



プラスミドDNA構築のためのサブクローニング

Q インサートをライゲーションする前に直鎖化したベクターの脱リン酸化は必要ですか？

使用するプラスミドベクターが1種類の制限酵素（平滑末端、あるいは突出末端を作る制限酵素）で直鎖化しているものであるならば、再ライゲーションしたベクターによるバックグラウンドを減らすために、ベクターの脱リン酸化が必要になります。しかし、もしベクターを切断した末端どうしが組み合わないように2種類の制限酵素で消化すれば、脱リン酸化操作は省略できます。切断する2種類の制限酵素サイトが近接する場合は、ゲル電気泳動で消化の確認ができないため、ベクターを脱リン酸化することが賢明です。1箇所切断したプラスミドベクターが少量でも次のライゲーション反応中に存在するとバックグラウンドが劇的に上がるため、目的とする組換え体を同定する事が困難になります。

Q プロメガの制限酵素バッファーでCIAPを使うことができますか？

反応液中に塩化亜鉛を終濃度0.1mMになるように補充すれば、プロメガのどの制限酵素バッファーでもCIAPによる脱リン酸化反応を行うことが可能です。プロメガは、サブクローニングのためのDNA脱リン酸化反応に、CIAPに代わるものとしてShrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (カタログ番号 M8201) を新発売しました。SAP はCIAP と異なり、塩化亜鉛を加えなくてもプロメガの制限酵素バッファーで働きます。そのため、制限酵素による消化と脱リン酸化を同じバッファー条件下で、同時に行うことが可能になります。

Q CIAP を不活性化するためにはどうしたら良いでしょうか？

標準的プロトコルでは、50μlの反応液に300μlのCIAP stop buffer (10mM Tris - HCl [pH7.5], 1mM EDTA, 200mM NaCl, 0.5% SDS) を添加し、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 抽出を行った後、エタノール沈殿によってDNAを濃縮する方法をお薦めしています。また、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール抽出の前に、EDTAを終濃度10mMとなるように添加し、65℃で60分あるいは75℃で10分間加熱することで不活性化することもできます。SAPはCIAPと異なり、65℃で15分間加熱を行うことによって完全に不活化されます。これはプロメガの熱不安定性制限酵素を加熱により不活化する操作と同じ条件です。そのため、熱不活性化が可能な制限酵素による消化と同時にSAPによる脱リン酸化を行い、制限酵素とSAP両方を同時に不活化することができます。

Q ライゲーション反応時間はどのくらいで行うことができますか？

平滑末端あるいは相補的な突出末端を持つDNAの一般的なライゲーション反応は、4℃でオーバーナイト、あるいは15~20℃で4~18時間で行うことができます。しかし、相補的な突出末端を持つDNA断片をライゲーションするならば、室温で3時間の反応で完了します。分子密度を上げる試薬を含むライゲーションバッファーを使用することで、平滑末端および相補的な突出末端のライゲーション時間は更に短縮することができます。

そのようなシステムの一つにプロメガのLigaFast™ Rapid DNA Ligation System (カタログ番号 M8221, M8225) があります。このシステムを使用すると、相補的な突出末端を持つDNA断片は室温で5分、平滑末端のDNA断片は室温で15分反応させることでライゲーションを行うことが可能です。形質転換を行って得られたコロニー数は、標準的な4オーバーナイトでのライゲーションで得たものと同等です。

Q 典型的なpGEM® ベクターにクローニング可能なインサートの長さは最大何kbpですか？

pGEM® ベクターシリーズなどの標準的なプラスミドクローニングベクターに挿入できるインサートの上限は厳密には決定されていません。我々がpGEM®-3Z ベクターにクローニングした最大インサートのサイズは21kbp (ベクターのサイズの約7倍) でした。しかし、インサートサイズの限界はクローニングされるインサートの配列に依存するでしょう。ある種のインサートをハイコピープラスミドへクローニングすると、大腸菌が耐えられなくなるのかもしれない。この理由としては、インサートのコードする発現タンパク質が毒性をもつこと、あるいは青/白スクリーニングベクターを使用する場合、宿主菌株の生存を減少させる LacZ α ペプチドとインサートがコードするタンパク質とが融合タンパク質を発現してしまうことなどが挙げられます。またインサート中には、インサートあるいはベクターの一部が欠失する原因となる繰り返し配列が含まれているかもしれません。これらの要因は大きいインサートにだけでなく、小さいサイズのインサートにも当てはまります。

Q インサートのスクリーニングは、どの様に行ったら良いでしょうか？

X-gal と IPTG を含むプレート上での青/白スクリーニングが、インサートの存在をスクリーニングする方法として最も容易な手法です。白いコロニーはインサートがクローニングされていることを示しており、青いコロニーはベクターが再結合したものであることを示しています。その他の方法として、インサートの存在、及び方向性を示す様な切断パターンを表す制限酵素を使用し、ミニプレップしたプラスミドDNAを消化することによって判断できます。もう1つの迅速で簡便な手法としてコロニーPCRがあります。この手法では、大腸菌を直接PCRミックスに移して行います。第一の変性ステップで十分に溶菌するため、大腸菌 (*E. coli*) の溶解操作は必要としません。ベクターとインサートを含む特定の領域にアニールするプライマーをデザインしてPCR反応を行うことで、インサートがその方向でクローニングされているときのみ増幅産物が生じるので、方向性を含むインサートチェックが可能です。たくさんのプレートで多数のコロニーから希少なクローニング産物をスクリーニングする際に通常用いられる3番目の手法として、コロニーハイブリダイゼーション法があります。この方法はラベルした核酸プローブを使い、特定の配列(2)が存在するかどうかをスクリーニングする手法です。

参考文献

1. Kobs, G.(1990) *Promega Notes* 28.9.
2. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, New York,6.9.