

研究用

TaKaRa

**Bacterial 16S rDNA Clone
Library Construction Kit**

説明書

Bacterial 16S rDNA Clone Library Construction Kit は、環境中のバクテリアの群集構造を解析する手法の 1 つである 16S rDNA Clone Library 法を効率良く行うために開発された、タカラバイオ独自のシステムです。環境中のバクテリア由来のゲノム DNA から 16S rDNA の特定領域を PCR で増幅し、高効率にクローニングして、クローンライブラリーを構築できます。

本システムでは、PCR 酵素にクルードサンプルからも良好な PCR が可能な Tks Gflex™ DNA Polymerase を使用しており、ベクターには陽性クローンの選別が不要な Positive Selection タイプの pBackZero-alpha を使用しています。そのため、一般的な手法である PCR 産物の TA クローニングによる 16S rDNA Clone Library 構築に比べ、高効率にライブラリーを作製することができます。

本製品により、 5×10^5 cfu/ μ g 以上のクローニング効率（注）で、blue/white 選択の必要もなく、得られたクローンの 99% 以上が陽性クローンとなります。さらに平滑末端クローニングでありながら、得られたクローンの 99% 以上が同一方向にクローニングされるため、ベクター上の配列に対するプライマーによる同一方向からのシーケンスが可能になり、PCR プライマーの直後の配列も確実に解析できます。

（注）コンピテントセルの効率など実験条件により低下する場合があります。

I. 内容 (20 回分)

1.	Tks Gflex DNA Polymerase* ¹	(1.25 units/ μ l)	40 μ l
2.	2 × Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)* ¹		1 ml
3.	pBackZero-alpha linear vector* ²	(50 ng/ μ l)	20 μ l
4.	16S-FA / 16S-R3 PCR primer Mix* ³	(各 10 pmol/ μ l)	40 μ l
5.	DNA Ligation Kit <Mighty Mix>* ⁴		150 μ l
6.	Sequencing Primer BlaM1	(10 pmol/ μ l)	30 μ l
7.	Sequencing Primer BlaRV	(10 pmol/ μ l)	30 μ l
8.	DNA free H ₂ O		1 ml × 2
9.	Positive Control DNA* ⁵	(1 ng/ μ l)	10 μ l

* 1：Tks Gflex DNA Polymerase（製品コード R060A）に含まれる酵素およびバッファーと同じで、PCR 反応 40 回分である。サンプル増幅 20 反応分および各 10 回の Positive Control 反応、Negative Control 反応を行うことができる。

