

商品名:
FEW^{Blue} TA Cloning Kit (pTAC-1), with DynaCompetent[®] Cells JetGiga DH5 α



商品コード	コンポーネント	容量
DS123		20 reactions
Box 1 (-20 °C)	pTAC-1 Vector, linearized	20 μ l (50 ng/ μ l)
	2 \times Ligation Buffer	100 μ l
	Ligase Mixture	20 μ l
	M13 BDFw Primer	100 μ l (3.2 pmol / μ l)
	M13 BDRw Primer	100 μ l (3.2 pmol / μ l)
Box 2 (-80 °C)	DynaCompetent [®] Cells JetGiga DH5 α	1 ml *赤色チューブ
Bag (RT)	Empty Tubes	20 pcs

保存条件:

Box 1: -20 °C

Box 2: -80 °C*

Bag : 室温

***あらかじめ DynaCompetent[®] Cells JetGiga DH5 α (1 ml)を付属の空のマイクロチューブに50 μ lずつ分注し、ディープフリーザーにて保管してください。分注方法はP.2をご参照ください。**

はじめに

FEW^{Blue} TA Cloning Kit は、PCR 産物と T ベクター間の T-A 塩基対形成に基づいた、PCR クローニングキットです。また、DynaCompetent[®] Cells JetGiga DH5 α は、形質転換操作時間の短縮と、高い形質転換効率を同時に実現します。

ライゲーション操作はPCR産物を、pTAC-1 Vectorと 2 \times Ligation Buffer、そしてLigase mixtureとを混合し、16 °Cで30分インキュベートするだけです。このライゲーション反応液は、直接 DynaCompetent[®] Cells JetGiga DH5 α の形質転換に用いることができます。DynaCompetent[®] Cells JetGiga DH5 α の形質転換はわずか6分で操作が完了します。PCR産物を得てから、大腸菌をプレーティングするまでの一連の操作が、わずか36分で行うことができます。

DynaCompetent[®] Cells JetGiga DH5 α について

・特徴:

- (1)迅速なトランスフォーメーション (6分間)
- (2)高形質転換効率 (> 5 \times 10⁸ cfu/ μ g \cdot 50 μ l cell (pUC19))
- (3)融解後に分注し、再凍結可能 (分注方法についてはP.2をご覧ください)

1回凍結融解を行っても、5 \times 10⁸ cfu/ μ g \cdot 50 μ l cell (pUC19)以上の形質転換効率を保ちます。

・大腸菌株の遺伝子形:

supE44, Δ *lacU169*(ϕ 80/*lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*

DynaCompetent® Cells JetGiga DH5 α の分注

DynaCompetent® Cells JetGiga DH5 α は 1 本あたり 1 ml です。下記の方法に従い、付属の空のマイクロチューブに 50 μl ずつ分注してご使用ください。分注したコンピテントセルはディープフリーザーにて再凍結・保管できます。

● ご用意いただくもの:

- | | | |
|-----------------|----------------------|----------------|
| ・ 付属の空のマイクロチューブ | ・ 滅菌したピペットチップ | ・ 氷水 |
| ・ 温度計 | ・ ディープフリーザー (−80 °C) | ・ 冷凍庫 (−20 °C) |

● DynaCompetent® Cells JetGiga DH5 α の分注方法:

2回以上の凍結融解を行わないでください。
繰り返しの凍結融解は形質転換効率を著しく低下させます。

- 1) 付属の空のマイクロチューブとピペットチップを−20 °C の冷凍庫で冷やしておく。
- 2) 氷水(氷を容器に満たし、その上端まで水を注ぐ)を準備し、氷水が十分に冷えるまで待つ*
 * 0 °C になっていることを温度計で確認してください。
- 3) DynaCompetent® Cells JetGiga DH5 α を氷水中で溶解させる(溶解に必要な時間は 1 ml のコンピテントセルで **15 分程度**)。
- 4) 5 分以内*に、冷やしたチップおよびチューブを用いて 50 μl ずつ分注する。
 * コンピテントセルは融解後、時間経過とともに形質転換効率が低下します。融解後はできるだけ早く分注を行ってください。
- 5) ディープフリーザーで凍結する (−80 °C)。

