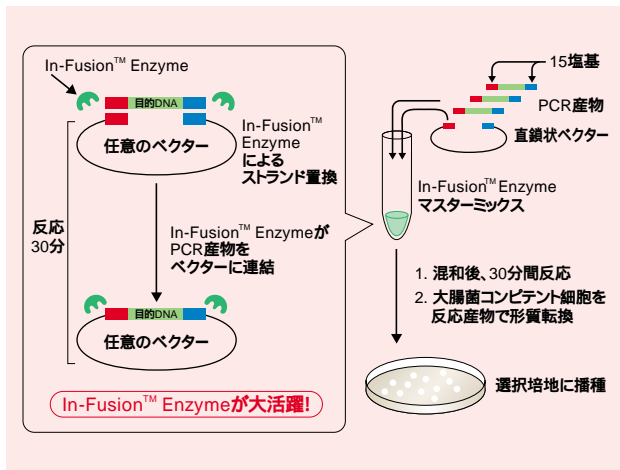


制限酵素いらずのDirectional Cloning

「In-Fusion™ PCRクローニングキット」と
 ハイフィデリティーPCR酵素「PrimeSTAR®」との組み合わせで、
 極めてエラーの少ない自由自在のクローニングが実現できます。

In-Fusion™ PCRクローニングはClontech社が独占的に権利を保有するIn-Fusion™ Enzymeに基づいており、この酵素は直鎖状ベクターにPCR増幅産物を効率的かつ正確に連結します。ベクター末端とインサート末端の15塩基が同じであれば、どんなベクターのどんな場所にも、どんな配列でもクローニング可能です。余分な配列を持ち込むことなく正しい向きに簡単にクローニングできるため、発現ベクターの構築をはじめ、様々なクローニングに応用できます。抜群の正確性をもつPCR酵素PrimeSTAR® HS DNA Polymeraseとの組み合わせにより、その可能性がさらに広がります。本稿では、In-Fusion™ PCRクローニングキットとPrimeSTAR® HS DNA Polymeraseを用いた実験例・応用例をご紹介します。

In-Fusion™ クローニングの概要



In-Fusion™ 基本実験

実験例1：PrimeSTAR®増幅産物の基本的なIn-Fusion™クローニング

In-Fusion™ PCRクローニングは、余分な配列を全く持ち込まず、正しい向きに簡単にクローニングできる優れた方法です。また、長いインサートも効率よく、クローニング可能です(8 kbpまで確認)。

【方法】

鋳型(λ-DNA)相補的な配列(22~35塩基)の5'端にキット付属のクローニングベクター(pDNR-Dual)に相補的な配列

(16塩基)を付加したプライマーを用い、PrimeSTAR® HS DNA Polymeraseを用いた2 step PCRで各インサートを増幅した(増幅鎖長0.5~8 kbp)、得られた増幅産物からフィルター付遠心チューブSUPREC®-PCRでプライマーとdNTPの除去処理後、直鎖状化済みpDNA-Dualに、In-Fusion™ Dry-Down PCR Cloning Kitを用いてIn-Fusion™クローニングし、Fusion-Blue™ Competent Cellに形質転換した(X-Gal/IPTG/Ampプレートで青/白選択)(図1)。

* : PCR反応によりエキストラバンドが生じた場合にはゲル抜き精製などが必要です。

【結果】

得られた白コロニーよりプラスミド調製を行い、制限酵素消化(Hind III, Sal I)によりインサートサイズをチェックした結果、PrimeSTAR®で増幅した0.5、1、2、4、6、8 kbpのいずれのPCR産物も、In-Fusion™により適切にクローニングされたことが確認できました(それぞれ4クローンをチェック、確率は3/4~4/4)(図2)。

