

製品コード RR015

研究用

TaKaRa

TaKaRa LA PCR™
***in vitro* Cloning Kit**

説明書

v201609Da

本キットは、Cassette および Cassette Primer を使用することにより、cDNA やゲノム上の未知領域を特異的に増幅させる従来の PCR *in vitro* Cloning Kit に、長鎖 DNA を効率良く増幅する LA PCR Technology を応用したシステムです。これにより、増幅が難しかった長鎖の未知領域が簡単にクローニングできるようになりました。また、LA PCR Technology では、従来よりも高い fidelity を提供するため、PCR *in vitro* cloning の場合に懸念される mutation の挿入も減少します。本キットにより、ライブラリーの調製やスクリーニングを行わなくても、目的とするゲノム等の長鎖の DNA を得ることが可能です。

I. 内容 (10 回分、50 μ l PCR 反応系)

1. <i>Sau</i> 3A I Cassette	(200 ng/ μ l)	25 μ l
<i>Sau</i> 3A I は、4 塩基認識の制限酵素なので酵素処理で生じるゲノム断片の数が多くなります。そのため Cassette の濃度は高く設定されています。コントロール反応は Cassette を 10 倍希釈して使用しますが、通常の反応はこのまま使用してください。		
2. <i>Eco</i> R I Cassette	(20 ng/ μ l)	25 μ l
3. <i>Hind</i> III Cassette	(20 ng/ μ l)	25 μ l
4. <i>Pst</i> I Cassette	(20 ng/ μ l)	25 μ l
5. <i>Sal</i> I Cassette	(20 ng/ μ l)	25 μ l
6. <i>Xba</i> I Cassette	(20 ng/ μ l)	25 μ l
7. Cassette Primer C1	(10 pmol/ μ l)	20 μ l
8. Cassette Primer C2	(10 pmol/ μ l)	20 μ l
9. Ligation Solution I *		150 μ l
10. Ligation Solution II *		75 μ l
11. <i>TaKaRa</i> LA <i>Taq</i> [®]	(5 units/ μ l)	10 μ l
12. 10 \times LA Buffer II (Mg ²⁺ plus)	(Mg ²⁺ 濃度 25 mM)	100 μ l
13. dNTP Mixture	(各 2.5 mM)	160 μ l
14. Control DNA Fragment	(100 ng/ μ l)	25 μ l
[ヒトゲノム (HL60) <i>Bam</i> HI digested fragment]		
15. Control Specific Primer CS-1	(10 pmol/ μ l)	10 μ l
16. Control Specific Primer CS-2	(10 pmol/ μ l)	10 μ l

* : Ligation Solution I, II は DNA Ligation Kit Ver.2.1 (製品コード 6022) の I 液、II 液と同じものです。

<コントロールプライマーのシーケンス>

Control Specific Primer CS-1

5'-ATA GTG GAA TGA AGG TTC ATT TTT CAT TCT CAC AA-3'

