

Flexi® Vector Systems

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS C8640, C8820, C9320

Quick
PROTOCOL

Flexi® Vector System は低頻度出現の制限酵素(シエカッター) Sgf I および Pme I による切断をベースにしており、迅速で効率よく目的遺伝子をクローニングあるいは移し換えることができます。

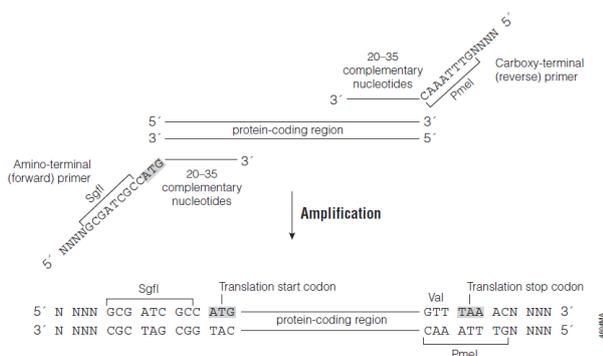
Flexi® Vector に含まれるバーナーゼ致死遺伝子が目的の DNA 断片と置換されることによるポジティブセレクションを行うことで、得られたコロニーは、非常に高い効率で目的遺伝子を含みます(プロトコル 1)。また、一度 Flexi® Vector に組み込んだ目的遺伝子は、Sgf I および Pme I で切断することで簡単に別の Flexi® Vector へ相互に組み換えることが可能です(プロトコル 2)。

プロトコル 1 : Flexi ベクターへの cDNA の組み込み

1) 以下のようなプライマーを設計して、PfuDNA Polymerase (カタログ番号 M7741) など正確性の高い PCR 酵素を使い、目的のタンパク質のコード領域(cDNA)を増幅します。プライマーの設計は、以下のサイトでも可能です。

(Flexi® Vector Primer Design Tool

<http://www.promega.com/techserv/tools/FlexiVectorTool/>)



2) Wizard® SV Gel and PCR(カタログ番号 A9281)をお使いいただき、PCR 産物を精製します。

3) 精製した PCR 産物、ベクターを制限酵素処理します。

Component①	Volume
5 × Flexi® Digest Buffer	4μl
精製した PCR 産物 (最大 500ng)	-μl
Flexi® Enzyme Blend (SgfI & PmeI)	4μl
Nuclease-Free Water で fill-up	20μl

Component②	Volume
Nuclease-Free Water	12μl
5 × Flexi® Digest Buffer	4μl
組み込み先の Flexi®ベクター (200ng)	2μl
Flexi® Enzyme Blend (SgfI & PmeI)	2μl
Final Volume	20μl

37°C、30 分の反応の後、ベクター②は、65°C、20 分加熱します。PCR 産物①は加熱せずに、次のステップへ進みます。

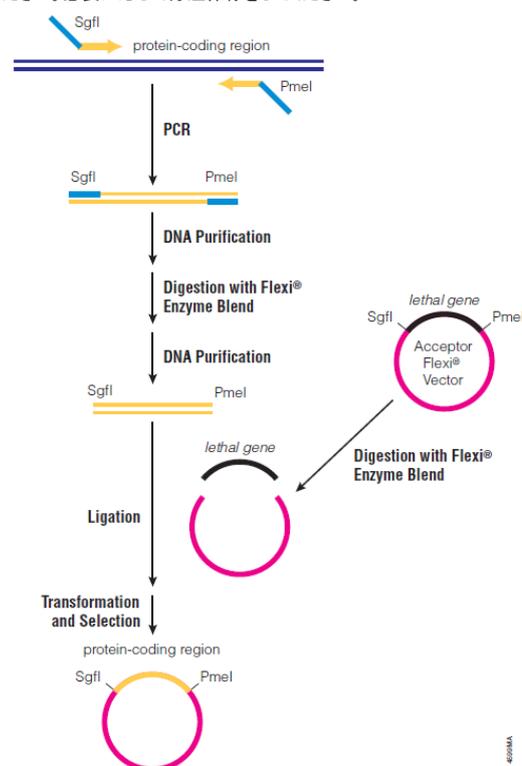
4) PCR 産物①は、制限酵素等を取り除くため、Wizard® SV Gel and PCR(カタログ番号 A9281)をお使いいただき、プロトコルに従って精製します。

5) ライゲーション反応を行います。

Component	Volume
2 × Flexi® Ligase Buffer	10μl
制限酵素処理したベクター(50ng)	5μl
制限酵素処理後に精製した PCR 産物(100ng)	-μl
T4 DNA Ligase (HC) (20u/μl)	1μl
Nuclease-Free Water で fill-up	20μl

室温で 1 時間反応します。

注) 2xFlexi® Ligase Buffer は ATP を含んでおり、凍結融解を繰り返さないようにしてください。必要に応じて分注保存をしてください。



6) ライゲーションした産物を、高い導入効率 (>1x10⁸cfu/μgDNA) を持つコンピテントセル(カタログ番号 L2001 など)へ形質転換します(詳細はマニュアル 9.G.を参照)。2μlを利用します。

