



Technical Manual

pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems

カタログ番号 A1360, A1380, A3600, A3610

注意：

この日本語マニュアルは製品に添付される英文マニュアルを翻訳したものです。常に更新されるものではありません。最新の英文マニュアルについては以下のサイトをご覧ください。

<http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf/>

www.promega.co.jp

作成日：2013年4月

pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems

カタログ番号 A1360, A1380, A3600, A3610

目次

I. はじめに.....	1
II. pGEM®-TおよびpGEM®-T Easy Vectorのマルチクローニング配列とベクターマップ.....	3
A. マルチクローニング配列.....	3
B. pGEM®-T Vectorのマップおよびシークエンス基準部位.....	4
C. pGEM®-T Easy Vectorのマップおよびシークエンス基準部位.....	5
III. キットの構成および保存条件.....	6
IV. pGEM®-TおよびpGEM®-T Easy Vectorと2XRapid Ligation Bufferを用いた リガーゼ反応プロトコール.....	6
V. pGEM®-TおよびpGEM®-T Easy Vectorを用いた リガーゼ反応後の形質転換プロトコール.....	7
VI. 考慮が必要な事項.....	8
A. PCR産物の純度.....	8
B. 平滑末端をもつPCR産物.....	9
C. インサート:ベクターのモル比の最適化.....	10
D. 組み換え体からインサートのスクリーニング.....	10
E. 実験コントロール.....	11
VII. 組み換え体プラスミドDNAの単離.....	12
VIII. 困ったときには.....	13
IX. 参考文献.....	15
X. 付録.....	16
A. pGEM®-T Vectorの配列情報および制限酵素で切断できる部位.....	16
B. pGEM®-T Easy Vectorの配列情報.....	16
C. Bufferと試薬の組成.....	17

I. はじめに

pGEM®-TおよびpGEM®-T Easy Vector Systemsは、PCR産物からのクローニング目的のための簡便なシステムです。これらのベクターは、pGEM®-5Zf(+)およびpGEM®-T Easy VectorをそれぞれEco RVで切断し、3'末端に1塩基チミジン(T)を付加しています。1塩基チミジンの3'突出末端(以下、3'末端 T突出)は、ベクターのセルフライゲーションを妨げ、PCR産物を効率よく挿入するために改善されているため、特定の熱安定性ポリメラーゼにより合成されたPCR産物のクローニングに適しています(1,2)。表1に示すとおり、これらのポリメラーゼは、鑄型とは非依存的に増幅したDNA断片の3'末端にデオキシアデノシン(dA)を付加します(3,4)。

ハイコピー数のpGEM®-TおよびpGEM®-T Easy Vectorは、β-ガラクトシダーゼの -ペプチドのコード領域内にあるマルチクローニングサイトの両側に、T7およびSP6のRNA ポリメラーゼプロモーターの認識配列があります。PCR産物を挿入することで -ペプチドが不活性化するため、プレート上のコロニーのカラーセクションにより組み換えクローンの同定ができます。2つのベクターのマルチクローニングサイトの領域は、欠失導入作成のためのErase-a-Base® System(カタログ番号、E5750)を用いて簡便に調製することができます。

pGEM®-TおよびpGEM®-T Easy Vectorは、いずれもクローニングサイトの両側に制限酵素認識部位を含んでいます。pGEM®-T Easy Vectorのクローニングサイトの両側には、制限酵素のEco RI、Bst ZI、Not Iの認識部位が存在するため、3つの制限酵素のうちのどれか1つの制限酵素で反応させると、インサートの配列を切り出すことができます。pGEM®-T Vectorのクローニングサイトの両側には、Bst ZIの認識部位があります。また、これらのベクターは、2種類の制限酵素を用いた切断反応により、インサートの配列を切り出すこともできます。

pGEM[®]-TおよびpGEM[®]-T Easy Vectorは、一本鎖DNA(ssDNA ; Section III参照)を調製するための線状ファージf1の複製起点を含んでいます。図1に示される下側のDNA配列が一本鎖DNAとして合成されます。

pGEM[®]-TおよびpGEM[®]-T Easy Vectorは、PCR産物と結合させるために、2xRapid Ligation Bufferが含まれています。このBufferを用いた反応条件は、室温で1時間のインキュベーションです。インキュベーション時間は、形質転換後のコロニー数を増やすために、延長させることができます。一般的には、4、一晩のインキュベーションにより、形質転換後のコロニーを最も多く得ることができます。

表1 熱安定性DNA PolymeraseによるPCR産物の特性比較

Characteristic	Thermostable DNA Polymerase						
	Taq/ AmpliTaq [®]	Tfl	Tth	Vent [®] (Tli) >95%	Deep Vent [®] >95%	Pfu	Pwo
Resulting DNA ends	3'A	3'A	3'A	Blunt	Blunt	Blunt	Blunt
5'→3' exonuclease activity	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No
3'→5' exonuclease activity	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes

pGEM[®]-TおよびpGEM[®]-T Easy Vectorのアプリケーション

- PCR産物のクローニング
- Erase-a-Base[®] Systemを用いたインサートDNAの一方向性欠失導入ベクターの構築
- 一本鎖DNAの産生
- 組み換え体の青/白カラーセレクション
- 対向位置にあるプロモーターからの*in vitro*転写(Riboprobe[®] *in vitro* Transcription System 製品マニュアルTM016 <http://www.promega.com/tbs/tm016/tm016.pdf>を参照)

pGEM[®]-TおよびpGEM[®]-T Easy Vectorの参考文献

- Perincheri, S. et al. (2005) Hereditary persistence of α -fetoprotein and H19 expression in liver of BALB/cJ mice is due to a retrovirus insertion in the *Zhx2* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 396-401.

Note: この実験では、さまざまなマウスのゲノムDNA断片を増幅し、pGEM[®]-TおよびpGEM[®]-T Easy Vectorにクローニングしています。Pfx Platinum Polymeraseで増幅したPCR産物は、pGEM[®]-TおよびpGEM[®]-T Easy Vectorにクローニングする前に、70、30分間、0.2mM dATPを添加し、Taq DNA PolymeraseによりA-tailing反応を実施しています。マウス*Zhx2*遺伝子を含むORFは増幅され、導入遺伝子*TTR-Afr1*を集めるために、トランスサイレチン発現ベクターに挿入前にシークエンスをしました。*TTR-Afr1*遺伝子は精製し、*Zhx2*導入遺伝子の発現が目的遺伝子の抑制を回復させるかを確認するための試験に用いられました。

- Shin, H-J. et al. (2005) STAT4 expression in human T cells is regulated by DNA methylation but not by promoter polymorphism. *J. Immunol.* **175**, 7143-50

Note: STAT4プロモーターの転写開始点を同定するために、Jurkat T細胞からTotal RNAを抽出後にcDNA合成し、5'RACEを実施しました。増幅したPCR産物は、pGEM[®]-T Easy Vectorにクローニングし、シークエンスによりインサートの配列解析をしました。

- Regue, M. et al. (2005) A second outer-core region in *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **187**, 4198-206.

