

クローニング実験ハンドブック

—保存版—

★ライゲーションの基本から

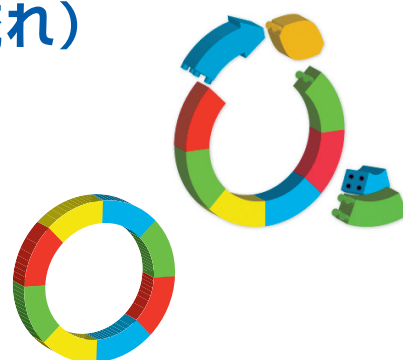
ディレクショナルクローニングまで★

(2021年4月修正版)

目次

クローニング実験(操作の流れ)

- ・ In-Fusionクローニング
- ・ TAクローニング
- ・ 制限酵素／ライゲーション



cDNA合成

核酸精製

アガロースゲル電気泳動



本ハンドブックでは、In-Fusionクローニング法、TAクローニング法および制限酵素／ライゲーション法の解説に加え、クローニングの前後に必要な各種実験操作(DNA精製、cDNA合成、PCRなど)の概要を紹介しています。

クローニングを初めて行う方から経験されている方まで、多くの研究者の皆様に役立つ『クローニング実験ハンドブック』を、どうぞご活用ください。

クローニング方法について

目的のDNA(ターゲット配列)を任意のベクターに組み換える操作をクローニングといいます。ここでは、よく使われるクローニング法のうち、In-Fusionクローニング法、TAクローニング法、制限酵素／ライゲーション法を紹介します。それぞれの特長をおさえて、実験目的に応じた最適な方法を選んでください。(実験操作の詳細は3ページ以降をご覧ください。)

In-Fusionクローニング法

おすすめ

▶ 実験操作の詳細は3ページへ

DNA断片同士の末端15塩基の相同配列を融合させることでクローニングを行います。使用する任意のベクターの末端配列を利用してクローニングを行うため、あらゆるベクターが使用でき、余分な配列が一切付加されず、しかもディレクショナルクローニングを行うことができる優れた手法です。PCRクローニングを行えば、制限酵素も不要です。

- ✓ どんなベクターのどんな位置にもディレクショナルクローニングが可能
- ✓ 短鎖から長鎖 (50 bp~15 kb) まで効率よくクローニングが可能
- ✓ 一挙に複数DNA断片を挿入するマルチクローニングが可能
- ✓ In-Fusion反応はわずか15分で完了

TAクローニング法

▶ 実験操作の詳細は5ページへ

Taq DNAポリメラーゼなどをベースとするPCR酵素を用いて得られた増幅産物のほとんどは、その3'末端にデオキシアデノシン (dA) が一塩基付加されています。

TAクローニングでは、3'末端にデオキシチミジン (dT) を一塩基付加したTベクターを使用し、PCR増幅産物のdA一塩基突出部分と相補的となることを利用して簡便にクローニングを行います。(インサートDNAの5'末端のリン酸化は不要です。)

ライゲーション試薬とTベクターのセット

Mighty TA-cloning Kit

平滑末端を持つPCR産物のTAクローニングに

Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®

※ PrimeSTAR DNA Polymeraseなど α 型DNAポリメラーゼによる増幅産物のほとんどは、酵素自身もつ強力な3'→5' exonuclease活性により平滑末端となっているので、その増幅産物の末端にdAを付加したのちTAクローニングを行います。(PCR酵素の種類と末端形状については6ページをご覧ください。)

鎖長が5 kb以上のPCR産物には
平滑末端クローニングをお勧めします

Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End)

制限酵素／ライゲーション法

▶ 実験操作の詳細は7ページへ

制限酵素でベクタープラスミドとインサートDNAをそれぞれ切断した後、DNAリガーゼやライゲーション試薬を用いて連結させる方法です。遺伝子組換え実験の基本操作として長年利用されています。

