



Recombinant Clone Screening Using the GoTaq® Hot Start Green Master Mix

GoTaq® Hot Start Green Master Mixを用いた組み換えクローンのスクリーニング

By Sarah Wheeler, Promega Corporation

原文 (英語) は http://www.promega.com/pnotes/101/17252_13/17252_13.pdf 参照

アブストラクト

本稿では、新しいGoTaq® Hot Start Green Master Mixを用いた、プレート上の単一コロニーあるいはミニスケールの調製プラスミドからの組み換えクローンスクリーニングについて紹介します。マスターミックスには、直接ゲルに添加するための成分が含まれており、簡便で迅速なPCRセットアップを可能にします。GoTaq® Hot Start Polymerase技術を用いれば、室温でセットアップすることができ、PCR反応サイクルまでの最大24時間 室温で保存することができます。

イントロダクション

GoTaq® Hot Start Green Master Mixは室温で簡便に反応液をセットアップすることができ、また、増幅産物をゲルに直接添加することもできます。便利な2Xマスターミックスには、GoTaq® Hot Start Polymerase、GoTaq® Green Reaction Buffer、dNTP (各0.4μM) および4mM Mg²⁺などPCRに必要な全ての成分が含まれています。反応液をセットアップするには、鋳型、プライマー、水を加えるだけです。GoTaq® Hot Start Polymeraseは、特殊な抗体により不活性化されており、PCRサイクリングプロトコルの変性ステップ (2分、95℃) でポリメラーゼ活性が回復します (1)。これにより、反応液を室温でセットアップでき、さらにPCRまで最大24時間室温に静置することができます (1)。また、電気泳動前のサンプル調製時間を削減するために、マスターミックスには青色と黄色のトラッキング色素が含まれています。さらに、サンプルの密度を増加させる化合物も含まれるため、ゲルに添加したサンプルはウェル内で沈みます (2)。本稿では、単一コロニーより得たクルードなプラスミド懸濁液および精製プラスミドをサンプルとしてGoTaq® Hot Start Green Master Mixを用いた組み換えクローンのハイスループットスクリーニングについて報告します。我々は、同じ増幅プロトコルを用いて、異なるプライマーペアで様々なアンプリコンを合成する中で、このマスターミックスの頑健性を示します。

組換えクローンのハイスループットスクリーニング

迅速で簡便なスクリーニング法は、膨大な組み換えクローンのスクリーニングに最適です。PCRは、単一の細菌コロニーから直接あるいは少量の精製プラスミドをスクリーニングする上で迅速な方法です。

コロニーのPCRスクリーニングは、スクリーニング時間を丸一日短縮することができます (図1)。単一コロニーからのPCRまたはDNAミニプレップからのPCRにかかわらず、マスターミックスフォーマットは反応液のセットアップを迅速にします。ホットスタート技術によりPCRサイクリングに先立ち最大24時間反応液を室温に放置することができ、これはハイスループットプラットフォームでは重要な要素です。

クルードなプラスミド調製のためのコロニーピッキング

異なるバックボーンおよびタンパク質コード領域を有する24種類のFlexi®クローンを大腸菌にトランスフォームし、プレートに接種しました。直径1mmのコロニー全てをピペットチップでピッキングし、100μlのNuclease-Free Waterに懸濁した後、95℃、5分間インキュベーションしました。50μlの反応で標的のFlexi®クローンを正確に検出するには、コロニー懸濁液5μl必要であることを確認しました。

コロニーPCRのためのピッキング法は様々あります (3-5)。コロニーのサイズや反応液に加えるコロニー懸濁液の量は結果に重要な影響を与えます (データ未掲載)。ここで紹介する方法で、我々のPCRパラメーターを用いることにより標的となるプラスミドのほとんどを確実に検出することができました。コロニーPCRスクリーニングでは、ご自身のアプリケーションに最適なコロニーピッキング法の決定を推奨します。

セットアップ直後のPCRと時間を置いたPCR

反応液調製直後のPCRと調製後 室温で24時間静置した後のPCRのパフォーマンスを比較するために、コロニーをピックアップした後、反応液を2セット調製しました。同様の融解温度になるよう設計した6つのプライマーセットを使用し、アニーリング温度は、最も低いプライマー融解温度から4℃低く設定しました。伸長時間は、最も長いPCRアンプリコンをベースにして1kb/分に決定しました。我々はまず、調製直後の反応液1セットをPCRに供しました。2つめの反応液セットは室温で24時間インキュベーションした後にPCRを行いました。増幅後、サンプルをアガロースゲルに直接添加して電気泳動を行った後、エチジウムブロマイド染色で可視化しました。

全ての反応で、0.5kbから3kbまでのレンジで予想されたサイズのアンプリコンが得られました (図2)。調製直後のPCRと24時間室温で静置後のPCRで同等の収量が得られました。アンプリコンサイズ、クルードな鋳型調製あるいは鋳型量によってコロニーPCR内での収量は異なることが予想されます。我々が用いた方法では、各反応に添加する鋳型量は調べていません。しかし、必要に応じて、コロニー懸濁液の希釈系列を作成することでご自身のアプリケーションにおける検出限界を決定することができます (6)。同一プレート上で、異なるプライマーを用いて広範なサイズのPCR産物を増幅することを可能にしたGoTaq® Hot Start Green Master Mixの頑健性は最も重要なポイントです。