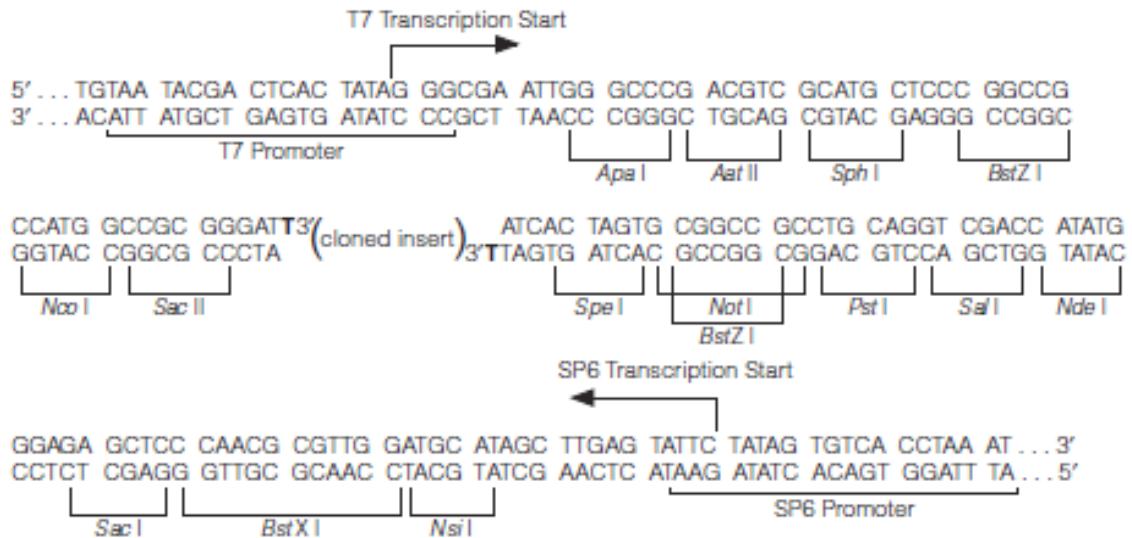
Note: この実験では、変異した*Klebsiella pneumoniae* (肺炎桿菌)のLPSの主要生成遺伝子群*waa*遺伝子を構築しました。*K. pneumoniae*由来の*waa*遺伝子は、2種類のコアタイプを持ち、これをPCRで増幅後、pGEM[®]-T Vectorへクローニングし、変異相補鎖解析に使用しました。

pGEM[®]-T Vectorの参考文献は、プロメガのホームページ(www.promega.com/citations)から調べることができます。

II. pGEM®-TおよびpGEM®-T Easy Vectorのマルチクローニング配列とベクターマップ

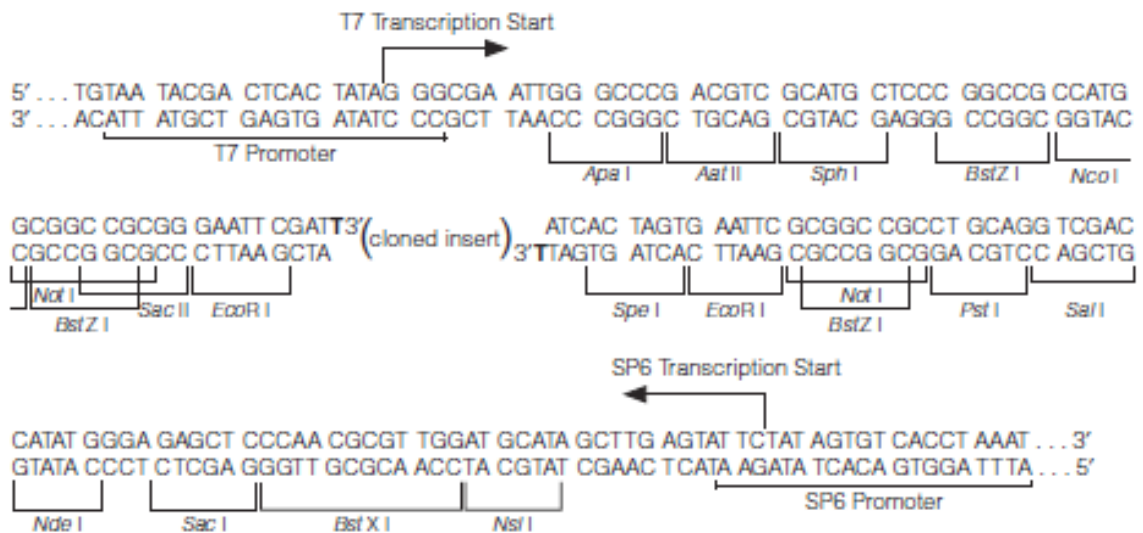
II.A. マルチクローニング配列

pGEM®-T Vector



02EMVAC03A

pGEM®-T Easy Vector



1517MA

図1 pGEM®-TおよびpGEM®-T Easy Vectorのプロモーター配列およびマルチクローニング配列
 上側のDNA配列は、T7 RNA Polymeraseにより合成されるRNA配列と同じです。下側のDNA配列は、SP6 RNA Polymeraseにより合成されるRNA配列と同じです。

II.B. pGEM®-T Vectorのマップおよびシーケンス基準部位

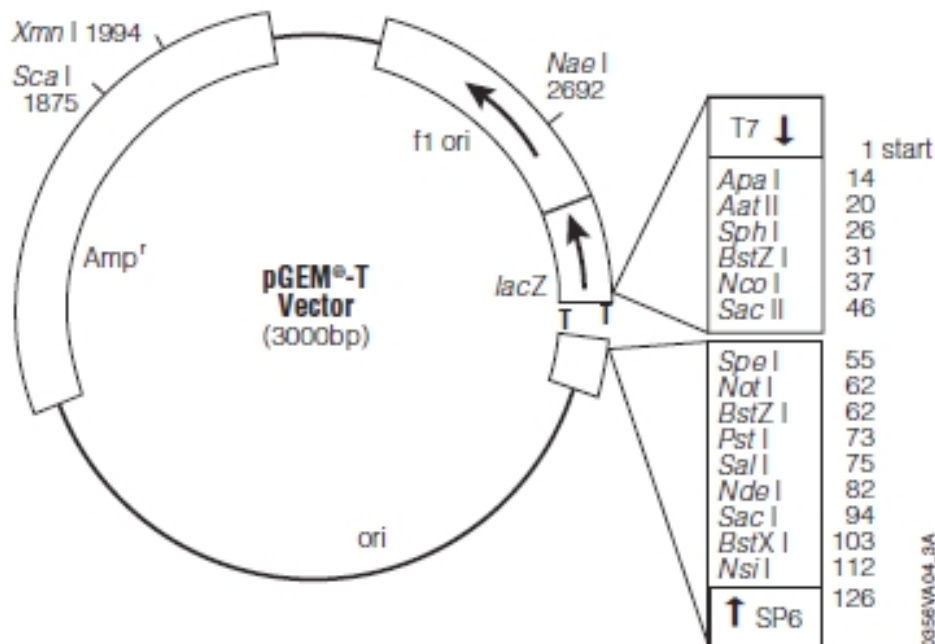


図2 pGEM®-T Vectorのマップおよびシーケンス基準部位

pGEM®-T Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-113
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	124-143
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	126
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	161-177
lacZ start codon	165
lac operator	185-201
-lactamase coding region	1322-2182
phage f1 region	2365-2820
lac operon sequences	2821-2981, 151-380
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2941-2957
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2984-3