7) 8-12 コロニーをチェックする。GoTaq® Green Master Mix は、コロニーPCR に最適です。

GoTaq® Green Master Mix を使ったコロニーPCR 法と制限酵素処理の組み合わせによる簡易インサート確認法 [https://www.promega.co.jp/lit/pdf/GoTaq_Green_Master_Mix .pdf](https://www.promega.co.jp/lit/pdf/GoTaq_Green_Master_Mix.pdf)

8) 大腸菌でプラスミドを増幅し、精製。シーケンスを確認する。シーケンスプライマーの情報は、Flexi ベクターの種類に合わせて以下のページよりご確認ください。

Sequencing Primers for Flexi® Vector Inserts (<https://www.promega.jp/resources/pubhub/enotes/sequencing-primers-for-flexi-vector-inserts/>)



Flexi® Vector Systems

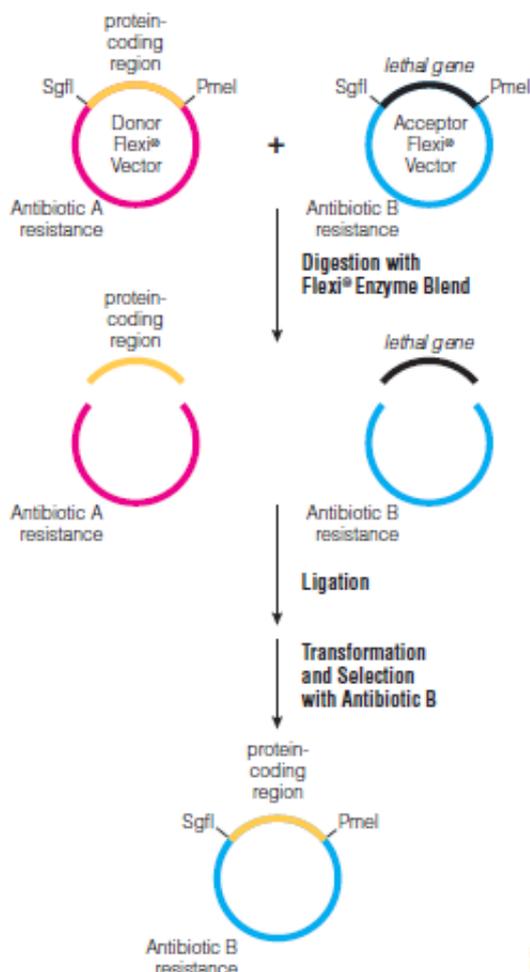
INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS C8640, C8820, C9320

Quick
PROTOCOL

プロトコル 2A : Protein-Coding Region の移し替え

同じ制限酵素サイトを使う場合

(たとえば pFN21A から pFN29K へ)



1) Wizard® Plus SV Minipreps などのキットで精製したプラスミド(Donor)と、遺伝子を移す先のベクター(Acceptor)を、制限酵素で処理します。Acceptor Vector は、致死遺伝子が組み込まれているため、大腸菌で増幅して使用することはできない。購入したものをお使いください。

2) 表に従って、試薬とプラスミドを混ぜて反応します。

Component	Volume
5 × Flexi® Digest Buffer	4µl
Acceptor Flexi® Vector (100ng)	1µl
Donor Flexi® Vector (100ng)	-µl
Flexi® Enzyme Blend (SgfI & PmeI)	2µl
Nuclease-Free Water で fill-up	20µl

3) 37°C、15-30 分間 反応する。

4) 制限酵素を失活させるため 65°C、20 分間熱処理を行う。ステップ 5 まで、反応液は氷上で保存する。

5) 制限酵素処理したプラスミドにバッファー、酵素を加えてライゲーションする。

Component	Volume
2X Flexi® Ligase Buffer	10µl
制限酵素処理済みの DNA (合計 100ng)	10µl
T4 DNA Ligase (HC)	1µl
Final Volume	21µl

6) 室温で 1 時間反応します。

注) 2xFlexi® Ligase Buffer は ATP を含んでおり、凍結融解を繰り返さないようにしてください。必要に応じて分注保存をしてください。

7) ライゲーションした産物を、高い導入効率 (>1x10⁸cfu/µgDNA) を持つコンピテントセル(カタログ番号 L2001 など)へ形質転換します(詳細はマニュアル 9.G.を参照)。

8) 少なくとも 4 コロニーをチェックする。GoTaq® Green Master Mix は、コロニー-PCR に最適です。

GoTaq® Green Master Mix を使ったコロニー-PCR 法と制限酵素処理の組み合わせによる簡易インサート確認法
https://www.promega.co.jp/lit/pdf/GoTaq_Green_Master_Mix.pdf