PCR クローニング操作
1. DNA 増幅反応

TAクローニングを成功させるには、PCR産物の質と量が最も重要です。ポイントを以下に列記します。

- PCR 断片末端への 3′-A 付加効率が、PCR 産物と T ベクターとのライゲーション効率に大きく影響します。ノンブルーフリーディング DNA ポリメラーゼによる PCR 断片末端への 3′-A 付加効率は、PCR プライマーの 5′ 末端が A であるとき、最も高いことが知られています。用いる PCR プライマーの 5′ 末端に、A を付与することをおすすめします。
- PCR 断片末端への 3′-A 付加効率を上げるため、PCR 反応の最後に 70°C、10 分の付加ステップを行うことをおすすめします。
- ブルーフリーディング DNA ポリメラーゼ は、PCR断片末端への3′-A付加効率が低いので、この酵素によるPCR増幅産物を直接クローニングした場合、クローニング効率が低くなってしまいます。「平滑末端を有するPCR産物のクローニング」(P.4)を参照し、PCR断片末端への3′-A付加反応を行うことをおすすめします。
- TAクローニングの前に、アガロースゲル電気泳動にてPCR産物の量および質の確認を行ってください。

- PCR 反応直後のPCR産物は、TAクローニングを阻害する物質を含んでいます。プライマーダイマーや目的外のPCR産物に由来する擬陽性を減らし、クローニング効率を上げるためにも、PCR産物はシリカベースのスピナラムで精製してからTAクローニングに用いることをおすすめします。
- PCRのテンプレートが、アンピシリン耐性遺伝子を含むプラスミドDNAのときは、テンプレート自体が、TAクローニングのバックグランドになる可能性があります。その場合は、PCR反応後、50-100 μ lの反応液に、直接10-20 units の *DpnI* を加え、37 $^{\circ}$ Cで30分インキュベートして、テンプレートを分解することをおすすめします。分解後はシリカベースのスピナラムで精製し、クローニングに用います。

2. ライゲーション反応

1. 氷上にて、以下の 10 μ lライゲーション反応液を調製する。

pTAC-1 vector (50 ng/ μ l)	1 μ l
PCR 産物	X μ l * ¹
2 × Ligation Buffer	5 μ l
Ligase Mixture	1 μ l * ²
滅菌水	variable
全容量	10 μ l

2. 16 $^{\circ}$ Cで 30 分反応。

3. ライゲーション反応液の 5 μ l を *DynaCompetent*[®] Cells JetGiga DH5 α の形質転換に用いる*³。

*¹ ライゲーション反応には、モル量で、pTAC-1 Vector DNA (50 ng, 0.028 pmol)の2-6倍量のPCR断片DNAを用いることをおすすめします。例えば、1,000 bpのPCR断片の場合、36 ng(0.056 pmol) 以上を用いてください。もちろん、本キットは低バックグランドと高いクローニング効率を有することから、それより少ない量でも、充分クローニング可能です(実験例 P.5参照)。また、クローニング前に、PCR産物は吸光度測定のみでなく、ゲル電気泳動にて確認することをおすすめします。目的のPCR断片が、充分量増幅されているか、副反応物が生じていないか確認できます。電気泳動の際は、バンドの染色具合から、DNA量が概算可能な分子量マーカー[例えば、*Dynamarker*[®] DNA Low D(#DM112)あるいは*Dynamarker*[®] DNA High D(#DM122)]の使用をおすすめします。