Note: インサートは、SP6 Promoter Primer (カタログ番号、Q5011)、T7 Promoter Primer (カタログ番号、Q5021)、pUC/M13 Forward Primer (カタログ番号、Q5601)またはpUC/M13 Reverse Primer (カタログ番号、Q5421)を用いてシーケンスできます。

！注意： *Bst* Z I (カタログ番号、R6881)による消化反応で、pGEM®-T Vectorに挿入したクローンを切り出すことができます。2種類の制限酵素による消化反応でもインサートを切り出すことができます。

II.C. pGEM®-T Easy Vectorのマップおよびシーケンス基準部位

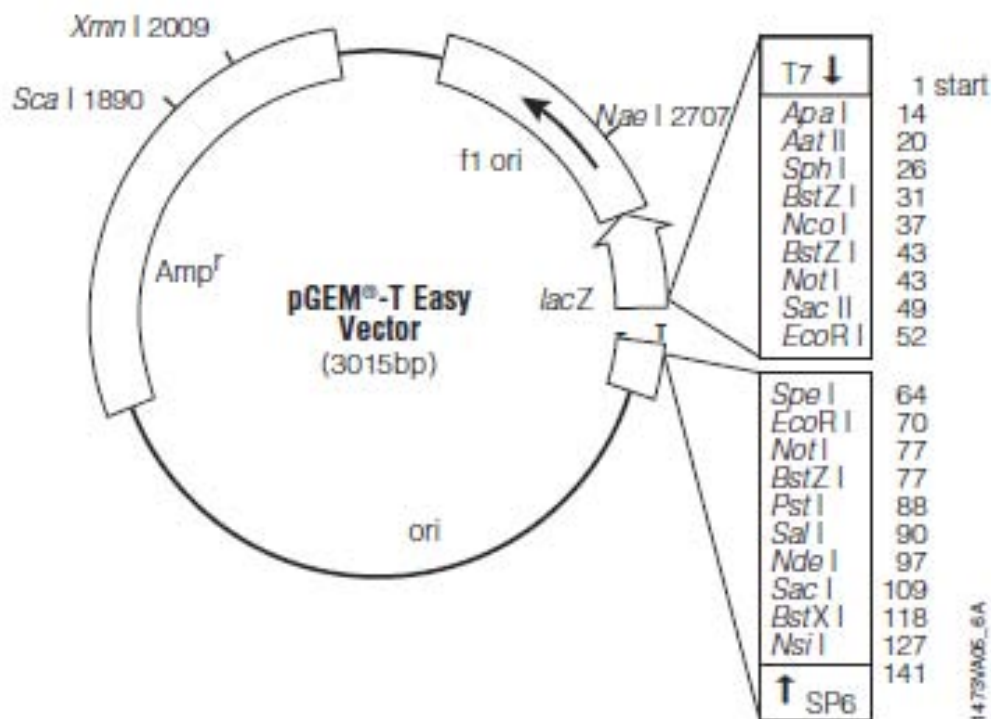


図3 pGEM®-T EasyVectorのマップおよびシーケンス基準部位

pGEM®-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-128
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176-197
lacZ start codon	180
lac operator	200-216
-lactamase coding region	1322-2182
phage f1 region	2380-2835
lac operon sequences	2836-2996, 166-395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949-2972
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3

Note: インサートは、SP6 Promoter Primer (カタログ番号、Q5011)、T7 Promoter Primer (カタログ番号、Q5021)、pUC/M13 Forward Primer (カタログ番号、Q5601)またはpUC/M13 Reverse Primer (カタログ番号、Q5421)を用いてシーケンスできます。

！ 注意： *Bst* Z I (カタログ番号、R6881)、*Eco* R I (カタログ番号、R6011)または*Not* I (カタログ番号、R6431)による消化反応で、pGEM®-T Easy Vectorに挿入したクローンを切り出すことができます。2種類の制限酵素による消化反応でもインサートを切り出すことができます。

III. キットの構成品および保存条件

製品	サイズ	カタログ番号
pGEM [®] -T Vector System I	20回分	A3600

以下の試薬が含まれます。

- 1.2µg pGEM[®]-T Vector (50 ng/µl)
- 12µl Control Insert DNA (4 ng/µl)
- 100u T4 DNA Ligase
- 200µl 2XRapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase

製品	サイズ	カタログ番号
pGEM [®] -T Vector System II	20回分	A3610

以下の試薬が含まれます。

- 1.2µg pGEM[®]-T Vector (50 ng/µl)
- 12µl Control Insert DNA (4 ng/µl)
- 100u T4 DNA Ligase
- 200µl 2XRapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase
- 1.2ml JM109 Competent Cells, High Efficiency (6x200µl)

製品	サイズ	カタログ番号
pGEM [®] -T Easy Vector System I	20回分	A1360

以下の試薬が含まれます。

- 1.2µg pGEM[®]-T Easy Vector (50 ng/µl)
- 12µl Control Insert DNA (4 ng/µl)
- 100u T4 DNA Ligase
- 200µl 2XRapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase

製品	サイズ	カタログ番号
pGEM [®] -T Easy Vector System II	20回分	A1380

以下の試薬が含まれます。

- 1.2µg pGEM[®]-T Easy Vector (50 ng/µl)
- 12µl Control Insert DNA (4 ng/µl)
- 100u T4 DNA Ligase
- 200µl 2XRapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase
- 1.2ml JM109 Competent Cells, High Efficiency (6x200µl)

保存条件： カタログ番号A3610とA1380に含まれるコンピテントセルは、-65°C以下で保存してください。それ以外のすべての試薬は、-15~-25°Cで保存してください。

IV. pGEM[®]-TおよびpGEM[®]-T Easy Vectorと2XRapid Ligation Bufferを用いたリガーゼ反応プロトコール

1. pGEM[®]-TおよびpGEM[®]-T Easy VectorとControl Insert DNAのチューブを軽く遠心し、内容物をチューブの底へ集める。

2. 次に示すリガーゼ反応溶液を調製する。

Note: 0.5mlの低DNA結合性チューブ(例として、VWR カタログ番号、20170-310)を使用してください。

！ **注意：** 2XRapid Ligation Bufferは、使用前によく攪拌してください。

表1 リガーゼ反応組成

	標準反応	ポジティブ コントロール	バックグラウンド
2XRapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM®-TまたはpGEM®-T Easy Vector	1 µl	1 µl	1 µl
PCR産物	X µl	-	-
Control Insert DNA	-	2 µl -	-
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
脱イオン化水を加えた最終液量	10 µl	10 µl	10 µl