* 2：クローニングサイトで平滑末端に切断された直鎖状のベクターである。

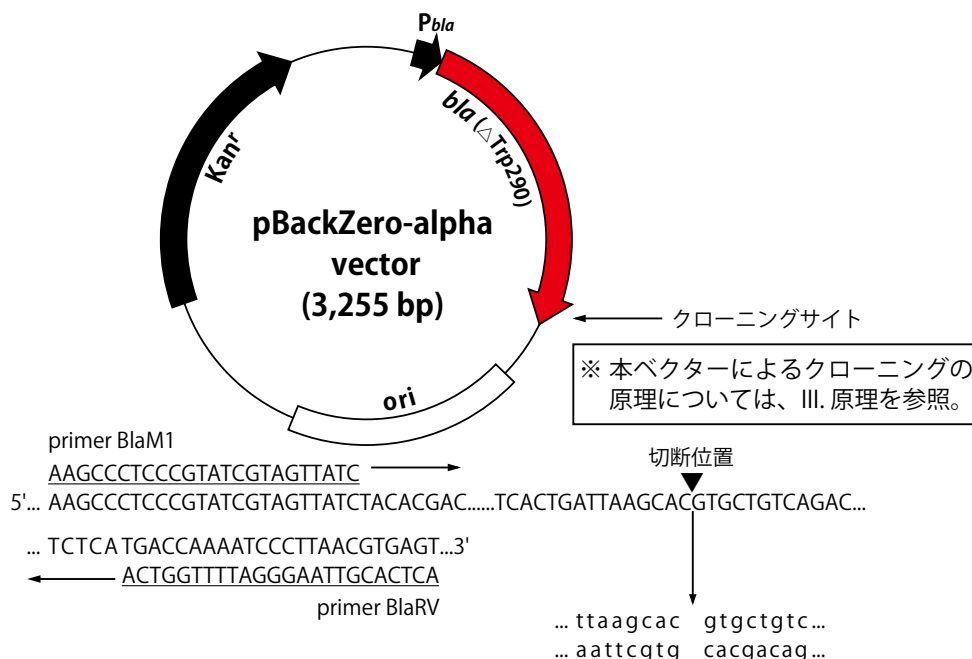


図 1. pBackZero-alpha linear vector のベクターマップ

-
- * 3 : 16S-FA/16-R3 PCR primer は、16S rRNA を増幅するためのユニバーサルプライマーである 27f および 1492r の 5' 末端に配列を付加したものである。配列を付加していないプライマーは本キットでは使用できない。
 - * 4 : DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (製品コード 6023) と同じである。
 - * 5 : 大腸菌 JM109 の Genome DNA の両端に 16S 27f/1492r primer 配列を付加したものをクローニングした Plasmid DNA である。16S-FA/16-R3 PCR primer により、1,068 bp が増幅するように設計されている。10 回の Positive Control 反応を行うことができる。

[各プライマーの配列]

- 16S-FA PCR primer
5'-TTTTAAAGAGTTTGATC (A/C) TGGCTCAG-3'
- 16S-R3 PCR primer
5'-TTAATACGG (C/T) TACCTTGTTACGACTT-3'
- Sequencing Primer BlaM1
5'-AAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATC-3'
- Sequencing Primer BlaRV
5'-ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCA-3'

[キット以外に必要な試薬]

- 環境サンプルからのゲノム DNA 調製試薬 ;
NucleoSpin Soil (製品コード 740780.10/.50/.250) など
- PCR 産物精製試薬 ;
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250) など
- コンピテントセルまたはエレクトロセル
E. coli HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128) など
- SOC 培地
- アンピシリン (100 μ g/ml) を含む LB プレート
- インサートチェック用 PCR 試薬
EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix (製品コード RR320A)
EmeraldAmp PCR Master Mix (製品コード RR300A/B) など
- プラスミド DNA 調製試薬
NucleoSpin Plasmid (製品コード 740588.10/.50/.250) など

II. 保存

－ 20℃

III. 原理

Tks Gflex DNA Polymerase は、*Thermococcus* 属古細菌由来の DNA polymerase をベースに、反応阻害の要因となる酵素の鋳型 DNA に対する非特異的結合を抑制した改良型 PCR 酵素であり、 α 型特有の高い正確性に加えて優れた伸長性を有しています。さらに、タカラバイオ独自の強力な伸長因子と新規開発したプライミング特異性の向上物質を反応系に加えたことにより、幅広い核酸濃度のサンプルに対して、高速で極めて特異的な増幅を実現しました。

その結果、一般的な PCR 酵素では増幅が困難な GC rich、AT rich などの難増幅配列や長鎖のターゲットに対する PCR 増幅の成功率が著しく向上しています。また、反応バッファーに PCR 阻害物質を吸収する成分および増幅を増強する成分を加えたことにより、クールドサンプルからも高効率の PCR が可能です。なお、本酵素は常温下での DNA polymerase 活性および 3'-5' exonuclease 活性を抑えるモノクローナル抗体を用いたホットスタート PCR に対応しています。

pBackZero-alpha vector は、Tks Gflex DNA Polymerase などの α 型 PCR 酵素によって増幅された平滑末端の PCR 産物を効率よくクローニングするためのベクターであり、ベクター上のアンピシリン耐性遺伝子である β -lactamase (*bla*) 遺伝子の 3' 末端の TGG (Trp をコード) を欠失させる独自の改変を行ってクローニングサイトにしています。 β -lactamase は、C 末端の Trp が欠失すると活性が消失するため、本ベクターそのままではアンピシリン耐性となりません。