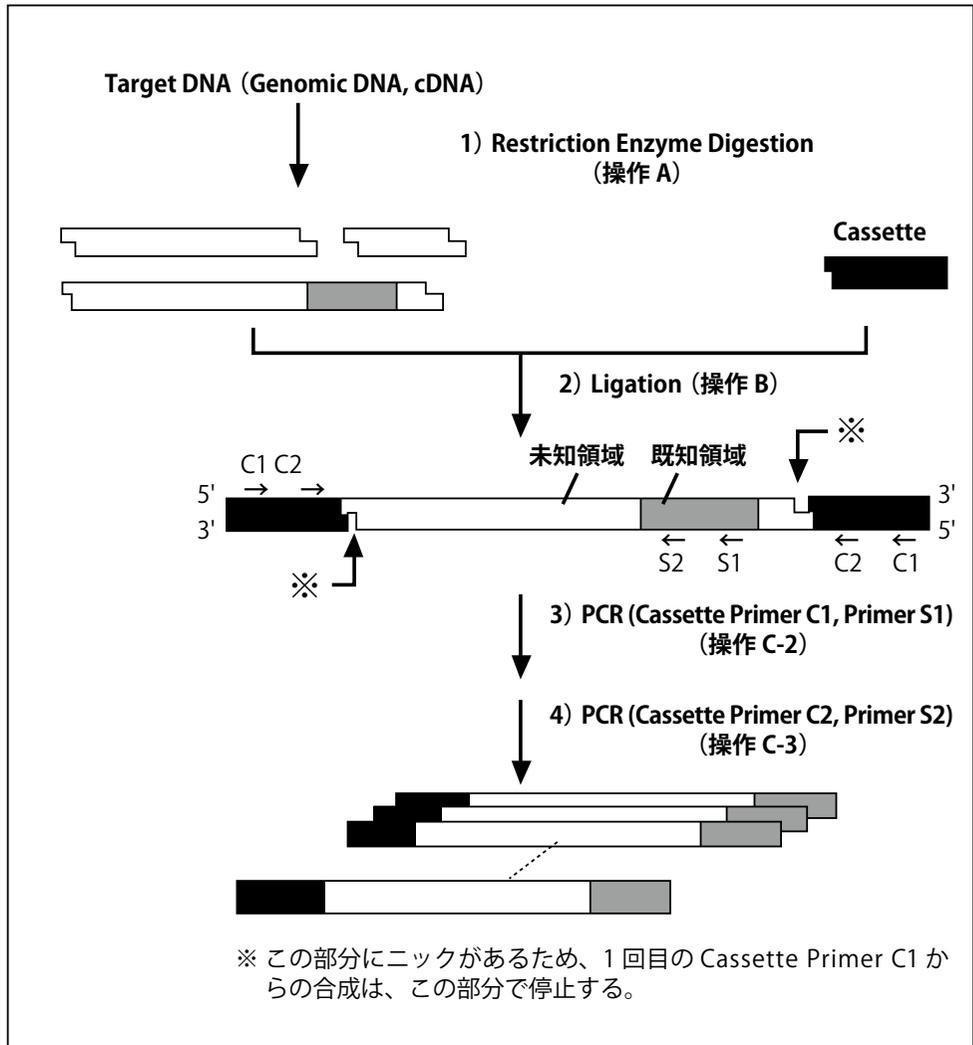
Control Specific Primer CS-2

5'-TGA TAG GCA CTG ACT CTC TGT CCC TTG GGC TGT TT-3'

II. 保存 — 20°C

III. 原理

- 1) クローニングのターゲットとなる DNA を適当な制限酵素で完全消化する。
- 2) ライゲーション反応により、対応する制限酵素サイトを持つカセットをつなぐ。
- 3) Cassette Primer C1 と、DNA 上の既知領域に相補的なプライマー Primer S1 を用いて 1 回目の PCR を行う。
- 4) 3) の反応液の一部を用いて、内側の Cassette Primer C2 および既知領域の Primer S2 で 2 回目の PCR を行い、目的の DNA のみを増幅させる。



カセットの 5' 末端にはリン酸基が付いていないので、ターゲット DNA の 3' 末端とカセットの 5' 末端との接続部位にはニックができる。そのため、1 回目の PCR では、Cassette Primer C1 からの合成はこの接続部分でストップし、非特異的な増幅は起こらない。Primer S1 から合成された DNA だけが Cassette Primer C1 からの合成の鋳型となり、相補鎖の形成が行われる。さらに、2 回目の PCR を内側のプライマー (Cassette Primer C2、Primer S2) で行うことにより、効率良く特異的な増幅を行うことができる。タンパク質のアミノ酸配列が部分的にわかっている場合には、その情報をもとにして作製した mixed primer を使用することによりそのタンパク質をコードしている cDNA をクローニングすることもできる。

IV. 操作 1：一般の反応

A. DNA の制限酵素消化

A-1. 下記の反応液を調製し、適切な温度で 3～5 時間インキュベートする。

DNA	5 μ g
制限酵素	50 U*1
10 × 制限酵素用 Buffer	5 μ l
滅菌精製水	up to 50 μ l

* 1：DNA を完全消化させるのに必要な制限酵素量は、調製した DNA の純度に依存するが DNA 1 μ g に対して 10 U を目安にする。

A-2. 反応終了後、エタノール沈殿により DNA を回収し、10 μ l の滅菌精製水に溶解する。

B. ライゲーション反応

B-1. 下記の反応液を調製し、16°C で 30 分間反応させる。

A で調整した DNA 溶液	5 μ l
Cassette*2	2.5 μ l
Ligation Solution I	15 μ l
Ligation Solution II	7.5 μ l