*PCR産物：ベクターのモル比は、最適化が必要な場合があります(Section VI.C参照)

3. リガーゼ反応溶液をピペティングで攪拌したあと、室温で1時間インキュベートする。この代わりに、4 で一晩インキュベートすることもできます。

Notes:

1. pGEM®-TまたはpGEM®-T Easy Vectorのリガーゼ反応には、このシステムに付属しているプロメガのT4 DNA Ligaseだけを使用してください。他社で販売しているT4 DNA ligaseには、エキソヌクレアーゼ活性があると、ベクターの3'末端のチミジンを除去してしまふことがあります。
2. 2XRapid Ligation BufferにはATPが含有しています。ATPは、温度変化によって分解してしまうため、凍結融解の繰り返しはなるべく避けてください。また、1回のbuffer調製の際に何度も温度変化が生じるような条件下に置かないようにしてください。
3. 2XRapid Ligation Bufferは、使用前によく攪拌してください。
4. リガーゼ反応時間を長くすることで、形質転換できる数を増加させることができます。一般的に、4 で一晩インキュベーションしたときに、最大数の形質転換体を得ることができます。

V. pGEM®-TおよびpGEM®-T Easy Vectorを用いたリガーゼ反応後の形質転換プロトコル

形質転換には、高効率コンピテントセル(1×10^8 cfu/µg DNA 以上)を使用してください。1塩基突出のDNA断片のリガーゼ反応が不十分なことがあります。十分なコロニー数を得るためには、形質転換効率が 1×10^8 cfu/µg DNA(または、これ以上)のコンピテントセルを使用する必要があります(Section VI. E参照)。

プロメガではJM109 High Efficiency Competent Cells(カタログ番号、L2001)の使用を薦めます。このコンピテントセルは、pGEM®-TまたはpGEM®-T Easy VectorのSystem IIに付属しています。その他のコンピテントセルを使用することも可能ですが、アンピシリンによる薬剤セクションと青/白カラーセクションに適合できるものを選択してください。

JM109は、コンピテントセルの調製前にチアミン塩酸塩を添加したM9最小培地プレートで生育させてください。これは、F'エピソームの存在、宿主のプロリン栄養要求性を補うproAB遺伝子、青/白カラーセクションに必要とされる(proAB)欠損と*lacI*^{qZ} M15を選択するためです。もし、プロメガで販売されているJM109 High Efficiency Competent Cells以外のコンピテントセルを使用する場合、次に示す適切な形質転換プロトコルは重要です。形質転換体の選択は、LB/アンピシリン/IPTG/X-Galプレートを使用してください(Section XI. C参照)。最もよい結果を得るためには、調製してから1ヶ月以上経過したプレートを使用しないでください。

JM109の遺伝子型：*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (rK -, mK+), *relA1*, *supE44*, Δ (*lac-proAB*), [F', *traD36*, *proAB*, *lacI*^{qZ}M15] (5)。

準備するもの

(各試薬の組成は、Section XI. Cに記載しています)

- LB プレート(アンピシリン/IPTG/X-Gal)
- SOC培地

1. 各リガーゼ反応溶液あたり、2枚のLB (アンピシリン/IPTG/X-Galを含有)プレートと形質転換効率を決定するためにさらに2枚のプレートを用意する。大腸菌をプレートに蒔種する前に室温に平衡化しておく(ステップ10)
2. リガーゼ反応溶液を含むチューブを軽く遠心し、内容物をチューブの底へ集める。リガーゼ反応溶液2 μ lを氷上に置いた滅菌済み1.5mlチューブに添加する(Note 1を参照)。コンピテントセルの形質転換効率を決定するために、制限酵素で消化していないプラスミドDNAを氷上に置いた別の滅菌チューブに添加する(Section VI. E参照)
3. JM109 High Efficiency Competent Cellsを保管場所から取り出し、融解するまで氷上に置く(約5分間)。チューブを軽く叩いて、コンピテントセルを混合する。
！ 注意：コンピテントセルは非常に壊れやすいため、過剰なピペティングによる混合は避けてください。
4. コンピテントセル50 μ lをステップ2で調製したチューブに**注意しながら**添加する(形質転換効率確認用のサンプルでは、コンピテントセルを100 μ l使用する)。
5. チューブを**軽く**叩いてよく攪拌し、氷上で20分間静置する。
6. 42 °Cの水浴に45～50秒間チューブを置き、コンピテントセルにヒートショックを与える。
7. チューブをすぐに氷上戻し、2分間静置する。
8. 室温になっているSOC培地 950 μ lをコンピテントセルとリガーゼ反応溶液の入ったチューブへ添加する。制限酵素で消化していないプラスミドDNAを含むコンピテントセルの入ったチューブには、900 μ lのSOC培地を添加する。(LB培地を代用できますが、生育するコロニー数が少なくなります。)
9. 振とうさせながら(~ 150rpm)、37 °C、1.5時間インキュベートする。
10. LB/アンピシリン/IPTG/X-Gal プレートに100 μ lの形質転換後の培養液を添加する。(形質転換のコントロールについては、SOC培地で10倍に希釈した溶液をプレートに加えることを勧めます。たくさんのコロニーが必要なときは、1,000xg、10分間遠心して、コンピテントセルを集め、200 μ lのSOC培地に懸濁させてください。そして、2枚のプレートに100 μ lずつ添加してください。)
11. プレートを一晩、37 °Cでインキュベートする。(経験的に、 1×10^8 cfu/ μ g DNAのコンピテントセルを使用し、100 μ lをプレートに添加したときに、プレート1枚あたり約100個のコロニー確認できます。長期間の培養または4 °Cでのプレートの保存(37 °C、一晩のインキュベート後)は、青コロニーの発色を促進させます。白コロニーには、一般的にインサートが挿入されていると考えられますが、青コロニーとして存在することもあります。詳細な情報はSection VI. Dを参照してください。)

Notes:

1. 経験的に大きいサイズのポリプロピレンチューブ(17x100 mm、例えば、ファルコン、カタログ番号、2059)を使用すると、形質転換効率が増加します。いくつかのメーカーで販売されているチューブはDNAと結合し、その結果コロニー数が減少します。このようなチューブの使用は避けてください。
2. β -ガラクトシダーゼ活性をもつコロニーは、 β -ガラクトシダーゼ活性を持たないコロニーに比べて生育が遅いため、一晩の培養による青コロニーは、直径が約1mm程度で、白コロニーよりも小さくなります。

VI. 考慮が必要な事項

VI.A. PCR産物の純度

PCR反応の溶液は、リガーゼ反応に使用する前に、アガロースゲルで解析してください。Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System(カタログ番号、A9281)を使用してアガロースゲルから、もしくはPCR産物から直接精製したPCR産物は、リガーゼ反応に用いることができます。ピリミジンダイマーの形成を避けるために、短波長UVの照射時間をできるだけ短くしてください。アガロースゲル内で、PCR産物のスミアリングや不必要なバンドが認められたときは、目