ライゲーション効率の高さがクローニングの成功の鍵です。

Ligation MixをDNA溶液と混合するだけでライゲーション反応が可能 (突出末端、平滑末端)。高いライゲーション効率を実現

DNA Ligation Kit <Mighty Mix>

10 kbを超える長鎖DNAのクローニングに

TaKaRa DNA Ligation Kit LONG

クローニング方法別、操作の流れ

In-Fusionクローニング

- PCR増幅
- 増幅確認
- In-Fusion反応
- 形質転換
- 目的クローン取得

1日目

2日目

TAクローニング

- PCR増幅
- 増幅確認
- 増幅産物精製
- ライゲーション
- 形質転換
- 目的クローン取得

1日目

2日目

制限酵素／ライゲーション

- PCR増幅
- 増幅確認
- 増幅産物精製
- 制限酵素消化・精製
- ベクター脱リン酸化
- ライゲーション
- 形質転換
- 目的クローン取得

1日目

2日目

3日目

・ 少ない操作ステップ ・ 実験時間を約1~2日短縮
In-Fusionクローニング法は簡便でスピーディーな手法です！

※上記は標準的な実験操作での比較です。場合により、操作ステップや実験時間は増減する場合があります。

最適なクローニング法を選びましょう

	In-Fusionクローニング	TAクローニング	制限酵素／ライゲーション
成功率の高いクローニングがしたい	◎		
複数断片を一度にクローニングがしたい	◎		
ディレクショナルクローニングがしたい	◎		◎
制限酵素サイトがない、もしくは合わない	◎		
好きなベクターの好きな位置に入れたい	◎		
制限酵素を使わずにクローニングがしたい	◎	◎	
クローニングにかかる時間を短縮したい	◎		
長鎖のインサートを挿入したい			◎
とにかくコスト重視でクローニングがしたい		◎	◎

クローニング関連製品 ガイドブック

逆転写酵素
PrimeScriptシリーズ



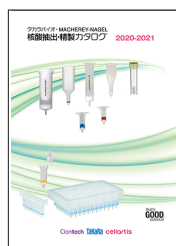
クローニング
コンパクトガイド



In-Fusionクローニング
ガイド



核酸抽出・精製
カタログ



制限酵素ハンドブック



PCR Enzymes Guide



核酸電気泳動
関連製品ガイド

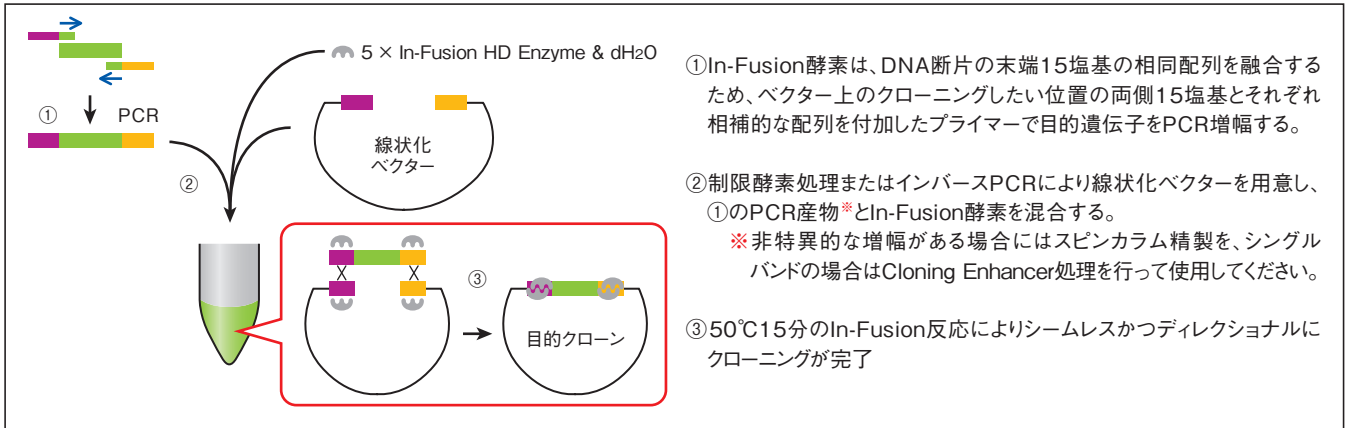


In-Fusion クローニング

ClontechのIn-Fusion酵素を用いてDNA断片同士の末端15塩基の相同配列を融合させることでクローニングを行います。使用する任意のベクターの末端配列を利用してクローニングを行うため、あらゆるベクターが使用でき、余分な配列が一切付加されず、しかもディレクショナルクローニングを行うことができる優れた手法です。

原理と特長

- インサートの種類、クローニング部位、ベクターを選ばずディレクショナルにクローニング
- 短鎖から長鎖 (50 bp~15 kb) まで効率よくクローニング可能
- 1回の反応で、複数DNA断片の同時クローニングも可能
- In-Fusion反応はわずか15分で完了



