

1. 概要

一般的に、細胞または組織由来の RNA から作製した cDNA (cDNA pool) から、特定の cDNA をベクターに組み込む操作を cDNA cloning と呼ぶ。その際、制限酵素認識配列を付与したオリゴ DNA primer を用いた PCR によって目的の cDNA を増幅した後に制限酵素処理を行い、同じ制限酵素で処理したベクターに組み込むのが一般的である。

一方、すでにベクターに組み込まれた cDNA の全長または一部を別のベクターに組み換える操作を subcloning と呼ぶ。この場合は、単に制限酵素で切り出した断片を他のベクターに組み換える場合と、組み換える制限酵素部位の変更や欠失変異体の作製のために、cDNA cloning と同様に制限酵素認識配列を付与した primer を用いた PCR で cDNA を作製し直してベクターに組み込む場合とがある。

本プロトコールでは、PCR を用いた cloning/subcloning 法について概説する。

2. PCR による cDNA の作製

2-1. PCR Primer の設計

基本設計: 増幅する領域の 5'末端および 3'末端の配列にそれぞれ 20~24 mer の Sense Primer および Antisense Primer を設定し、それぞれの 5'側に GCC+制限酵素認識配列を加える。

例 1 : 開始コドンの前に EcoRI 認識配列を加える。

Sense: 5'-GCC-GAA-TTC-XXX-ATG-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-3'

(C 末端タグの場合は、Kozak 配列を含む ATG の 5'側 3 塩基の内在性配列を加える。)

例 2 : 終始コドンの後に XhoI 認識配列を加える。

Antisense: 5'-GCC-CTC-GAG-YYY-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-XXX-3'

(C 末端タグの場合は終始コドン (YYY で示す) を除く。)

2-2. PCR 反応液の調製

100 pmol/μL (100 μM) の Primer 溶液を 10 倍希釈して 10 pmol/μL (10 μM) にする。(例: 原液 2 μL + TE 18 μL)
PCR 用チューブに下記溶液を加え、穏やかに混和する。ただし、酵素は最後に加える。

5×PS Buffer	10 μL
dNTP Mix	4 μL
PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara)	0.5 μL
Primer (F) (10 pmol/μL)	2 μL
Primer (R) (10 pmol/μL)	2 μL
Plasmid (約 100 ng/μL) または cDNA pool	1 μL
Milli-Q H ₂ O	30.5 μL
Total	50 μL

2-3. PCR

{	94 °C	1 min	} × 25~35 cycles
	94 °C	30 sec	
	60 °C	30 sec	
	72 °C	1 min / 1 kbp	
	72 °C	10 min	
	4 °C	99.99	

☞ サイクル数は cDNA クローニングの際は 35 まで OK。Plasmid を鋳型とする場合、鋳型量が十分に確保できるため、サイクル数は 25 までに抑える（変異の導入を避けるため）。目的のバンドが単一バンドとして得られない場合は、アニーリングの温度を変えてみる。

2-4. アガロース電気泳動による PCR 産物のチェック

パラフィルム上で

{	PCR 反応液	5 μL
	TE or Milli-Q	4 μL
	10×loading buffer	1 μL

をピペティングにて混和し、アガロースゲル電気泳動に供する。

2-5. フェノール/クロロホルム抽出

PCR 用チューブ内の反応液を TE または Milli-Q で洗いこみながら 1.5 mL チューブへ移す。

{	PCR 反応液	45 μL
	TE or Milli-Q H ₂ O	170 μL
	PhOH/Chlo	200 μL

(Invitrogen #15593-031 UltraPure Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol 25:24:1)

Vortex

- 15,000 rpm × 1 min
- 上層を別チューブに移す。（※ 中間層を取らないように注意）
- PhOH/Chlo 200 μL を入れて Vortex
- 15,000 rpm × 1 min
- 上層を別チューブに移す。（※ 中間層を取らないように注意）

☞ PhOH/Chlo は流しへ捨てずに回収。

2-6. エタノール沈殿（エタ沈）

2-5 で処理した反応液に下記の溶液を加える（on ice）。

{	3M Acetate	1/10 量	（例：反応液が 200 μL ならば 20 μL）
	Dr. GenTLE Precipitation Carrier*	4 μL	（* Takara #9094）
	Ice-cold 100% EtOH	2.5 倍量	（例：反応液が 200 μL ならば 500 μL）

- 15,000 rpm × 15 min
- ペレットを乱さないよう EtOH を取り除く。
- 70% EtOH 1mL を静かに加える。
- 15,000 rpm × 1 min
- ペレットを乱さないよう EtOH を取り除く。
- Dry up (チューブを逆さにして静置。)
- TE 10 μL に溶解。