的のサイズのバンドを切り出し、Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up Systemで精製してください。それでも目的のサイズのバンドが区別できないときは、ゲルろ過もしくはWizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up Systemを使ってプライマーを除去してください。未精製のPCR産物をリガーゼ反応に使用できるかもしれませんが、プライマーダイマーや非特異的に増幅したPCR産物の影響により、正しくインサートが挿入できた白コロニーの数が減少します。したがって、PCR産物が挿入できたコロニーを同定するために、複数個のコロニーからスクリーニングする必要があります。

VI.B. 平滑末端をもつPCR産物

Pfu DNA Polymerase(カタログ番号、M7741)、*Pwo* DNA Polymerase、*Tli* DNA Polymerase(カタログ番号、M7101)のようなブルーフリーディング活性を持つ耐熱性DNA Polymeraseは、PCR増幅反応で平滑末端断片を生成します。これらのPolymeraseを使って生成した平滑末端断片は、図4で示されるように、A-tailing反応を行うことで、pGEM[®]-TおよびpGEM[®]-T Easy Vectorとリガーゼ反応ができます(6)。この方法を用いると、平滑末端では、複数のインサートが挿入してしまうのとは対照的に、1つのインサートだけを挿入することができます。さらに、T-ベクタークローニングは、脱リン酸化の必要がないため、ベクターのセルフライゲーションのバックグラウンドが低くなります。

最適化したベクター：インサート比で実施することで、*Pfu*および*Tli* DNA PolymeraseをインサートDNAの増幅に使用したときに、55~95%の組み換え体を得ることができます(表2)。Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System(カタログ番号、A9281)、もしくは別の方法によりゲルから直接PCR産物の精製をすることは重要です。ブルーフリーディング活性を持つ*Pfu*、*Pwo*および*Tli* DNA Polymeraseで増幅したPCR産物の精製を行わないと、これらのポリメラーゼにより、A-tailing反応で付加された3'-末端デオキシアデノシン、またはベクター由来の3'-末端デオキシチミジンが、A-tailing反応とリガーゼ反応の間に脱離し、PCR産物は分解します。

クローニング効率を最適化するために、A-tailing反応およびリガーゼ反応に使用するDNA量は、精製したPCR産物の分子量に合わせて調整します。短いDNA断片、もしくは非常によく増幅したPCR産物のように、DNAのモル濃度が高いときは少量のPCR産物をこれら2つの反応に使用してください。しかし、長鎖DNA、もしくは増幅効率があまり良くないPCR産物のように、DNAのモル濃度が低いときは、大容量のPCR産物をこれら2つの反応に使用してください。プロメガでは、精製したPCR産物の1~7μlをA-tailing反応およびリガーゼ反応に使用しました(Section VI. C 「インサート：ベクターのモル比の最適化」を参照してください)。組み換え体は、青/白カラーセレクションにより同定され、その70~100%は、正しい長さのPCR産物が挿入できていました。A-tailingしていないPCR産物を使用したコントロール試験では、組み換え体は確認されませんでした。このコントロール結果から、かなりの割合でA-tailing反応と*Taq* DNA Polymeraseによる3'末端 デオキシアデノシン付加したPCR産物がpGEM[®]-T Easy Vectorに挿入できることを確認しました。

表2 異なるDNA Polymeraseで増幅したPCR反応から、A-tailing反応操作での比較

Polymerase	%組み換え体 ¹			
	24、1時間のリガーゼ反応(標準法)		4、16時間のリガーゼ反応(代替法)	
	542bp	1.8kb	542bp	1.8kb
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	65~84% ²	31~55% ³	81~95% ²	50~75% ³
<i>Tli</i> DNA Polymerase	68~77% ⁴	37~65% ⁵	85~93% ⁴	60~81% ⁵

PCR産物は、*Pfu*または*Tli* DNA Polymeraseにより生成し、A-tailing反応後、GEM[®]-T Easy Vectorとリガーゼ反応を実施した。リガーゼ反応後の溶液2μlをJM109コンピテントセルへ形質転換し、LB/アンピシリン/ IPTG/X-Gal プレートに蒔いた。

1 %組み換え体 = プレートに生育した白コロニーと青コロニーの割合。PCR産物はA-tailing反応前にWizard[®] PCR Preps DNA Purification Systemで精製した。

2. 試験したインサート：ベクターのモル比は、5：1、3：1、1：1。A-tailing反応に用いたPCR産物の容量：1~2μl

3. 試験したインサート：ベクターのモル比は、3：1、2：1、1：1。A-tailing反応に用いたPCR産物の容量：3~7μl

4. 試験したインサート：ベクターのモル比は、3：1、2：1、1：1。A-tailing反応に用いたPCR産物の容量：1~2μl

5. 試験したインサート：ベクターのモル比は、2：1、1：1。A-tailing反応に用いたPCR産物の容量：4~7μl

ブルーフリーディングポリメラーゼ(例えば、*Pfu* DNA Polymeraseなど)により増幅後の精製したPCR産物1~7μlを準備する。

Taq DNA Polymeraseの10x Reaction Buffer(MgCl₂含有)を1μl添加する。

終濃度が0.2mMとなるようにdATPを添加する。

5ユニットの*Taq* DNA Polymeraseを添加する。

終容量が10μlとなるように脱イオン化水を添加する。

70℃、15~30分間インキュベートする。

プロメガのpGEM[®]-TまたはpGEM[®]-T Easy Vectorとリガーゼ反応に1~2μlを使用する。

図4 Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System(カタログ番号、A9281)で精製した平滑末端PCR産物のA-tailing反応とT-ベクタークロニングの操作手順

VI.C. インサート：ベクターのモル比の最適化

pGEM[®]-TまたはpGEM[®]-T Easy Vector Systemは、Control Insert DNA：ベクターのモル比が1：1のときが最適です。しかし、8：1、または1：8のモル比を用いたときでもクロニングは成功します。まず最初に、PCR産物のモル比の最適化条件を検討する必要があるかもしれません。3：1から1：3のモル比は、初期のパラメーターとして適切でしょう。PCR産物の濃度は蛍光測定法(7)を用いるか、アガロースゲル上にあるDNAマーカースと比べて推定してください。pGEM[®]-TまたはpGEM[®]-T Easy Vectorは、DNA鎖長がおよそ3kb、DNA濃度が50ng/μlとして提供しています。リガーゼ反応に添加する適切なPCR産物(インサート)の量を計算するために、以下の式を使用してください。

$$\frac{\text{ベクターDNA量(ng)} \times \text{インサートの鎖長(kb)}}{\text{ベクターの鎖長(kb)}} \times \text{インサート：ベクター(モル比)} = \text{インサートDNA量(ng)}$$