β -lactamase の活性は、C 末端に Trp (TGG) + Stop コドンという配列を付加することで復活しますが、Trp 以外の芳香族アミノ酸でも活性は復活します。本製品の PCR では 5' 末端に芳香族アミノ酸である Phe (TTT) および Stop コドン (TAA) の 6 塩基を付加したプライマー (16S-FA PCR primer) を使用します。このプライマーで増幅した PCR 産物を本ベクターにクローニングすると、 β -lactamase の活性が復活し、得られたクローンはアンピシリン耐性となります。

そのため、クローンの選別には blue/white 選択の必要はなく、L-Amp plate 上に生えたクローンの 99% 以上が陽性クローンとなります。本キットに付属する Positive Control DNA から、本キットを用いて増幅した PCR 産物をクローニングした場合、1 回の反応で 5×10^5 cfu/ μ g の 16S rDNA Clone Library が作製可能です。

さらに本キットでは、平滑末端クローニングでありながら、方向性を持ったクローニングが可能です。PCR プライマーの片方 (16S-FA) のみの 5' 末端に TTTTAA の 6 塩基を付加していますので、*bla* 遺伝子と同じ方向に 16S rDNA が挿入されたクローンだけがアンピシリン耐性となり、逆方向に挿入されたクローンおよびインサートを持たないクローンはアンピシリン感受性となります。そのため、L-Amp plate 上に得られたクローンの 99% 以上が *bla* 遺伝子と同じ方向に 16S rDNA が挿入されたクローンになります。これは、単離したクローンのシーケンスを行う際に非常に有利です。ベクターの上流側の Sequencing Primer BlaM1 を用いてシーケンスした場合、16S RNA の 27f 側からの配列が確実に得られ、PCR プライマーの直後のシーケンスもきれいに読むことができます。

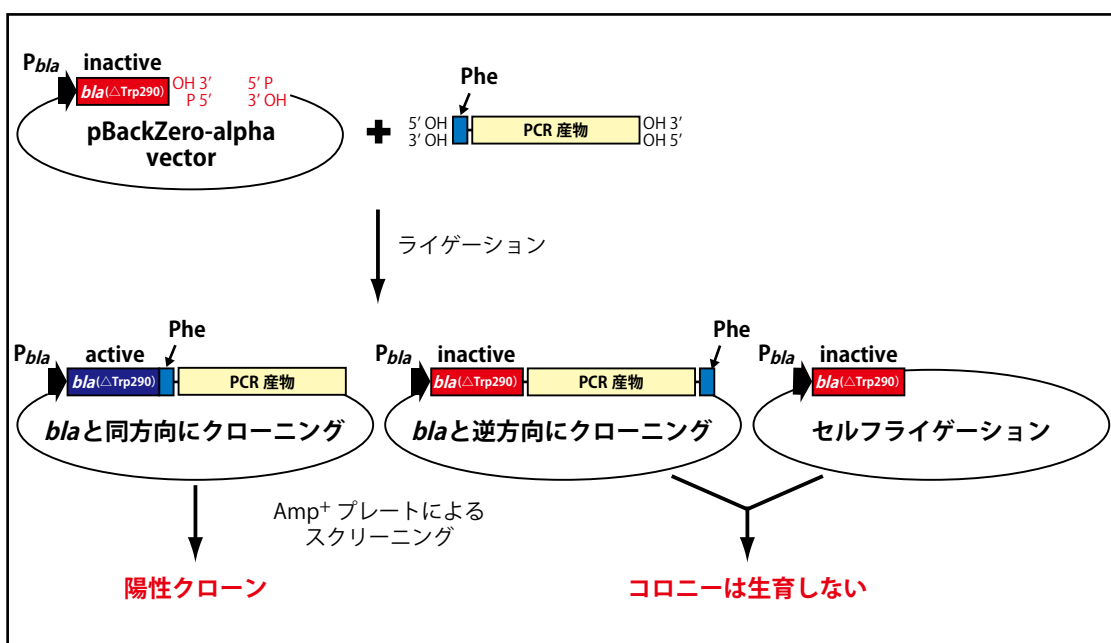


図 2. 本キットを用いたクローニングシステムの原理

IV. 操作方法

[注意事項]