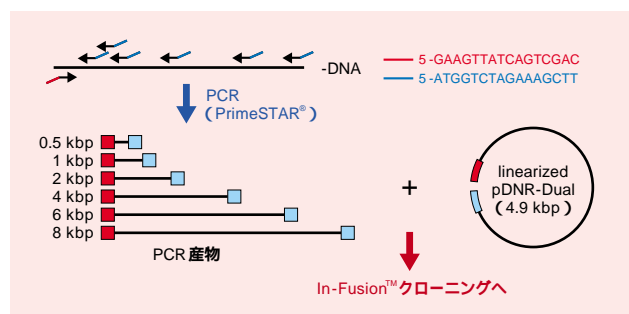


図1 実験の概略

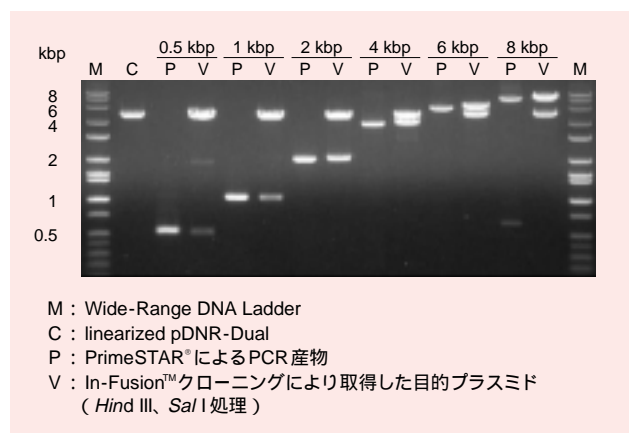


図2 結果の確認

In-Fusion™ 応用実験

実験例 2 : In-Fusion™ と PrimeSTAR® による制限酵素サイトに全く依存しないクローニング

非常に正確性の高い増幅が可能なPrimeSTAR®で、PCR 増幅を行い、直鎖状のベクターを調製することにより、制限酵素とは無関係に任意の位置にクローニング可能です。余分な配列が付く心配もないので、タグ導入など幅広い応用が可能です。

【方法】

クローニング用プラスミド pKF3(Cm^r) を鋳型に、プラスミド上の任意の箇所を起点とするプラスミド相補的なプライマーと PrimeSTAR® HS DNA Polymerase を用いて PCR を行い、直鎖状のベクターを調製した。一方、挿入 DNA (pBR322 由来 Amp^r 遺伝子) の調製は、上記クローニングサイト付近に相補的な配列 (15 ~ 16 塩基) を有するプライマーを用いて行った。得られた PCR 反応液を実験例 1 と同様に SUPREC®-PCR で処理し、In-Fusion™ クローニングを行い、形質転換に用いた (Amp/Cm プレートで選択) (図 3)。

【結果】

得られた形質転換体よりプラスミドを調製し、設定した 2 パターン (Type 1、2) のプラスミドが構築できたことを確認しました (図 4)。

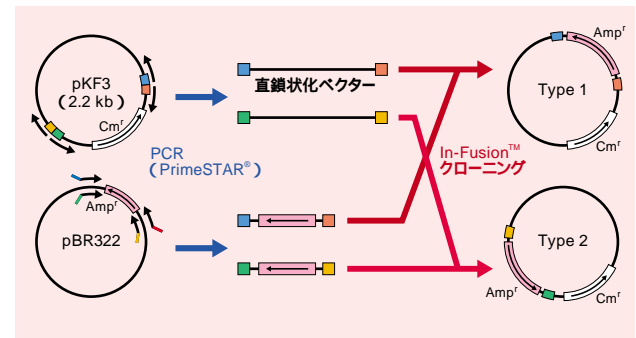


図 3 実験の概略

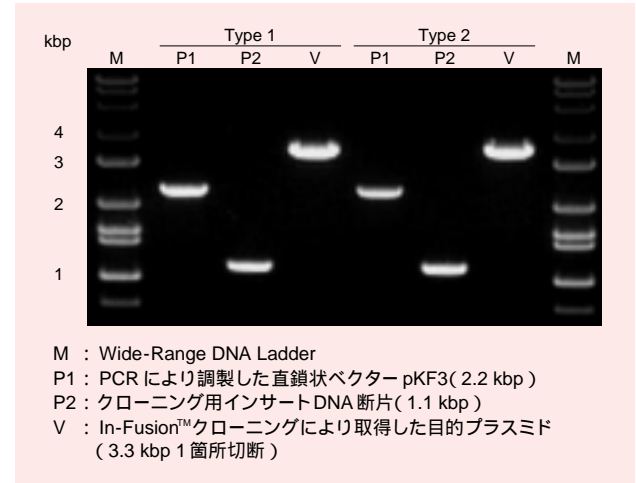


図 4 結果の確認

実験例 3 : In-Fusion™ と PrimeSTAR® による 2 つの挿入 DNA の同時連結クローニング

In-Fusion™ クローニングでは、任意の位置、向き、並びで、複数の挿入を同時にクローニングすることが可能です。以下には、2 つの挿入を同時にクローニングした例を示します。