インサート：ベクターのモル比計算例：

3.0kbのベクター50ngへ0.5kbのインサートを挿入するときに、インサート：ベクターのモル比が3：1の条件では、どれくらいの量のPCR産物をリガーゼ反応に添加すればよいですか？

$$\frac{50 \text{ ng ベクター量} \times 0.5 \text{ kb インサート}}{3.0 \text{ kbのベクター}} \times \frac{3}{1} = 25 \text{ ng インサートDNA量}$$

インサート：ベクターのモル比を1：1の条件で、同じパラメーターを使用した場合、8.3ngのインサート(0.5kb)が必要になります。

VI.D. 組み換え体からインサートのスクリーニング

β-ガラクトシダーゼコード領域内にインサートを組み込むことによる、pGEM[®]-TまたはpGEM[®]-T Easy Vectorのクロニングから得られた組み換え体は、IPTG/X-Galが含まれるプレート上に認められるカラーセレクションにより同定されます。しかし、pGEM[®]-TまたはpGEM[®]-T Easy Vectorに挿入されたPCR産物の特徴は、コンピテントセルの形質転換の後に得られる青/白コロニー数の比に大きく影響を受けます。大部分のPCR産物を含むクローンは、白コロニーとなりますが、PCR産物が*lacZ*遺伝子内の翻訳領域内でクロニングされたときは、青コロニーになることがあります。このようなときのインサートDNA断片は、3の倍数の塩基長となっており(3'末端 A突出を含む)、インサート配列に終止コドンが含まれていません。2kbまでのインサートDNA断片を翻訳領域内に挿入して、青コロニーとなっている報告例があります。

PCR産物が3の倍数の塩基長ではなく、増幅過程で変異が起こらないとしても(例として、欠失、または点変異など)、pGEM[®]-TまたはpGEM[®]-T Easy VectorにDNA断片を挿入したサンプルを形

質転換したコンピテントセルで青コロニーを示すことがあります。

pGEM[®]-TまたはpGEM[®]-T Easy Vector Systemに付属しているControl Insert DNAは、pGEM[®]-*luc* Vector DNA(カタログ番号、E1541)由来の542bpの断片です。この配列は、すべて6つのリーディングフレーム内に複数の終止コドンを含むように変異導入し、コントロール反応における青コロニーのバックグラウンドが低くなるようにしています。Control Insert DNAで得られた結果は、個々のユーザーが使用するPCR産物の基準に当てはまらないかもしれません。

VI.E. 実験コントロール

プロメガでは、以下に示すコントロールの実施を強く推奨します。これらは、pGEM[®]-TまたはpGEM[®]-T Easy Vector Systemの性能を正確に調べるために必要とされています。

陽性コントロール

Section IVとSection Vで述べられているControl Insert DNAを使ったりガーゼ反応とこれを形質転換する方法を実施してください。このコントロールは、リガーゼの反応が効率よく進行しているかを確認することができます。一般的に、 1×10^8 cfu/ μ g DNAの形質転換効率を持つコンピテントセルを用いたときに、およそ100個コロニーが確認でき、このなかの10~40%が青コロニーとなります。60%以上が白コロニーとなっているはずですが、Control Insert DNAは、白コロニーとなるように設計しています。しかし、インサートDNAによっては、白コロニーにならないこともあります(Section VI. D.参照)。陽性コントロールリガーゼ反応から得られた青コロニーのバックグラウンドは、3'末端 T突出ではない場合、もしくはpGEM[®]-TまたはpGEM[®]-T Easy Vectorが直鎖状に切断されていないときに起こります。これらの青コロニーは、形質転換の内部標準として使用できます。コロニーが全く生育していない場合は、形質転換が失敗しています。青コロニーだけが生育していた場合は、リガーゼ反応が失敗しています。陽性コントロール反応で白コロニー数が50%以下となった場合は、リガーゼ反応条件が完全に最適化されていません。

Control Insert DNAの濃度は4ng/ μ lです。2 μ l(4ng/ μ l)のDNA量は、10 μ lのリガーゼ反応液内で、50ngのpGEM[®]-TまたはpGEM[®]-T Easy Vector Systemと1:1のモル比となっています。

バックグラウンドコントロール

Section IVに記載されているように、インサートを添加していない50ngのpGEM[®]-TまたはpGEM[®]-T Easy Vectorのリガーゼ反応を準備してください。そして、Section Vに記載されている方法で形質転換を実施してください。このコントロールは、3'末端 T突出の欠失またはpGEM[®]-TまたはpGEM[®]-T Easy Vectorから得られるバックグラウンドの青コロニーの数を決定することができます。Section Vで推奨されている方法であれば、 1×10^8 cfu/ μ g DNAの形質転換効率を持つコンピテントセルを用いたときに、10~30個の青コロニーが観察されます(同じ条件下では、 1×10^7 cfu/ μ g DNAのコンピテントセルでは、1~3個の青コロニーとして、 1×10^9 cfu/ μ g DNAのコンピテントセルでは、100~300個の青コロニーが観察されます)。PCR産物を用いた標準反応で得られた青コロニー数とコントロール試験で得られたバックグラウンドの青コロニーの数を比較してください。PCR産物を用いたりガーゼ反応がバックグラウンドコントロール反応よりも非常に多くの青コロニーを産出している場合は、これらの青コロニーの中に組み換え体が含まれていると考えられます(Section VI. D参照)。

形質転換コントロール

環状プラスミド(pGEM[®]-TまたはpGEM[®]-T Easy Vectorは、直鎖状になっているため、使用しないでください)を形質転換し、コンピテントセルの形質転換効率を確認し、cfu/ μ g DNAを計算してください。もし形質転換効率が 1×10^6 cfu/ μ g DNAより低いときは、新しいコンピテントセルを準備してください(コンピテントセルはプロメガで販売しています)。もし、JM109 High Efficiency Competent Cells(カタログ番号、A3610または、A1380のpGEM[®]-TまたはpGEM[®]-T Easy Vector System IIIにそれぞれ付属しています)を使用しない場合は、少なくとも 1×10^6 cfu/ μ g DNAの形質転換効率を持つコンピテントセルが、アンピシリン薬剤耐性セレクションによる青/白カラーセレクションに適合できることを確認してください。

形質転換効率の計算例

0.1ngの環状プラスミドDNAで形質転換した後のコンピテントセル100 μ lに、900 μ lのSOC培地

を添加する(0.1ng DNA/ml)。この量から、さらにSOC培地で10倍希釈し(0.01ng DNA/100 μ l)、2枚のプレートに100 μ lを蒔種する(0.001ng DNA/100 μ l)。もし、200個のコロニー(2枚のプレートの平均値)が得られた場合、形質転換効率はどれくらいになりますか？

$$\frac{200 \text{ cfu}}{0.001 \text{ ng}} = 2 \times 10^5 \text{ cfu/ng} = 2 \times 10^8 \text{ cfu/}\mu\text{g DNA}$$