* 2：*Sau3A* I Cassette を 6 塩基対認識の制限酵素 (*Bam*H I、*Bgl* II、*Fba* I、*Mfl* I) で消化した DNA にライゲーションする場合、Cassette 溶液を滅菌精製水で 10 倍に希釈したものをを用いる。

B-2. 反応終了後、エタノール沈殿により DNA を回収し、5 μ l の滅菌精製水に溶解する。

C. PCR による増幅反応

C-1. B-2. で調製した DNA 溶液 1 μ l を滅菌精製水 33.5 μ l に加え、94°C で 10 分間加熱する。

C-2. 下記の条件で 1 回目の PCR を行う。

C-1. の DNA 溶液	34.5 μ l
10 × LA Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
TaKaRa LA Taq	0.5 μ l
dNTP Mixture	8 μ l
Cassette Primer C1	1 μ l
Primer S1	1 μ l

< 4 kb の場合

94°C	30 sec.	} 30 cycles
55°C	30 sec.	
72°C	4 min.*3	

* 3：< 1 kb が予想される場合は 1 min. で行ってください。

≥ 4 kb の場合

96～98°C	10～20 sec.*4	} 30 cycles
68°C	15 min.	

* 4：変性条件は Thermal Cycler の特性を考慮して設定してください。TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® を使用する場合は 98°C、10 sec. が適当です。

C-3. C-2.の反応液の一部を滅菌精製水で適宜希釈したもの(原液～10,000倍希釈) 1 μ lを用いて、2回目のPCRを行う。

C-2.を希釈したもの	1 μ l
10 \times LA Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
TaKaRa LA Taq	0.5 μ l
dNTP Mixture	8 μ l
Cassette Primer C2	1 μ l
Primer S2	1 μ l
滅菌精製水	33.5 μ l

< 4 kb の場合

94°C	30 sec.	} 30 cycles
55°C	30 sec.	
72°C	4 min.*5	

* 5 : < 1 kb が予想される場合は 1 min. で行ってください。

\geq 4 kb の場合

96 ~ 98°C	10 ~ 20 sec.*6	} 30 cycles
68°C	15 min.	

* 6 : 変性条件は Thermal Cycler の特性を考慮して設定してください。
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice を使用する場合は 98°C、10 sec. が適当です。

C-4. 反応液の一部を電気泳動し、増幅を確認する。

【注意】

本製品の各 Cassette には T7 プロモーター配列が含まれていますので、1st PCR および 2nd PCR により得られた PCR 産物には T7 プロモーター配列が含まれています。

したがって、得られた PCR 産物は T7 promoter primer を用いてダイレクトシーケンスすることが可能です。なお、T7 プロモーター配列を含むクローニングベクター (pT7 Blue T-Vector (メルク社) など) に PCR 産物をクローニングした場合は、T7 promoter primer を用いてシーケンスすることはできませんので、ご注意ください。

V. 操作 2 : コントロール反応

A. ライゲーション反応

A-1. 反応液を調製し、16°C で 30 分間反応させる。

Control DNA Fragment	5 μ l
Sau3A I Cassette (10 倍希釈) *1	2.5 μ l
Ligation Solution I	15 μ l
Ligation Solution II	7.5 μ l

* 1 : Control DNA Fragment は、ヒトゲノム (HL60) BamHI digested fragment であるため、Sau3A I Cassette は、滅菌精製水で 10 倍希釈したものをを用いる。

A-2. 反応終了後、エタノール沈殿により DNA を回収し、5 μ l の滅菌精製水に溶解する。

B. PCR 法による増幅反応

B-1. A-2. で調製した DNA 溶液 1 μ l を滅菌精製水 33.5 μ l に加え、94°C で 10 分間加熱する。

B-2. 下記の条件で 1 回目の PCR を行う。

B-1. の DNA 溶液	34.5 μ l
10 \times LA Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
TaKaRa LA Taq	0.5 μ l
dNTP Mixture	8 μ l
Cassette Primer C1	1 μ l
Control Specific Primer CS-1	1 μ l