*² Ligase Mixture は最後に加えてください。

*³ ライゲーション反応液は直接、形質転換に用いることができます。また、形質転換時まで-20 $^{\circ}$ Cにて保存可能です。

3. 形質転換

1. 25 μ lのX-Gal (20 mg/ml)を、アンピシリンプレートに塗布し、充分吸収されるのを待つ*¹。
2. DynaCompetent[®] Cells JetGiga DH5 α を氷上で融解する(50 μ l) *²。
3. 5 μ lのライゲーション反応液を直接コンピテントセルに加え、混和する。
4. 氷上で5分間静置。
5. ウォーターバスで42 $^{\circ}$ C、30秒加熱。この時、液を混ぜたりチューブを振ったりしないでください。
6. 室温のチューブラック上で冷却。
7. コンピテントセルを一部取り、アンピシリンと X-Galを含むプレートへ塗布。
本工程においてコンピテントセルを希釈する場合は、SOC, SOB, LB等を使用してください。
8. 37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベート。

*¹ 青白スクリーニングを行うための X-Gal は、植菌をする 30 分前には塗布して、寒天プレートに充分しみ込ませて下さい。DH5 α を用いる場合は、菌が *lacZ* を欠くことから、IPTG は必要ありません。

*² DynaCompetent Cells JetGiga DH5 α は 1 本あたり 1 ml です。P.2 に記載の方法に従い、50 μ l ずつ分注してご使用ください。

4. クローンの取得

コロニーを、ピックアップし、100 μ g/ml アンピシリンを含む 3-5 ml の LB 培地で一晩培養後、プラスミドを抽出して、制限酵素処理やシーケンスでご確認ください。

また、キット付属のシーケンスプライマーセット、あるいは目的遺伝子の増幅に使用した PCR 用プライマーを用いた、コロニーPCR によっても確認できます。

5. シーケンシング

インサートをシーケンスするために、下記、2 種のシーケンスプライマーが添付されています。

M13 BDFw Primer; 5' - CAGGGTTTTTCCCAGTCACGAC-3'
M13 BDRw Primer; 5' - CGGATAACAATTTTCACACAGG -3'

M13 BDFw Primer は、*EcoRI* サイトの 45 塩基上流に、M13 BDRw Primer は *HindIII* サイトの 26 塩基下流にアニールします。

その他いくつかの情報

1. 平滑末端を有する PCR 産物のクローニング

ブルーフリーディング活性を有するDNAポリメラーゼによって増幅した場合、そのPCR産物は平滑末端が主となります。そのようなPCR産物を、Tベクターにクローニングする場合は、3' 末端に、以下のようにして、Aを付加する必要があります。

1. 平滑末端PCR産物に1 unitの *Taq* DNA polymeraseを添加する*¹。
2. 72 $^{\circ}$ C で10分反応。
3. シリカベースのスピнкаラムにて精製する*²。

*¹ PCR 反応を行ったバッファー中にバッファー交換することなく、そのまま加えて問題ありません。

*² スピнкаラムを用いると、溶出量によってはPCR産物が、希釈されてしまうことがあります。その場合は、エタール沈澱で、濃縮してから、TAクローニングに用いてください。

2. 実験例

種々の量の約 1 kb の PCR 断片を、FEW^{Blue} TA Cloning Kit (pTAC-1)を用いてクローニングした結果を示しています。DynaCompetent[®] Cells JetGiga DH5 α 50 μ l を形質転換し、全量を LB プレートに塗布しました。白いバーは、白色コロニー数を、青いバーは、青色コロニー数を表しています。バックグラウンドが低く、かつ高いクローニング効率を示しています(図 1)。