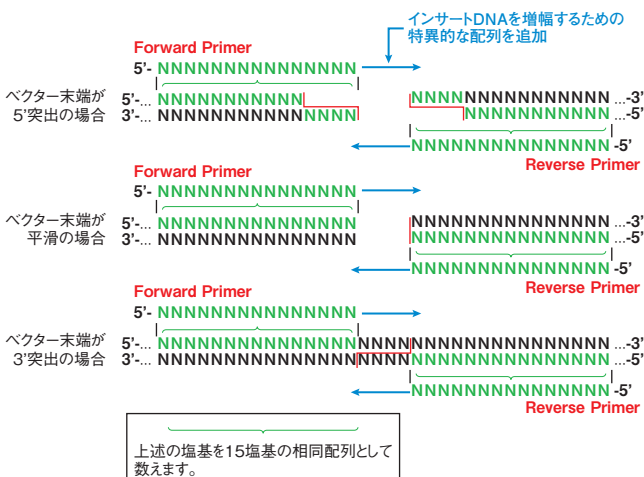
操作方法の概要

(プロトコルの詳細については必ず取扱説明書を確認してください。)

1. 線状化ベクターおよびインサートDNAの調製

- ① 使用するベクターとクローニング部位を決定し、制限酵素処理またはインバースPCRによりベクターを線状化する。
...線状化ベクター溶液 [A]

- ② インサートDNAのPCR増幅のためのIn-Fusion Primerを設計する。



In-Fusion酵素は、各DNA断片の末端15塩基の相同配列を認識してこれを融合させます。このため目的インサートをPCR増幅する場合には、使用する線状化ベクターの末端配列に相同な15塩基を、配列特異的プライマーの5'末端に付加することがポイントです。上図のように線状化ベクターの末端形状に合わせて、In-Fusion Primerを設計してください。なお、In-Fusion Cloning反応は増幅産物のA-overhangの有無による影響を受けないため、PCR増幅産物のA-overhangを考慮する必要はありません。

In-Fusion Primerの設計にはオンラインツールの使用が便利です⇒⇒

- ③ インサートDNAをPCR増幅する。
(PrimeSTAR® Max DNA Polymeraseを用いた場合)

PrimeSTAR Max Premix (2×)	25 μl
Forward Primer	0.2~0.3 μM
Reverse Primer	0.2~0.3 μM
Template	< 200 ng
滅菌精製水	up to 50 μl

98°C 10 sec.
55°C 5 sec. または 15 sec. } 30~35 cycles
72°C 5 sec./kb

! 便利なオンラインツール

In-Fusionクローニング用のプライマー設計ツール、実験例紹介、各種ガイド、学習ツールなど、役立つ情報を多数掲載しています。

https://www.takara-bio.co.jp/research/infusion_primer/



2.アガロースゲル電気泳動でPCR増幅産物を確認

①電気泳動の結果に応じて、以下のようにインサートDNAを処理する。

- 増幅産物に**非特異的な増幅**が認められた場合：
目的バンドのみを切り出し、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-upを用いてスピンカラム精製を行う。
- 増幅産物が**シングルバンド**の場合はCloning Enhancer処理を推奨：

PCR反応液	5 μ l
Cloning Enhancer	2 μ l

37°C 15分→80°C 15分

②インサートDNA溶液 **[B]**とする。

3. In-Fusion Cloning反応

5 × In-Fusion HD Enzyme Premix	2 μ l
線状化ベクター [A]	x μ l
精製済/CE処理済みPCR断片 [B]	y μ l
滅菌精製水	up to 10 μ l

50°C、15分反応→氷上静置

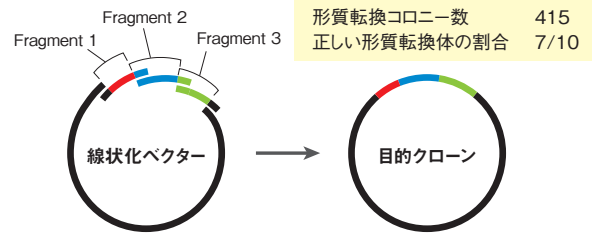
4.大腸菌への形質転換

Stellar™ Competent Cells(製品コード 636763)や*E. coli* HST08 Premium Competent Cells(製品コード 9128)など、形質転換効率が 1×10^8 cfu/ μ gプラスミドDNA以上のコンピテントセルの使用を推奨します。