1. 環境サンプル、特に土壌、活性汚泥、堆肥等には PCR を阻害する物質が多く含まれます。そのため、環境サンプルからゲノム DNA を抽出する場合は、適切な試薬、キット等を用いて高純度の DNA を取得してください。土壌などの環境サンプルからの DNA 抽出には、NucleoSpin Soil (製品コード 740780.10/.50/.250) の使用をお勧めします。
2. アンピシリンを添加した LB プレートは、必ず新しいものを使用してください。また、プレートのアンピシリンの濃度は、100 μg/ml にしてください。本製品では、β-lactamase 活性の有無を用いてクローン選別を行うため、アンピシリンの濃度は非常に重要です。

A. 16S rDNA の PCR 増幅

A-1. PCR tube に下記の反応液を調製する。

Reagent	Sample	Positive Control	Negative Control
Template DNA	100 ~ 500 ng ^{*1}	1 μ l	-
2 $\times$ Gflex PCR Buffer	25 μ l	25 μ l	25 μ l
16S-FA/16S-R3 PCR primer Mix (各 10 pmol/ μ l) ^{*2}	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 U/ μ l)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
DNA free dH ₂ O	Up to 50 μ l	22 μ l	23 μ l
Total	50 μ l	50 μ l	50 μ l

* 1 : Template DNA 量は、バクテリアゲノムを鋳型とする一般的な PCR の場合、0.1 ~ 1 ng 程度で十分であるが、クローンライブラリー作製の場合は、キメラクローンの生成を防ぐため Template DNA 量を多くして、サイクル数を減らして PCR を行う。一般的な PCR 酵素の場合は、過剰の Template DNA により PCR 反応が阻害されるが、Tks Gflex DNA Polymerase では良好な増幅が可能である。また、環境サンプルから調製された DNA には、PCR 阻害物質が含まれる場合があるので、反応液に添加する Template DNA 量は非常に重要である。Tks Gflex は、PCR 阻害物質を吸着する成分を含むので、一般的な PCR 酵素に比べて阻害物質に耐性があるが、場合によっては Template DNA 量を減らしたほうが増幅効率が上昇することがある。

* 2 : 本キットで使用する 16S-FA/16S-R3 PCR primer は、16S rDNA を増幅するためのユニバーサルプライマーである 27f および 1492r の 5' 末端に配列を付加したものであり、27f と 1492r で増幅した場合と同様に 16S rDNA 約 1.5 kb を増幅する。

A-2. PCR 反応：下記の条件で PCR を行う。

94°C	1 min.	
↓		
98°C	10 sec.	15 ~ 20 cycles ^{*3}
55°C	15 sec.	
68°C ^{*4}	45 sec.	

* 3 : クローンライブラリー作製の場合、キメラ生成を防ぐため Template DNA 量を多くし、サイクル数を減らして PCR を行う。サイクル数は、25 サイクル以下、特に 15 ~ 20 サイクルが望ましい。この条件においても、増幅効率の高い Tks Gflex DNA Polymerase では良好な増幅が可能である。

* 4 : 3step PCR の場合でも、伸長反応は 68°C で行う。

A-3. 反応液 5 μ l を取り、アガロースゲル電気泳動を行い、約 1.5 kb の増幅を確認する。また、Negative Control が増幅していないことを確認する。電気泳動の結果、16S rDNA の増幅が確認され、非特異的な増幅がない場合は、B-1. PCR 反応液のクリーンアップを行う。非特異的な増幅がある場合は、B-2. アガロースゲルからの精製を行う。

B. PCR 産物の精製

B-1. PCR 反応液のクリーンアップ：

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up を用いてプロトコールに従い PCR 反応液を精製する。

B-2. PCR 産物のアガロースゲルからの精製：

アガロースゲル電気泳動の結果、16S rDNA の増幅以外に非特異的な増幅がある場合、反応液全量をアガロースゲル電気泳動に供して、16S rDNA のバンド (約 1.5 kb) を切り出す。電気泳動 Buffer は、TAE Buffer の使用を推奨する。

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up を用いて、プロトコールに従いゲル片から DNA を精製する。

C. ライゲーションおよび形質転換

C-1. NanoDrop 等を用いて精製後の DNA 溶液の定量、もしくは DNA 溶液の一部 (1 μ l) を用いてアガロースゲル電気泳動を行い、おおよその DNA 濃度を求めておく。