VII. 組み換え体プラスミドDNAの単離

組み換え体プラスミドDNAの単離のために、標準的なプラスミドミニプレップの操作を行うことができます。プロメガの*Protocols and Application Guide*のDNA Purification Chapter部分にプラスミドDNA精製法の概要が記載されています(8)。簡便で信頼性のある方法として、Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System(カタログ番号、A1330)があります。

VIII. 困ったときには・・・

ここに記載のない疑問点については、プロメガテクニカルサービス部までお問い合わせください。

E-mail : prometec@jp.promega.com

症状

コロニーが全く形成されない

原因および改善点

形質転換時に問題が生じたか、コンピテントセルが形質転換能を失っています。バックグラウンドコントロール(インサートなしのリガーゼ反応)をチェックする(Section VI. E参照)。通常10~30個の青いコロニーが確認できます。

高い形質転換効率を持つコンピテントセル(1×10^8 cfu/ μ g DNA以上)を用いてください。pGEM[®]-5Zf(+) Vectorなどの環状プラスミドを用いた形質転換効率を試験し、薬剤セレクションを実施してください。Section V. Aのガイドラインによると、 1×10^8 cfu/ μ g DNAのコンピテントセルでは、通常100個程度のコロニーを形成します。したがって、 1×10^8 cfu/ μ g DNA未満のコンピテントセルからは、コロニーは確認できないでしょう(Section VI. E参照)。

Control Insert DNAを用いた試験での白いコロニー形成率が10%以下

2X Rapid Ligation Bufferの希釈が不適切です。2X Rapid Ligation Bufferは、10 μ l反応あたり5 μ l添加します。

生育した全コロニー数が多く、白コロニーが全く認められないときは、コンピテントセルの形質転換効率が高く(1×10^9 cfu/ μ g DNA)、リガーゼ反応に問題があるかもしれません。 10^9 cfu/ μ g DNAのコンピテントセルを用いた陽性コントロールのリガーゼ反応で、白コロニー数が70~90%、1,000個のコロニーが得られるでしょう。もし、リガーゼ反応条件が最適化されていない、もしくは失敗しているときは、生育している全コロニー数は多くなりますが(1×10^9 cfu/ μ g DNAのコンピテントセル使用で300個程度です)、白コロニー数が少ないか、ゼロになります。以下のリガーゼ反応失敗のコメントを参照してください。

リガーゼ反応が失敗しています。リガーゼBufferの活性が低くなっています。2X Rapid Ligation Bufferには、ATPが含有していて、温度変動に伴って分解します。凍結融解の繰り返しは避け、1回に使用する量を新しいチューブに分注してください。リガーゼやBufferの活性を試験するためには、~20ngのDNAマーカー(例えば、Lambda DNA/Hind III Markers、カタログ番号、G1711)を準備してください。リガーゼ反応を実施したDNAと未実施のDNAをアガロース電気泳動で比較し、高分子量物質としてDNA断片がセルフライゲーションしていることを確認してください。

1塩基T突出が欠失し、ベクターの平滑末端によるセルフライゲーション由来の青コロニーが白コロニーよりも多く生育しています。1塩基T突出を分解するヌクレアーゼの導入は避けてください。このシステム付属しているT4 DNA Ligaseだけを使用してください。このリガーゼは、エキソヌクレアーゼ活性が最小となっています。

Control Insert DNAを用いた試験での白コロニー形成率が60%以下

2X Rapid Ligation Bufferの希釈が不適切です。2X Rapid Ligation Bufferは、10 μ l反応あたり5 μ l添加します。

1塩基T突出が欠失し、ベクターの平滑末端によるセルフライゲーション由来の青コロニーが白コロニーよりも多く得られています。1塩基T突出を分解するヌクレアーゼの導入は避けてください。このシステム付属しているT4 DNA Ligaseだけを使用してください。このリガーゼは、エキソヌクレアーゼ活性が最小となっています。

リガーゼ反応温度が高すぎます。高い反応温度(28 以上)では、バックグラウンドが高くなり、組み換え体は少なくなります。

VIII. 困ったときには・・・(続き)

PCR産物を用いた試験による結果、白コロニーが全く形成されない、もしくは白コロニー数が少ない

2X Rapid Ligation Bufferの希釈が不適切です。2X Rapid Ligation Bufferは、10 μ l反応あたり5 μ l添加します。

リガーゼ反応時間が不十分です。反応を一晩実施すると、最もよい結果が得られます。

PCR産物に含まれる夾雑物により、リガーゼ反応が阻害されています。PCR産物を陽性コントロールと混合し、阻害物の存在を確認してください。PCR産物中に反応阻害物が確認された場合は、PCR産物を精製してください。PCR産物に3'末端A付加がありません。表1に要約されているとおり、すべての熱安定性DNA Polymeraseが、3'末端A付加することはありません。平滑末端断片を適切なpolymeraseとdATPにより処理し、A-tailing反応を実施してください。

UV照射によるピリミジンダイマー形成のために、PCR産物がサブクローニングできませんでした。これは、ゲルからの切り出しによるDNA精製と共通の問題です。この場合のDNAを作り直す方法はありません。なるべく、UV照射の時間は短くしてください。UV照射量を減少させるために、光源とゲルの間にガラスプレートを使用してください。可能であれば、PCR産物を確認するときは、長波長UVだけを使用してください。

PCR産物はサブクローニングされていますが、*lacZ* geneが機能しています。PCR産物のリガーゼ反応による青コロニー数が、バックグラウンドコントロールの青コロニー数よりも多い場合、青コロニーの中に、インサートが含まれていることがあります。青コロニーと薄い青色のコロニーをスクリーニングしてください(Section VI. C参照)。

インサート：ベクターのモル比が最適化されていません。PCR断片の精製度と量をアガロース電気泳動で確認し、インサート：ベクターのモル比を最適化してください(Section VI. C参照)。

調製されたPCR産物の中にプライマーダイマーが含まれているかもしれません。プライマーダイマーがpGEM[®]-TおよびpGEM[®]-T Easy Vectorにクローニングされていますが、サイズが小さいために、制限酵素による消化反応やアガロース電気泳動では確認できません。このリガーゼ反応では、バックグラウンドコントロールよりも青コロニーが多く確認されます。PCR産物をアガロースゲル切り出しにより精製してください。

さまざまな鎖長のPCR産物が生成され、pGEM[®]-TおよびpGEM[®]-T Easy Vectorにクローニングされています。必要とする鎖長のPCR産物をアガロースゲル切り出しにより精製してください。

DNAの組み換えが起きています。DNAの組み換えがランダムに起こっているかを調べるために、1つのクローンを確認してください。もし、目的のクローンが、ランダムに組み換わって存在しているときは、いくつかのクローンもスクリーニングにより同定してください。すべてのクローンで同じ組み換えが起きているときは、修復欠損株(例えば、SURE[®] cells)を使用してください。組み換え現象が低減されます。

VIII. 困ったときには・・・(続き)

PCR産物を用いた試験による結果、白コロニーだけを形成する(青コロニーなし)