3. 制限酵素消化および DNA 断片の精製

3-1. 制限酵素消化

{	ベクター (0.5~1.0 μg) または PCR 産物	10 μL
	10× buffer (適宜設定)	5 μL
	制限酵素 I (適宜設定)	1 μL
	制限酵素 II (適宜設定)	1 μL
	Milli-Q H ₂ O	33 μL
	Total	50 μL

2 hr インキュベート (通常 37 °C) ☞ 酵素によっては至適温度が異なる場合があるので注意。

3-2. アガロース電気泳動による制限酵素消化のチェック

パラフィルム上で

{	酵素反応液	5 μL
	TE or Milli-Q H ₂ O	4 μL
	10× loading buffer	1 μL

をピペッティングにて混和し、アガロースゲル電気泳動に供する。

3-3. ゲル抽出用電気泳動とゲルの切り出し

{	酵素反応液	45 μL
	10× loading buffer	5 μL

上記溶液を混和し、新しく作製したゲル抽出用の大きな well のアガロースゲルに、各サンプルをアプライする。通常のゲルを用いる場合は 3~4 well に分けてアプライする。その際、マーカーとサンプルの間や、異なるサンプルの間 (例: ベクターとインサート) に 1 well 分の間隔を空ける。

- 泳動 (100V 約 40 min)
- ゲル染色 (5~10 min in Et-Br Sol)
 - ☞ 新しく調製した Et-Br Sol を用いる。染めすぎないように注意。
- Milli-Q にて洗浄 (5~15 min)
- UV transilluminator にて写真撮影
 - ☞ UV による DNA の損傷を抑えるため、UV は最小に設定し、速やかに行う。

- カミソリ刃にてゲルをカットし、1.5 mL チューブに入れる。
- ☞ UV 照射の時間を抑えるよう速やかに行う。目的のバンド以外のアガロースを極力除く。
- カットしたゲルの重さを量る。

3-4. ゲルからの DNA 断片の抽出

<Promega #A9282 Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System を使用>

Membrane Binding Sol. をゲル 10 mg に対して 10 μ L 加えて、Vortex。

- 温浴 60 $^{\circ}$ C、10 min インキュベート (3 min おきに転倒混和)
 - Collection Tube に載せた SV カラムにゲル溶解液をアプライする。
 - RT 1 min 静置。
 - 15,000 rpm \times 1 min
 - Collection Tube に出てきた液は捨てる。
- } カラムには 750 μ L しか入らないので、それ以上ある時はこの操作を繰り返す。
- Membrane Wash Sol. 700 μ L をカラムにアプライする。
 - 15,000 rpm \times 1 min
 - Collection Tube に出てきた液は捨てる。
 - Membrane Wash Sol. 500 μ L をカラムにアプライする。
 - 15,000 rpm \times 5 min
 - Collection Tube に出てきた液は捨てる。
 - 15,000 rpm \times 5 min
 - 新しいチューブに替え、Nuclease-Free Water 25 μ L をカラムの中心部に、ピペットチップがメンブレンに触れないように注意しながらアプライする。
 - RT 1 min 静置。
 - 15,000 rpm \times 1 min
 - カラムを捨て、溶出液を保存する。

3-5. アガロース電気泳動による精製 DNA のチェック

パラフィルム上で

{	カラム溶出液	5 μ L
	TE or Milli-Q H ₂ O	4 μ L
	10 \times loading buffer	1 μ L

をピペッティングにて混和し、アガロースゲル電気泳動に供する。

4. ライゲーションおよびトランスフォーメーション

4-1. ライゲーション

PCR 用チューブで下記溶液を混和する。

{	DNA 抽出液 (インサート)	2 μ L
	DNA 抽出液 (ベクター)	2 μ L
	Ligation Sol. I (Takara #6022 Ligation Kit Ver.2.1)	4 μ L

- ☞ インサートとベクターの量は、3-5 の精製 DNA のチェックの結果を参考に調節する。インサートとベクター同量か、インサートの量を多めに設定する。
- ☞ Ligation Sol. は DNA 抽出液の総量の同量

→ PCR 装置にて 16 °C、30 min インキュベート。

4-2. トランスフォーメーション

ライゲーション反応液全量をコンピテントセル (XL1-blue) 100 μ L と混和する。

- On ice 30 min
- 温浴 43 °C、35~45 sec
- On ice 2 min
- SOC を 900 μ L 加え、37 °C、45 min インキュベート。
- 3,000 rpm \times 3min
- 上清の 800 μ L をすてて、残りを温和にピペッティングして懸濁
- 抗生剤入り LB プレートに播種
- 37 °C、overnight

Colony PCR あるいは Plasmid Mini Prep \rightarrow 制限酵素消化によって、適切な組換えベクターを確認する。

- ☞ PCR によって得られた cDNA については、その塩基配列をシーケンシングで必ず確認すること。