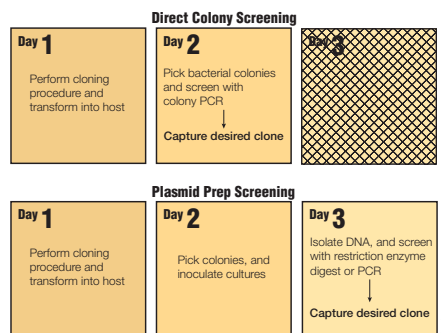


図1. GoTaq® Hot Start Green Master Mix を用いたコロニーからの直接的な組換えクローンスクリーニングによる丸1日分の時間短縮

ミニプレップDNAを用いた組み換えクローンのスクリーニング

組換えクローンからの調製したミニプレップDNAをGoTaq® Hot Start Green Master Mixを用いてスクリーニングすることもできました。菌体培養液より、異なるタンパク質コード領域を有する24種類のFlexi® Vectorを精製しました。鋳型を希釈した後、反応液を室温でセットアップし、最も長いアンプリコンが完全長になるように伸長時間を5分(1kb/分として予想される最も長いアンプリコンサイズより算出)にして増幅を行いました。反応液をアガロースゲルに直接添加して電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色により可視化しました。この技術を用いてフラグメントサイズ1.5kbから5.2kbの増幅に成功しました(図3)。

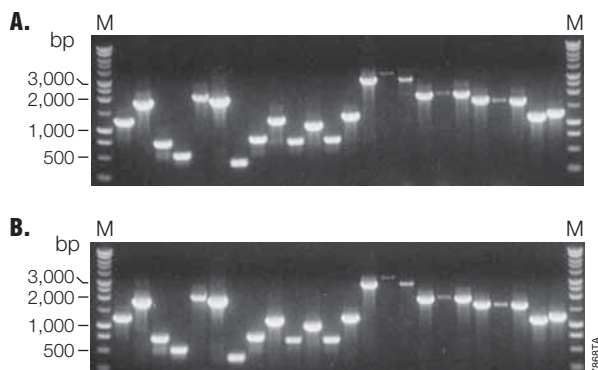


図2. コロニー懸濁液からの増幅

様々なFlexi® ベクターバックボーンあるいはインサートを有する24種類のFlexi® プラスミドを大腸菌JM109にトランスフォームした。コロニーをピックアップし、100µl Nuclease-Free Waterに懸濁して95℃、5分間加熱した。インサートの両端に対するプライマー (各0.2µM)、GoTaq® Hot Start Green Master Mixおよびコロニー懸濁液 5µlは、96プレートの各50µl反応として室温でセットアップした。6種類の異なるプライマーペアを使用した。パネルA. 調製後すぐにPCR反応を開始した。パネルB. PCRを行う前に24時間ラボベンチでインキュベート(室温)した反応。初期サイクリングパラメータ (装置は室温) : 1サイクル (95℃、2分間)、30サイクル (95℃、10秒/50℃、20秒/72℃、4分間)、1サイクル (72℃、5分間)、レーンM, BenchTop 1kb DNA Ladder (カタログ番号 G7541)。

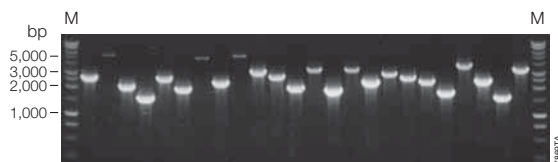


図3. DNAミニプレップからの増幅

様々なタンパク質コード領域を含む24種類のFlexi® プラスミドは、Wizard® SV 96 Plasmid DNA Purification System (カタログ番号 A2255) を用いて精製した。DNAは200倍に希釈し、2µlを各反応に添加した。総DNA濃度は1ウェルあたり0.3ng~1.2ng。インサートの両端に対するプライマー (各0.2µM)、GoTaq® Hot Start Green Master MixおよびNuclease-Free Waterは、96ウェルプレートの希釈したDNAを含む各50µl反応に添加した。サイクリングパラメータ: 1サイクル (95℃、2分間)、30サイクル (95℃、10秒/50℃、20秒/72℃、5分間)、1サイクル (72℃、5分間)、レーンM, BenchTop 1kb DNA Ladder (カタログ番号 G7541)。

まとめ

GoTaq® Hot Start Green Master Mixは、クルードなコロニー調製物あるいはプラスミドミニプレップDNAからでもハイスループット法での組換えクローンスクリーニングに利用することができます。マスターミックスは、異なるプライマーペア、同じサイクルパラメーターを用いて広範なフラグメントサイズを増幅するだけの頑健性を兼ね備えています。単一のコロニー懸濁液で3kbまでのアンプリコンを増幅することができます。また、プラスミドミニプレップDNAを用いれば最大5.2kbのアンプリコンを増幅できます。GoTaq® Hot Start Green Master Mixには、直接的なゲルローディングおよびホットスタート技術を行うための成分が含まれており、クローンのスクリーニングを簡便にし、貴重な時間を節約することができます。

参考文献

1. Knoche, K. *et al.* (2008) *Promega Notes* **99**, 8–11.
2. Flanagan, L. *et al.* (2005) *Promega Notes* **91**, 13–6.
3. Güssow, D. and Clackson, T. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 4000.
4. Zon, L.I. *et al.* (1989) *Biotechniques* **7**, 696–7.
5. Ohno, K. *et al.* (1991) *Biochem. Biophys. Acta* **1090**, 9–16.
6. Hiraishi, A. (1992) *Let. Appl. Microbiol.* **15**, 210–3.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
GoTaq® Hot Start Polymerase*	100 u	M5001	10,000
GoTaq® Hot Start Green Master Mix*	100 rxn	M5122	15,000
GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix*	100 rxn	M5132	15,000

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

*Additional sizes available.