場合に推薦されているバッファを Takara 等のカタログで調べる

↓

2. 精製 PCR 反応液	20 ul
x10 buffer	10 ul
DDW	66 ul
制限酵素 A	2 ul
制限酵素 B	2 ul

vector (1ug/ul)	2 ul
x10 buffer	10 ul
DDW	84 ul
制限酵素 A	2 ul
制限酵素 B	2 ul

37C, 12 時間以上消化する

↓

3. 電気泳動で、ベクターの消化を確認

↓

4. ベクターの反応液に 1ul CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase) を加え、37C、30 分インキュベートして、脱リン酸化する

↓

5. 0.7% 低融点アガロース (SeaPlaque GTG Agarose, Low melting temp. 65C) で、各反応液 50ul を泳動する

↓

6. UV 照射下、インサートとベクターのバンドを切り出す

↓

7. ゲルの重量を測定し、等量の DW を加える

↓

8. 65C, 10 分加温し、ゲルを溶解する

9. ライゲーション反応

Digested vector solution	4 ul
Digested insert solution	20 ul
Ligation High (Toyobo)	12 ul

16C, 1 時間以上~1 夜インキュベート

↓

10. HB101 コンピテントセル等にトランスフォームする (反応液 10ul を使用)

11. LB agar + Amp. にセルを塗る。37C で 12-18 時間培養

3-2) 2種類の酵素で別々に制限酵素消化する場合

制限酵素の基礎知識 (BioLabs : 第一化学薬品) の “DNA 断片 (オリゴヌクレオチド) 末端付近の切断” を参考にして、制限酵素 A と制限酵素 B の末端の切断効率を比較する。切断効率の低い方の酵素で最初の切断を行う。ここでは、制限酵素 A の切断効率が低いことにして、説明する。

ベクターの消化

- (1) ベクター1ug 程度を、制限酵素 A で 1-2 時間消化する
- (2) PCR purification kit で精製し、50ul で溶出する
- (3) 1ul を泳動し、消化を確認する
- (4) 制限酵素 B で 12-24 時間消化する
- (5) PCR purification kit で精製し、50ul DW で溶出する
- (6) 5ul 10xalkaline buffer, 1ul CIAP を加え、37C、30 分インキュベートして、脱リン酸化する

PCR 産物の消化

- (1) PCR 産物 1ug 程度を、制限酵素 A で 12-24 時間消化する
- (2) PCR purification kit で精製し、50ul で溶出する
- (3) 制限酵素 B で 12-24 時間消化する

ライゲーション

- (1) 0.7% 低融点アガロースで、各反応液全量を泳動する
- (2) UV 照射下、インサートとベクターのバンドを切り出す
- (3) ゲルの重量を測定し、等量の DW を加える
- (4) 65C、10 分加熱し、ゲルを溶解する
- (5) ライゲーション反応

Digested vector solution	4 ul
Digested insert solution	20 ul
<u>Ligation High (Toyobo)</u>	<u>12 ul</u>

16C, 1 時間以上～1 夜インキュベート

トランスフォーム

HB101 コンピテントセル等にトランスフォームする (反応液 10ul を使用)
LB agar + Amp. にセルを塗る。37C で 12-18 時間培養