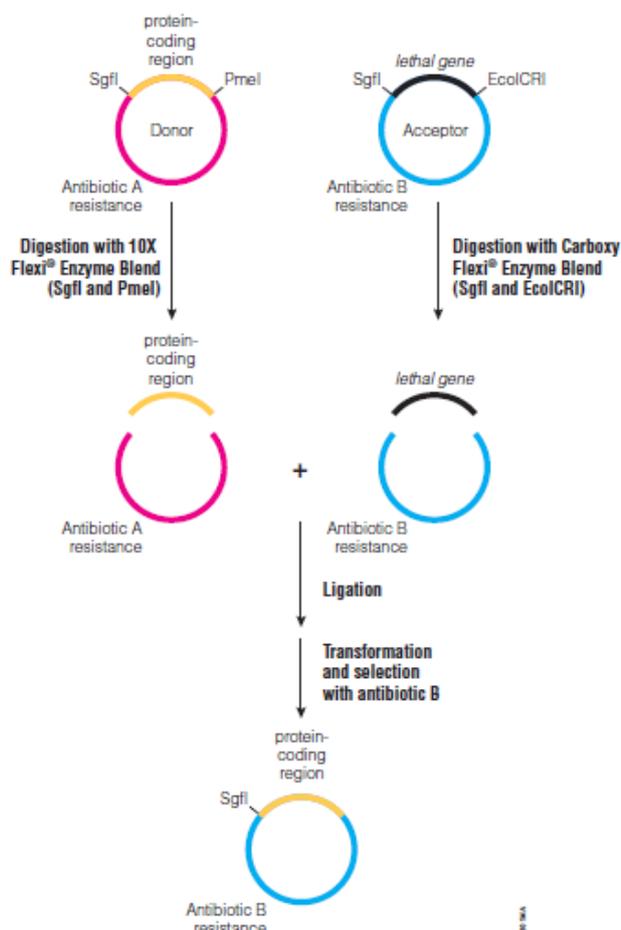
9)大腸菌でプラスミドを増幅し、精製。シーケンスを確認する。シーケンスプライマーの情報は、Flexi ベクターの種類に合わせて以下のページよりご確認ください。
Sequencing Primers for Flexi® Vector Inserts
(<https://www.promega.jp/resources/pubhub/enotes/sequencing-primers-for-flexi-vector-inserts/>)



Promega

プロトコル 2B : Protein-Coding Region の移し替え

N 末タグベクターから、C 末タグベクターへの移し替えの場合 (たとえば pFN21A から pFC18K へ)



1) ドナーとなるプラスミドを Wizard® Plus SV Minipreps System(#A1300)などを用いて準備する。

2) ドナーとなるプラスミドを制限酵素処理する。

Component	Volume
5 × Flexi® Digest Buffer	2µl
Donor Flexi® Vector (100ng)	-µl
Flexi® Enzyme Blend (SgfI & PmeI)	1µl
Nuclease-Free Water で fill-up	10µl

3) 移し替える先 (Acceptor)となるプラスミドを制限酵素処理する。

Component	Volume
5 × Flexi® Digest Buffer	2µl
Acceptor C-terminal Flexi® Vector (100ng)	1µl
Carboxy Flexi® Enzyme Blend (SgfI & EcoICRI)	1µl
Nuclease-Free Water	6µl
Final volume	10µl

4) 37°Cで 15-30 分間 インキュベーションする。

5) 65°Cで 20 分間インキュベーションし、制限酵素を不活性化する。ライゲーション反応するまで氷上で保管する。

6) 室温で 1 時間反応します。

注) 2xFlexi® Ligase Buffer は ATP を含んでおり、凍結融解を繰り返さないようにしてください。必要に応じて分注保存をしてください。

Component	Volume
2X Flexi® Ligase Buffer	10µl
制限酵素処理済みの donor DNA (合計 50ng)	5µl
制限酵素処理済みの acceptor DNA (合計 50ng)	5µl
T4 DNA Ligase (HC)	1µl
Final Volume	21µl

7) ライゲーションした産物を、高い導入効率 (>1x10⁸cfu/µgDNA) を持つコンピテントセル (カタログ番号 L2001 など) へ形質転換します (詳細はマニュアル 9.G を参照)。

8) 少なくとも 8 コロニーをチェックする。GoTaq® Green Master Mix は、コロニー-PCR に最適です。

GoTaq® Green Master Mix を使ったコロニー-PCR 法と制限酵素処理の組み合わせによる簡易インサート確認法 https://www.promega.co.jp/lit/pdf/GoTaq_Green_Master_Mix.pdf

9) 大腸菌でプラスミドを増幅し、精製。シーケンスを確認する。シーケンスプライマーの情報は、Flexi ベクターの種類に合わせて以下のページよりご確認ください。

Sequencing Primers for Flexi® Vector Inserts (<https://www.promega.jp/resources/pubhub/enotes/sequencing-primers-for-flexi-vector-inserts/>)