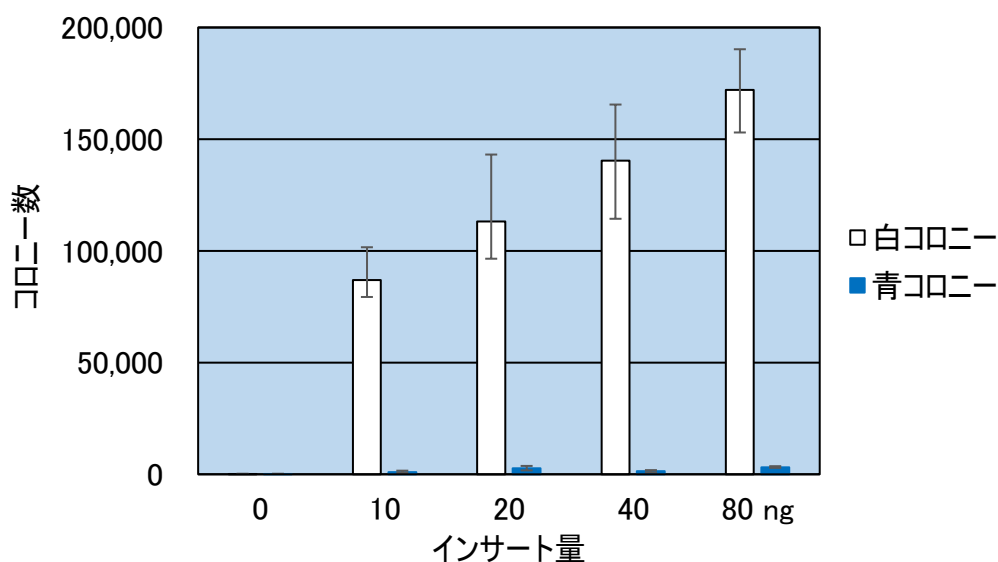


図 1: FEW^{Blue} TA Cloning Kit (pTAC-1)を用いて PCR 断片(1 kb)をクローニングした場合のクローニング効率

また、約 1 kb の PCR 断片を本製品(#DS123; DynaCompetent[®] Cells JetGiga DH5 α 付き)を用いた場合と、旧製品(#DS120; DynaCompetent[®] Cells Jet DH5 α 付き)を用いた場合でのクローニング効率を比較しました。旧製品(#DS120)に比べ、本製品(#DS123)では約 35 倍高いクローニング効率を示しています(図 2)。