94°C 30 sec. }
55°C 30 sec. } 30 cycles
72°C 30 sec. }

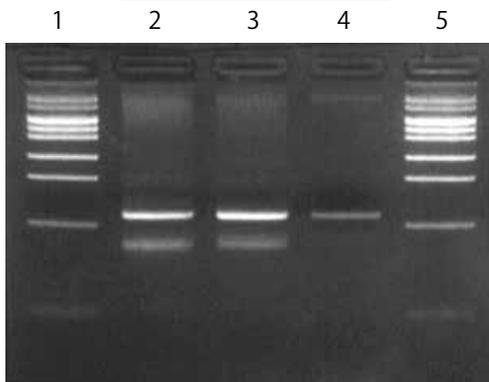
B-3. B-2. の反応液の一部を滅菌精製水で適宜希釈したもの(原液 \sim 10,000 倍希釈) 1 μ l を用いて、2 回目の PCR を行う。

B-2. を希釈したもの	1 μ l
10 \times LA Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
TaKaRa LA Taq	0.5 μ l
dNTP Mixture	8 μ l
Cassette Primer C2	1 μ l
Control Specific Primer CS-2	1 μ l
滅菌精製水	33.5 μ l

94°C 30 sec. }
55°C 30 sec. } 30 cycles
72°C 30 sec. }

B-4. 反応液の一部を電気泳動すると 288 bp の増幅フラグメントが確認できる。

コントロール反応 (288 bp)



レーン 1 : pHY Marker
2 : 1st PCR 反応液 1 μ l 使用
3 : 1st PCR 反応液 10 倍希釈 1 μ l 使用
4 : 1st PCR 反応液 100 倍希釈 1 μ l 使用
5 : pHY Marker

3% Agarose gel

5 μ l 泳動

VI. 実験例：ヒトゲノム DNA から β -globin region の 9.3 kb をクローニング

A. DNA の制限酵素消化

A-1. 下記反応液を調製し、30°Cで3時間インキュベートする。

ヒトゲノム DNA	3 μ g
<i>Bam</i> HI	50 U
10 \times Buffer K	5 μ l
滅菌精製水	up to 50 μ l

A-2. 反応終了後、エタノール沈殿により DNA を回収し、10 μ l の滅菌精製水に溶解する。

B. ライゲーション反応

B-1. 下記反応液を調製し、16°Cで30分間インキュベートする。

A-1. で調製した DNA 溶液	5 μ l
<i>Sau</i> 3A I Cassette*1	2.5 μ l
Ligation Solution I	15 μ l
Ligation Solution II	7.5 μ l

* 1：このとき、Cassette 溶液を滅菌精製水で 10 倍に希釈したものをを用いる。

B-2. 反応終了後、エタノール沈殿により DNA を回収し、5 μ l の滅菌精製水に溶解する。

C. 1st PCR

C-1. B-2. で調製した DNA 溶液 1 μ l を 33.5 μ l の滅菌精製水に加え、94°Cで10分間加熱する。

C-2. 下記反応液を調製する。

C-1. で調製した DNA 溶液	34.5 μ l
10 \times LA Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
<i>TaKaRa LA Taq</i>	0.5 μ l
dNTP Mixture	8 μ l
Cassette Primer C1	1 μ l
Primer A1	1 μ l
Total	50 μ l

Primer A1

5'-CAG AAA GTG TTT CTG AAA GAG GGA TTA GCC CGT TG-3'

反応条件

94°C 1 min.
98°C 10 sec. 14 cycles
68°C 15 min. 16 cycles
98°C 10 sec. 16 cycles
68°C 15 min. + 15 sec./cycles 16 cycles
72°C 10 min.

D. 2nd PCR

D-1. C-2. の反応液の原液、および滅菌精製水で 10 倍希釈、100 倍希釈したもの
1 μ l を用いて 2nd PCR を行う。

C-2. の反応液	1 μ l
10 \times LA Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
TaKaRa LA Taq	0.5 μ l
dNTP Mixture	8 μ l
Cassette Primer C2	1 μ l
Primer A2	1 μ l
滅菌精製水	33.5 μ l
Total	50 μ l

Primer A2

5'-TGC ACC TGC TCT GTG ATT ATG ACT ATC CCA CAG TC-3'