アンピシリンが失活しているため、アンピシリン感受性の菌が増殖しています。アンピシリンプレート適切に調製しているか確認し、1ヶ月以内に使用してください。アンピシリンの活性を試験するために、アンピシリンを添加する箇所とアンピシリンを添加しない箇所にプレートを分割し、アンピシリン感受性株をプレートへ接種してください。

大腸菌株(例えば、JM109)がF'エピソームを失っています。バックグランドコントロールを確認してください。これらが青コロニーでない場合、F'エピソームを失っていることが考えられます(適切なプレートが用いられ、 IacI^{qZ} M15が形質転換した菌体のF'に位置したと仮定した場合)。コンピテントセルがこのシステムに使用するために、適切に調製されているか確認してください(Section V参照)。

プレートが青/白スクリーニングに適合していません。バックグランドコントロールを実施してください。もし、青コロニーが認められない場合、アンピシリン/IPTG/X-Galプレートを調製してください。プレートの質が疑わしいときは、新たに調製したプレートを使用してください。

目的とするPCR産物を含むクローン数が十分に存在していない

PCR産物のA-tailing反応が不十分です。PCR産物を精製後、A-tailing反応を実施してください(9-11)。サンプルを精製し、プロトコルにしたがって操作を進めてください。

インサート：ベクターのモル比が最適化されていません。PCR断片の精製度と量をアガロース電気泳動で確認し、インサート：ベクターのモル比を最適化してください(Section VI. C参照)。

さまざまな鎖長のPCR産物が生成され、pGEM[®]-TおよびpGEM[®]-T Easy Vectorにクローニングされています。必要とする鎖長のPCR産物をアガロースゲル切り出しにより精製してください。

IX. 参考文献

1. Mezei, L.M. and Storts, D.R. (1994) Purification of PCR products. In: *PCR Technology: Current Innovations*, Griffin, H.G. and Griffin, A.M., eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 21.
2. Robles, J. and Doers, M. (1994) pGEM[®]-T Vector Systems troubleshooting guide. *Promega Notes* **45**, 19-20.
3. Clark, J.M. (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* **16**, 9677-86.
4. Newton, C.R. and Graham, A. (1994) In: *PCR*, BIOS Scientific Publishers, Ltd., Oxford, UK, 13.
5. Messing, J. et al. (1981) A system for shotgun DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* **9**, 309-21.
6. Knoche, K. and Kephart, D. (1999) Cloning blunt-end Pfu DNA Polymerase-generated PCR fragments into pGEM[®]-T Vector Systems. *Promega Notes* **71**, 10-13.
7. Haff, L. and Mezei, L. (1989) *Amplifications* **1**, 8.
8. *Protocols and Applications Guide*, Online Edition (2005) Promega Corporation. (www.promega.com/paguide/)
9. Kobs, G. (1995) pGEM[®]-T Vector: Cloning of modified blunt-ended DNA fragments. *Promega Notes* **55**, 28-29.
10. Kobs, G. (1997) Cloning blunt-end DNA fragments into the pGEM[®]-T Vector Systems. *Promega Notes* **62**, 15-18.
11. Zhou, M.-Y., Clark, S.E. and Gomez-Sanchez, C.E. (1995) Universal cloning method by TA strategy. *BioTechniques* **19**, 34-35.

X. 付録

X.A. pGEM®-T Vectorの配列情報および制限酵素で切断できる部位

pGEM®-T Vectorは、環状のpGEM®-5Zf(+) Vector(GeneBank® Accession No. X65308)からの誘導されてます。

pGEM®-5Zf(+) Vectorの配列は、ホームページに情報があります。 : www.promega.com/vectors

pGEM®-T Vectorは、pGEM®-5Zf(+) VectorのEco RVの認識部位(position : 51)で切断し、3'末端にTを付加しています。

各種制限酵素の認識部位は、英文マニュアルpg.21 ~ 22のTable 3およびTable4を参照してください。英文マニュアル : <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>

X.B. pGEM®-T Easy Vectorの配列情報

pGEM®-T Easy Vectorの配列は、ホームページに情報があります。 : www.promega.com/vectors

pGEM®-T Easy Vectorは、Eco RVの認識部位(position : 60)で切断し、3'末端にTを付加しています。

各種制限酵素の認識部位は、英文マニュアルpg.23 ~ 24のTable 6およびTable7を参照してください。英文マニュアル : <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>

X.C. Bufferと試薬の組成

IPTG ストック溶液(0.1M)

1.2g IPTG
 終容量が50mlとなるように水を添加する。
 フィルターろ過後、4℃で保存する。

X-Gal (2ml)

100mg
 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

2mlのN,N'-dimethyl formamideで溶解し、アルミホイルで遮光し、-20℃で保存する。

LB培地 (1リットル)

10g Bacto®-tryptone
 5g Bacto®-yeast extract
 5g NaCl

NaOHでpH7.0に調整する。

アンピシリンを含むLBプレート

1リットルのLB培地に15gの寒天を添加する。
 50℃になるまで培地が冷めたら、終濃度
 100µg/mlとなるようにアンピシリンを添加す
 る。85mmのペトリ皿に30~35mlの培地を注ぐ。
 アガロースが固まったら、4℃、1ヶ月間まで、
 室温では、1週間まで保存できる。

アンピシリン/IPTG/X-Gal プレート

上記のアンピシリンを含むLBプレート調製し、
 0.5mMのIPTGと80µg/mlのX-Galをこのプレ
 ートに添加する。あるいは、100mMのIPTG100µl
 と50mg/mlのX-Gal 20µlをアンピシリンを含む
 LB培地に塗布し、使用前に37℃、30分間静置し、
 LBプレート表面に吸着させる。

SOC培地 (100ml)

2.0g Bacto®-tryptone
 0.5g Bacto®-yeast extract
 1ml 1M NaCl
 0.25ml 1M KCl
 1ml 2M Mg²⁺ stock, filtersterilized
 1ml 2M glucose, filter-sterilized

Bacto®-tryptone、Bacto®-yeast extract、NaCl、KCl
 を97mlの蒸留水に添加し、攪拌して溶解させる。滅
 菌後、室温に冷却する。2M Mg²⁺と2M glucoseを終
 濃度が20mMとなるように、それぞれ添加する。終
 容量が100mlとなるように滅菌水を添加する。pH
 は、7.0になっていることを確認する。

2M Mg²⁺ ストック溶液

20.33g MgCl₂ · 6H₂O
 24.65g MgSO₄ · 7H₂O

100mlの滅菌水を添加する。フィルター滅菌する。

2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase (システムに付属)

60mM Tris-HCl (pH 7.8)
 20mM MgCl₂
 20mM DTT
 2mM ATP
 10% polyethylene glycol
 (MW8000, ACS Grade)

1回に使用する量を分注して -20℃に保存する。
 (凍結融解の繰り返しは避けてください。)

TYP プロス (1リットル)

16g Bacto®-tryptone
 16g Bacto®-yeast extract
 5g NaCl
 2.5g K₂HPO₄