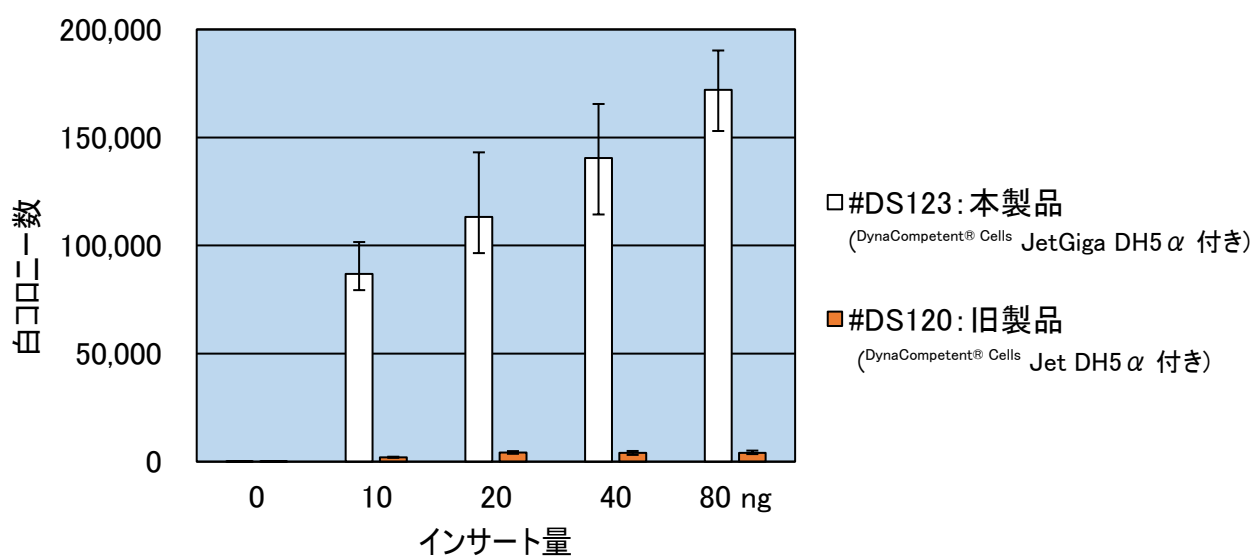


図 2: 本製品 (#DS123、DynaCompetent[®] Cells JetGiga DH5 α 付き)と旧製品 (#DS120、DynaCompetent[®] Cells Jet DH5 α 付き)のクローニング効率の比較

トラブルシューティング

問題	可能性	解決法
わずかか、全くコロニーが形成されない場合	コンピテントセルが、不適切な保管や配送管理によって死滅している可能性があります。	凍結状態のコンピテントセルのチューブをチェックしてください。もし、菌体の沈澱が見られたら、どこかで一度、溶解し、再凍結したことを意味し、すなわち適切な温度管理がなされなかった可能性があります。その場合、著しくコンピテンシーが低下しているはずですが、たとえ菌体の沈澱が見えなくても、-20℃程度で放置した場合、著しくコンピテンシーが低下します。pUC19 などの一般的なプラスミドで、形質転換効率を確認してみてください。
	プレートの抗生物質が異なっている可能性があります。	プレートを確認してください。必要なら、プレートを作り直します。
白色コロニーが少ない	ブルーフリーディング DNA ポリメラーゼを用いて PCR を行った場合。	ブルーフリーディング活性を有する DNA ポリメラーゼを用いて増幅した場合、その PCR 産物は平滑末端が主となるので、TA クローニングには、適していません。3' 末端への A の付加が必要です。「平滑末端を有する PCR 産物のクローニング」を御参照ください。
	充分な量の PCR 断片を、クローニング反応に用いていない可能性があります。	電気泳動が分光光度計にて、PCR 断片の量を計測し、充分量の PCR 断片を TA クローニングに用いてください。しばしば、スピнкаラムによって精製しても、分光光度計では正確な定量ができないことがあります。電気泳動にて検定することをおすすめします。
	PCR 産物中に、ライゲーション反応を阻害する物質が混入している可能性があります。	PCR 産物をシリカベースのスピнкаラムにて精製するか、ゲル電気泳動によるバンドの切り出し精製を行います。
	クローニングされた PCR 断片が大腸菌にとって毒性が高い可能性があります。	プレートを、37℃より低い、30℃あるいは室温にてインキュベートしてみてください。改善される場合があります。
	過剰量のライゲーション反応物を、コンピテントセルに加えた可能性があります。	ライゲーション反応物の量は、ケミカルコンピテントセルの 5%を超えないようにします。
白色コロニーのみである	全てのクローンが、目的のインサートを持っている可能性があります。	(クローニングの成功。)
	X-Gal がアガープレートに塗布されていない可能性があります。	充分な X-Gal が含まれているかチェックしてください。
	PCR のテンプレートとして、アンピシリン耐性遺伝子を有するプラスミドを用い、これが混入してしまった可能性があります。	PCR 反応後、反応溶液に制限酵素 <i>DpnI</i> を加えて、テンプレートプラスミドを分解するか、ゲル電気泳動で目的のバンドとテンプレートを分け、バンドを切り出してください。「DNA 増幅反応」を御参照ください。
	充分量の抗生物質が入っていないか、抗生物質が活性を失った可能性があります。	プレートをチェックしてください。必要なら、新たにプレートを作製しなおします。
主に、ライトブルーあるいは白色だが中央がブルーのコロニーが出る。	<i>lacZ</i> フラグメントが、漏れて発現している可能性があります。	このタイプのコロニーを取り、インサートの有無を確認してみます。インサートを含んでいる場合があります。その場合、完全な白色コロニーがむしろインサートを含んでいない擬陽性であることがありますので御注意ください。
半分のコロニーが白色コロニーで、他の半分がブルーあるいはライトブルーのコロニーである場合。	インサートの方向によって、 <i>lacZ</i> フラグメントが、漏れて発現している可能性があります。	両タイプのコロニーを取り、インサートの有無を確認してください。両方ともインサートを含んでおり、方向のみが異なっている場合があります。そのようなインサートは、SD 配列とインフレームの開始コドンを含んでいる可能性があります。
液体培地で生育しない。	取得したコロニーが、サテライトコロニーである可能性があります。	大きな白色コロニーを取るようになります。また、アンピシリンプレートをチェックしてください。