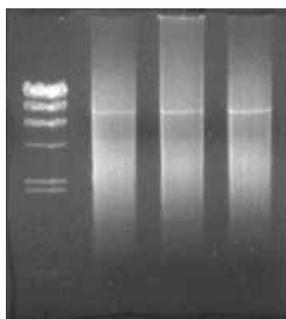
反応条件

C-2. と同条件

D-2. 電気泳動にて、増幅を確認する。

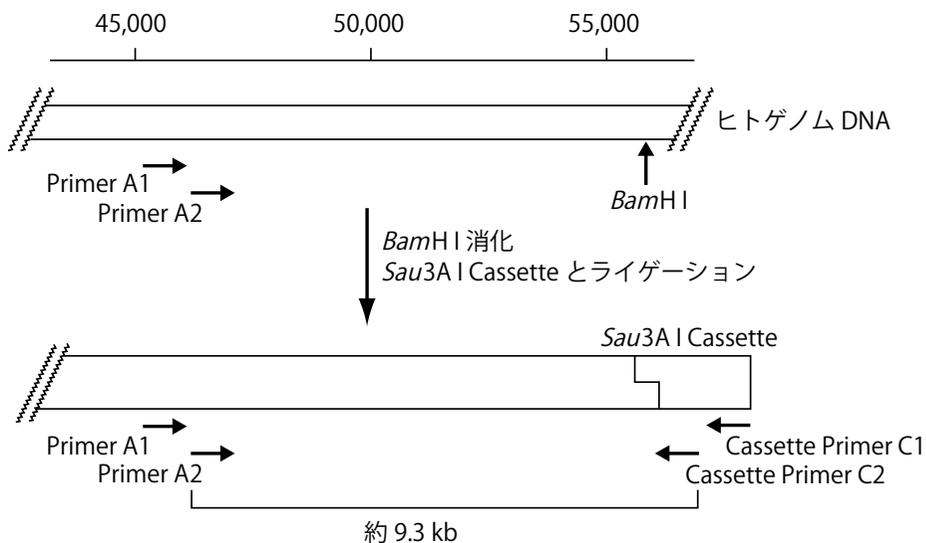
< β -globin 領域 (9.3 kb) のクローニング >

M 1 2 3



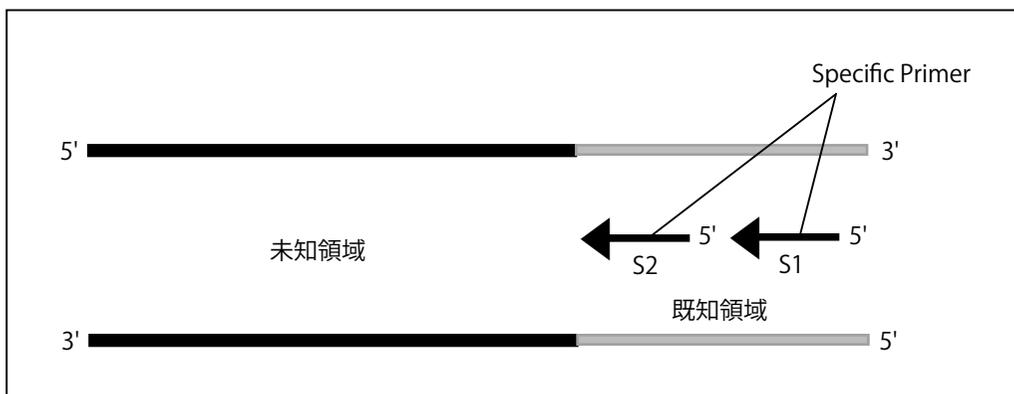
レーン 1 : 1st PCR 反応液 1 μ l 使用
2 : 1st PCR 反応液 10 倍希釈 1 μ l 使用
3 : 1st PCR 反応液 100 倍希釈 1 μ l 使用
M : λ -Hind III digest
1% Agarose gel
5 μ l 泳動

【原理】



VII. Specific Primer の選定の目安

1. 既知領域からの選定



増幅を行いたい未知領域に対して、その領域を増幅させる方向に作製する。
S1、S2 の位置関係は、S2 は S1 の内側に位置し、その 2 つのプライマー間の隔たりに特に制限はない。