C-2. 以下の反応液を調製する。

pBackZero-alpha linear vector	(50 ng/ μ l)	1 μ l
16S rDNA PCR 産物	(精製済)	100 ~ 200 ng* ¹
DNA Ligation Kit <Mighty Mix>		5 ~ 7.5 μ l* ²
DNA free H ₂ O		Up to 10 ~ 15 μ l* ³

* 1 : [vector : PCR 産物 (重量比)] は、[1 : 2] から [1 : 4] の間を推奨する。過剰の DNA は titer 低下の原因となるので注意する。

* 2 : DNA Ligation Kit <Mighty Mix> の添加量は、トータルの反応液量の 1/2 とする。

* 3 : トータルの反応液量は、10 ~ 15 μ l とする。

C-3. 16°C で 30 分間反応する。

C-4. 高効率のコンピテントセルを用いて、次の通り形質転換を行う。

[*E. coli* HST08 Premium Competent Cells を用いた場合]

- (1) *E. coli* HST08 Premium Competent Cells を使用直前に氷中で融解する。
- (2) 融解したら穏やかに混和して均一にし、100 μ l のコンピテントセルを 14 ml 丸底チューブ (ファルコン・ラウンドチューブ等) に移す (ボルテックスは使用しない)。
- (3) Ligation 反応液を 10 μ l 加える。
- (4) 氷中、30 分間放置する。
- (5) 42°C で 45 秒間インキュベートする。
- (6) 氷中 1 ~ 2 分間放置する。
- (7) あらかじめ 37°C に保温しておいた SOC 培地を 890 μ l 加える。
- (8) 37°C で 1 時間振とうする (160 ~ 225 rpm)。
- (9) プレートに適当量まく。*⁴
- (10) 37°C で一晩放置する。

* 4 : titer は、 1.0×10^8 cfu/ μ g pUC19 DNA 以上の効率のコンピテントセルを使用した場合、通常 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cfu/ μ g DNA となるので、上記の形質転換操作を行った培養液 1 ml (Vector DNA 50 ng に相当) からは、 $2.5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 個のコロニーが得られる。したがって、9 cm プレートの場合、形質転換操作を行った培養液を 1/100 から 1/500 量まくとよい。

D. インサートの確認

本システムで得られたクローンライブラリーは、99% 以上が正しいインサートを持つ。念のため、インサートの有無を確認する場合は、PCR 法で行う。コロニーをピックしたものあるいはコロニーから調製した Plasmid DNA を鋳型として、キット付属の Vector Primer (Sequencing Primer BlaM1 / Sequencing Primer BlaRV) または 16S rDNA を増幅するためのユニバーサルプライマーである 27f および 1492r のペアをプライマーとして PCR を行う。

(注：ユニバーサルプライマー 27f および 1492r は、本製品には含まれていません。)

BlaM1/BlaRV を用いて PCR を行った場合の増幅産物のサイズは約 1.6 kb、27f/1492r を用いて PCR を行った場合は、約 1.5 kb になる。

PCR には、EmeraldAmp PCR Master Mix または EmeraldAmp MAX PCR Master Mix などが利用できる。

E. シーケンス解析

本システムで得られたクローンライブラリーのシーケンス解析を行う場合、一般的な 16S rDNA のユニバーサルプライマーが使用できる。また、本システムで得られたクローンライブラリーは、99% 以上が *bla* 遺伝子と同一の方向性を持ってクローニングされているので、キット付属の Sequencing Primer BlaM1 を使用して、16S rDNA の 27f 側を、Sequencing Primer BlaRV を使用して、16S rDNA の 1492r 側を解析することが可能である。

シーケンス解析には、タカラバイオ受託サービスのシーケンス解析のご利用をお勧めします。

F. 塩基配列情報の解析

得られた塩基配列情報をデータベース上の配列と相同性検索を行い、その結果より細菌の種類を類推する。

(参考情報)

- BLAST 検索は、BLAST アルゴリズムを実装したプログラムをダウンロードして利用することができる。
NCBI : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
- NCBI BLAST や DDBJ のウェブ上でも使用することができる。
NCBI BLAST : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
DDBJ : <http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>