	コロニーを液体培養に移す前に、長期に保存してしまった場合。	インサートが、大腸菌にとって幾分か毒性があり、長期間の保存で、プレート上で死滅してしまった可能性があります。フレッシュに形質転換したプレートから、コロニーを取得してください。
白色コロニーがインサートを含んでいない	プライマーダイマーあるいは非特異的 PCR 反応産物断片がクローニングされている可能性があります。	電気泳動で、明確な単一の目的のバンドが増幅できるように PCR 反応条件を改良する必要があります。あるいは、目的の PCR 断片のバンドのみを、電気泳動にて切り出し精製して用います。
白色コロニーかつ Amp を含む液体培地で培養可能なのに、プラスミド自体が含まれていない	クローニングされた PCR 断片が大腸菌に対して、幾らかの毒性がある場合。	インサートを含むプラスミドが、液体培地中のアンピシリンが消費されるやいなや、菌体から速やかに脱落していくことがあります。その場合、もっと多くのアンピシリンを加えて培養します。 まれに、十分なアンピシリンがあっても、菌体からプラスミドが消失する場合があります。アンピシリン耐性遺伝子が宿主のクロモソームに、インテグレートされるのかもしれませんが。この場合、プレートや液体培養を、37℃以下の温度、例えば 30℃や室温で行うと良い場合があります。

関連商品:

DS230	DynaCompetent® Cells JetGiga DH5 α ・容量: 100 μl × 10 ・6分間の迅速な操作で高形質転換効率 (>1 × 10 ⁹ cfu/100 μl/tube)のコンピテントセル ・お好みの容量に分注・再凍結して使用可能		
DS210	DynaCompetent® Cells JM109	DM122	DynaMaker® DNA High D
DM112	DynaMaker® DNA Low D		

pTAC-1 ベクターについて

pTAC-1はマルチクローニングサイト、T7プライマー結合部位、*lacZ α* 遺伝子のストップコドンを除いて、pUC19と同一です。

Sequence around cloning Site

M13-BDFw Primer binding site →

TTG GGT AAC GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC
AAC CCA TTG CGG TCC CAA AAG GGT CAG TGC TGC AAC ATT TTG CTG CCG
Q T V G P N E W D R R Q L V V A

T7 Primer binding site →

CAG CGC GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA ATT CGA GCT CGG TAC CCG
GTC GCG CAT TAT GCT GAG TGA TAT CCC GCT TAA GCT CGA GCC ATG GGC
L A Y Y S E S Y P S N S S P V R

XhoI

GGA TCT CGA GGC CAG ATC T [redacted] A ATT GTG GAT CCG CTC
CCT AGA GCT CCG GTC TAG A [redacted] T TAA CAC CTA GGC GAG
S R S A L D N H I R E

BamHI

XbaI SalI PstI PaeI HindIII

TAG AGT CGA CCT GCA GGC ATG CAA GCT TGG CGT AAT CAT GGT CAT AGC
ATC TCA GCT GGA CGT CCG TAC GTT CGA ACC GCA TTA GTA CCA **GTA** TCG
L T S R C A H L S P T I M T M

LacZ α -Peptide ←

TGT TTC CTG TGT GAA ATT GTT ATC CGC TCA CAA
ACA AAG GAC ACA CTT TAA CAA TAG GCG AGT GTT

