

タイトル: 制限酵素サイトの無い位置への目的断片のクローニング (In-Fusionクローニング)

カテゴリ: クローニング
 キーワード: In-Fusion、クローニング、制限酵素
 データソース: BIOVIEW No.56

方法:

発現用ベクター(4.4 kb)を鋳型に、ベクター上の開始コドンATGの上流と下流に設定したベクター配列に相補的なプライマーとPrimeSTAR® Maxを用いて、PCR増幅により線状化ベクターを調製した。目的DNA断片(0.4 kb、MAP1LC3B遺伝子のORF)は、HL 60由来のcDNAを鋳型に、ベクター末端領域に相補的な15塩基を5'端に有するプライマー(40 mer、39 mer)とPrimeSTAR® Maxを用いてPCR増幅した。電気泳動でそれぞれシングルバンドであることを確認後、PCR産物をIn-Fusion® Advantage PCR Cloning Kit w/Cloning Enhancer 付属のCloning Enhancerで処理し、線状化ベクターDNA溶液1 µlと目的DNA断片溶液2 µlを用いてIn-Fusionクローニングを行った。形質転換には*E. coli* HST08 Premium Competent Cellsを使用した。

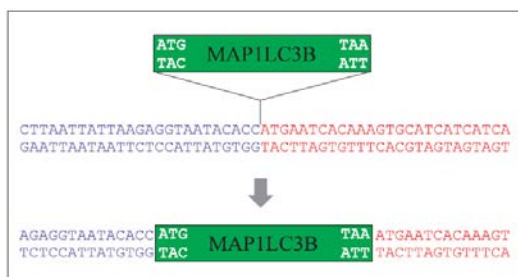


Fig1: MAP1LC3B 遺伝子クローニング概要
 発現ベクターの制限酵素サイトの無い開始コドンATGの位置に、MAP1LC3B遺伝子をクローニングした。

結果:

In-Fusion反応液の1/5量を播種した結果、1,202個の形質転換体コロニーを取得した。任意にピックアップしたコロニーについてコロニーPCRによりインサートチェックを行った結果、調べた12コロニーすべてで目的サイズのDNAのクローニングが確認された。

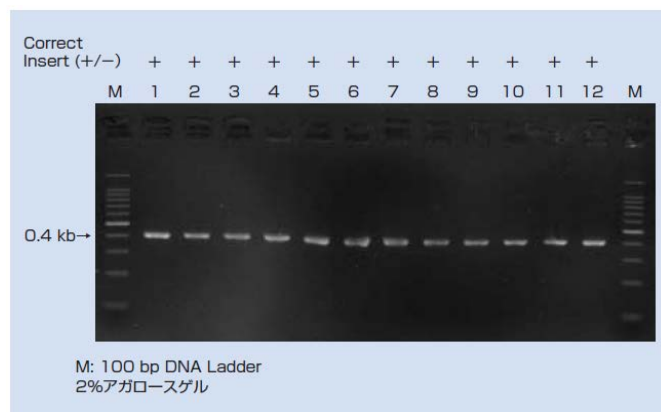


Fig2: コロニーPCRによるインサートの確認結果
 In-Fusion反応後の形質転換体から、ランダムに12コロニーを選択した。これに対してコロニーPCRを行ったところ、すべてのコロニーにおいて、目的サイズDNAのクローニングが確認された。

備考: In-Fusion® HD Cloning Kit w/Cloning Enhancer (製品コード [639633](#))*
E. coli HST08 Premium Competent Cells(製品コード [9128](#))

* In-Fusion® Advantageキットシリーズは終売しました。プレミックス化や反応時間短縮でさらに便利になったIn-Fusion® HD クローニングキットシリーズをご利用ください。