V. 実験例

土壌由来の 16S rDNA Clone Library の構築例

<方法>

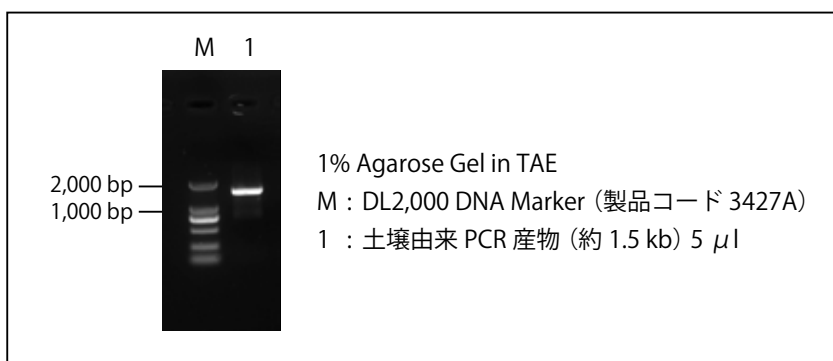
1. 500 mg の土壌から、NucleoSpin Soil を用いて、キットのプロトコールにしたがって、ゲノム DNA を精製した。
2. 得られた土壌由来のゲノム DNA 200 ng を鋳型として、本キットのプロトコールにしたがって、PCR を行った。PCR サイクルは 20 サイクルで行った。PCR 産物を、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up を用いて精製した後、NanoDrop を用いて濃度を測定した。
3. 以下の反応液を調製して、16℃ 30 分 Ligation を行った。

pBackZero-alpha linear Vector	1 μ l
土壌由来 16S rDNA PCR 産物 (100 ng/ μ l)	1 μ l
DNA Ligation Kit <Mighty Mix>	5 μ l
DNA free H ₂ O	Up to 10 μ l

4. 反応液全量 (10 μ l) を用いてコンピテントセル *E. coli* HST08 Premium Competent Cells に形質転換を行った。
5. L-Amp プレート上に得られたコロニー 50 個をピックして、100 μ l/ml のアンピシリンを含む LB 培地で O/N 培養し、NucleoSpin Plasmid を用いて、Plasmid DNA を調製した。
6. Plasmid DNA をキット付属の Vector Primer (Sequencing Primer BlaM1 および Sequencing Primer BlaRV) を用いてシーケンス解析を行った。

<結果>

● 土壌由来 16SrDNA の PCR 増幅結果



● ライブラリーの解析結果

ライブラリーの titer (cfu/ μ g DNA)	1.0×10^6
陽性クローン率	100% (50/50)
クローンの方向性	100% 同一

VI. トラブルシューティング

問題点	対策
PCR 産物が得られない	環境サンプル由来のゲノム DNA には夾雑物として PCR 阻害物質が含まれます。PCR 反応に供するゲノム DNA を減らしても改善されない場合は、DNA を再精製してください。
形質転換効率が低い	a. Ligation の際に、vector : PCR 産物 (重量比) は、1 : 2 から 1 : 4 の間としてください。過剰の DNA は titer 低下の原因となります。 b. <i>E. coli</i> HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128) などの高効率のコンピテントセルを使用してください。 1.0 × 10 ⁸ cfu/μg pUC19 DNA 以上の効率のコンピテントセルの使用を推奨します。
陽性クローン率が低い (no insert のバックグラウンドが多い)	アンピシリンを添加した LB プレートは、必ず新しいものを使用してください。また、プレートのアンピシリンの濃度は、100 μg/ml にしてください。アンピシリンが劣化しているか、濃度が低い場合、バックグラウンドが高くなる可能性があります。

VII. 関連製品

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Touch (製品コード TP350)
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (製品コード NJ200)
NucleoSpin Soil (製品コード 740780.10/.50/.250)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)
E. coli HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)
NucleoSpin Plasmid (製品コード 740588.10/.50/.250)
EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix (製品コード RR320A)
EmeraldAmp® PCR Master Mix (製品コード RR300A/B)

VIII. 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。
- ・EmeraldAmp、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。Tks Gflex 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