そのデザイン上の条件としては

- 1) 鎖長は 20 ~ 35 塩基 (長鎖 DNA 断片の増幅を期待される場合は 30 ~ 35 塩基が望ましい)
 - 2) GC 含量は 50% 程度とし、部分的に GC あるいは AT に片寄るのを避ける。特にプライマーの 3' 側が AT リッチにならないようにする。
 - 3) プライマー自身にヘアピンなどの著しい 2 次構造がないようにする。
 - 4) 両 Specific Primer (S1、S2) は、Cassette Primer (C1、C2) との組み合わせで用いるため、プライマーダイマーを形成しないように、特に 3' 側 3、4 塩基の部分が相手側の配列と相補的にならないようにする。
- などが考えられる。

2. タンパク質のアミノ酸配列を基にする選定

- 1) 得られたアミノ酸配列を基にプライマーを選定する場合、まずアミノ酸配列よりそれをコードする塩基配列に変換する。なるべく degeneracy の少ない領域よりプライマーを選択するようにするが、degeneracy の少ない短いプライマーよりは degeneracy が多少多くても長いプライマーの方が良い結果が得られることが多い。
- 2) degeneracy が多いプライマーはそのまま用いるしかないが、どうしても degeneracy を少なくしたい場合は、たとえば codon usage を考えて作製することなどが考えられる。
- 3) 3' 末端は mix にならないようにする。
- 4) mixed primer を用いるとアニーリング温度を下げる必要があり、その結果、非特異的な増幅が起こりやすくなる。配列の情報に余裕がある場合には、さらに内側にプライマーを作製することによって目的の増幅断片を同定することが可能となる。

VIII. Cassette および Cassette Primer の配列

Sau3A I Cassette

5' HOGTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGA 3'
3' CATGTATAACAGCAATCTTGCGCATTATGCTGAGTGATATCCCTCTAG OH 5'

EcoRI Cassette

5' HOGTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAG 3'
3' CATGTATAACAGCAATCTTGCGCAT TATGCTGAGTGATATCCCTCTCTAA OH 5'

Hind III Cassette

5' HOGTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGA 3'
3' CATGTATAACAGCAATCTTGCGCATTATGCTGAGT GATATCCCTCTTCGA OH 5'

Pst I Cassette

5' HOGTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGCA 3'
3' CATGTATAACAGCAATCTTGCGCATTATGCTGAGTGATATCCCTCTG OH 5'

SaI Cassette

5' HOGTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAG 3'
3' CATGTATAACAGCAATCTTGCGCATTATGCTGAGTGATATCCCTCTCAGCT OH 5'

Xba I Cassette

5' HOGTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAT 3'
3' CATGTATAACAGCAATCTTGCGCATTATGCTGAGTGATATCCCTCTAGATC OH 5'

Cassette Primer C1

5' GTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCA 3'

Cassette Primer C2

5' CGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGA 3'

IX. 参考文献

- 1) Isegawa, Y., Sheng, J., Sokawa, Y., Yamanishi, K., Nakagomi, O., and Ueda, S. *Molecular and Cellular Probes*. (1992) **6**: 467-475.
- 2) Barnes, W. M. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1994) **91**: 2216-2220.
- 3) Cheng, S. *et al. Proc Natl Acad Sci USA*. (1994) **91**: 5695-5699.
- 4) Cheng, S. *et al. Nature*. (1994) **369**: 684-685.
- 5) 内村結花 蛋白質 核酸 酵素 (1990) **35**: 3157-3163.

X. 関連製品

Cassette, *Xba* I (製品コード 3874)
Cassette, Primer C1 (製品コード 3877)
*Bam*HI (製品コード 1010A/B)
*Eco*RI (製品コード 1040A/B)
Hind III (製品コード 1060A/B)
Pst I (製品コード 1073A/B)
*Sa*I (製品コード 1080A/B)
Xba I (製品コード 1093A/B)
Bgl II (製品コード 1021A/B)
Fba I (*Bcl* I) (製品コード 1045A/B)
Mfl I (*Xho* II) (製品コード 1070A/B)
DNA Ligation Kit Ver.2.1 (製品コード 6022)
TaKaRa LA Taq® (製品コード RR002A/B)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)

XI. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・*TaKaRa LA Taq*、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。LA PCR はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社