【方法】

クローニング用プラスミド pKF3(Cm^r) を鋳型に、プラスミド上の任意の箇所を起点とするプラスミド相補的なプライマーと PrimeSTAR® HS DNA Polymerase を用いて PCR を行い、直鎖状のベクターを調製した。一方、2 つの挿入 DNA (pBR322 由来 Amp^r 遺伝子) の調製は、上記クローニングサイト付近に相補的な配列 (15 塩基) を有するプライマーと PCR 増幅後の 2 つの挿入 DNA 末端が重複 (15 塩基) するように設計したプライマーを 2 セット用意 (0.43 + 0.70 kbp、0.73 + 0.40 kbp) して行った。得られた PCR 反応液を実験例 1 と同様に SUPREC®-PCR で処理し、2 つの挿入 DNA を同時に In-Fusion™ クローニングし、形質転換に用いた (Cm プレートで選択) (図 5)。

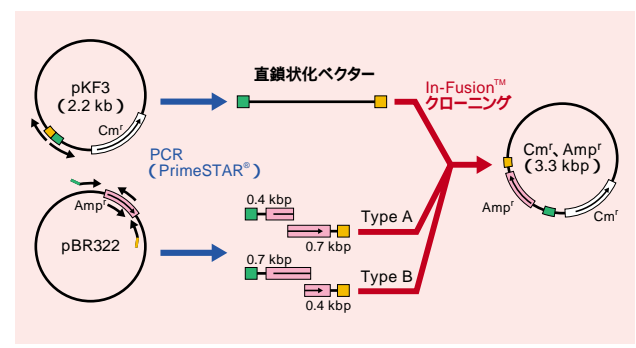


図 5 実験の概略

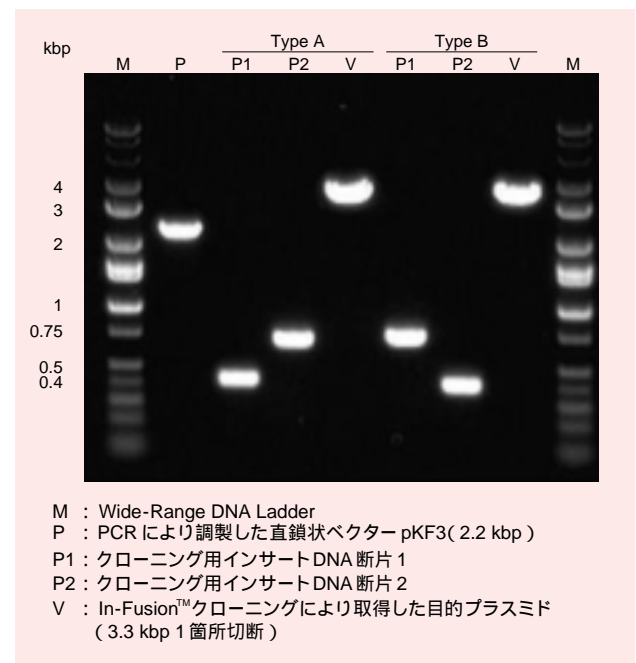


図 6 結果の確認

【結果】

Type A、Type B の In-Fusion™ クローニングを行い、それぞれクロラムフェニコール含有プレート上に生育した 90 クローンの形質転換体について、アンピシリン耐性の有無を確認したところ、Type A では 30 クローンが、Type B では 45 クローンが、アンピシリン耐性を示しました。さらに、これらの形質転換体からプラスミドを調製し、設定した 2 パターンのプラスミドが構築できたことを確認しました (図 6)。

最後に

In-Fusion™ PCR クローニングでは、ベクターの制限酵素サイトや PCR 産物の末端形状を考慮することなく、任意のベクターの任意の位置に、希望する向きで PCR 産物をクローニング可能です。これまであきらめていたクローニングの問題点が、In-Fusion™ ならクリアできるかもしれません。PrimeSTAR® をうまく組み合わせれば、PCR エラーの心配もありません。

是非、皆さまのクローニングにお役立てください。

本稿でご紹介した製品

製品名	製品コード	容量	価格
【PrimeSTAR® 製品一覧】			
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase	R010A	250 U	¥30,000
	R010B	1,000 U (A × 4)	¥96,000
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase with GC Buffer	R044A	250 U	¥30,000
	R044B	1,000 U (A × 4)	¥96,000
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase	R045A	100 回	¥30,000
PrimeSTAR® HS (Premix)	R040A	100 回	¥22,000
【その他】			
Agarose L03 「TAKARA」	5003	100 g	¥16,000
	5003B	500 g	¥75,000
Wide-Range DNA Ladder (50 ~ 1 0,000 bp)	3415A	100 回	¥18,000
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)	9030	5 g	¥18,000
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside)	9031	1 g	¥25,000

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は 35 ページをご覧ください。①②