5.インサートチェックPCR、培養、プラスミド精製

インサートチェックPCRは5ページを、プラスミド精製は10ページを参照

! 複数DNA断片のマルチクローニング



In-Fusion Cloningならマルチクローニングも効率よく行うことができます。各1 kbのDNA断片をIn-Fusion® HD Cloning Kitを用いてクローニングし、コロニーPCRによりインサートを確認したところ、10クローン中7クローンで正しい挿入が確認できました。

【関連製品リスト】 10回包装(EcoDry™タイプは8回包装)

製品名	製品コード	価格(税別)	キット付属品				
			Cloning Enhancer	精製用カラム NucleoSpin	Stellar Competent Cell	CloneAmp HiFi PCR Premix	
In-Fusion® HD Cloning Kit ※	639648	¥23,000	—	—	—	—	
In-Fusion® HD Cloning Kit w/Cloning Enhancer ※	639633	¥25,000	●	—	—	—	すでにタカラバイオの高正確性PCR酵素「PrimeSTARシリーズ」をお使いの方はこちらがおススメです。
終売 In-Fusion® HD Cloning Kit w/NucleoSpin® ※	639639	¥26,000	—	●	—	—	
In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit ※	639689	¥24,000	—	—	—	—	
In-Fusion® HD Cloning Plus ※	638909	¥50,000	—	●	●	●	初めてIn-Fusionキットを使用される方、特にオールインワンキットをご要望の方はこちらをどうぞ!
In-Fusion® HD Cloning Plus CE ※	638916	¥48,000	●	—	●	●	

※プレミックス済み液体タイプのIn-Fusion HDには、上記のほか、50回包装と100回包装があります。

※In-Fusion HD EcoDry Cloning Kitは、凍結乾燥タイプ(室温、デシケーター内保存可能)のIn-Fusion HDキットです。マイクロチューブに分注済みのため直ちに使用することができます。24回タイプ(8連チューブ×3本)、96回タイプ(96ウェルプレート)もあります。



〈In-Fusion® HD添付製品〉

Cloning Enhancer

PCR産物がシングルバンドの場合に増幅産物をそのままIn-Fusion反応に用いるための前処理試薬。この処理により、PCRに使用したプライマーや鋳型プラスミド、dNTPの影響を受けず、In-Fusion酵素が最大のパフォーマンスを示すことができる。

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

PCR産物が複数バンドの場合にゲル精製を行うスピンカラム

Stellar™ Competent Cells

高い形質転換能を持つコンピテントセル。長鎖プラスミドDNAの形質転換においても高い効率を得られ、同様の遺伝子型を持つ他のコンピテントセルと比較してコロニー形成速度が速い。pUC系プラスミドでの形質転換の際には、 β -ガラクトシダーゼの α -相補性を利用し、X-Gal添加による組換え体の青/白選別を行うことができる。

CloneAmp™ HiFi PCR Premix

正確性が極めて高いPCR酵素。In-Fusionクローニングにおいて、インサートDNAの増幅やPCRによるベクターの線状化に最適である。本製品は、In-Fusion® HD Cloning Plusシリーズに添付されている。

TAクローニング

Taq DNA PolymeraseなどのPCR酵素による増幅産物は、その3'末端にデオキシアデノシン(dA)が一塩基付加されています。TAクローニングでは、3'末端にデオキシチミジン(dT)を一塩基付加したTベクターを使用し、PCR増幅産物のdA一塩基突出部分と相補的となることを利用して簡単にクローニングを行います。(インサートDNAの5'末端のリン酸化は不要です。)

操作方法の概要

1. インサートDNAの準備(目的DNA断片の調製)

①PCRによる増幅(TaKaRa Ex Taq®使用の場合)

10 × Ex Taq Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μl
dNTP Mixture (各2.5 mM)	4 μl (各 200 μM)
Forward Primer	0.2~1 μM (final conc.)
Reverse Primer	0.2~1 μM (final conc.)
鋳型DNA	< 500 ng
TaKaRa Ex Taq	1.25 U
滅菌精製水	up to 50 μl
(軽くタッピングして混合)	

98°C 10 sec.	} 30 cycles
55°C 30 sec.	
72°C 1 min./kb	

★PrimeSTAR®などα型のPCR酵素では、3'末端にdAが付加しないので注意が必要(次ページ参照)。

②アガロースゲル電気泳動により、想定される大きさの目的のDNA断片が増幅していることを確認する。

③NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up 等を用いて、PCR反応液から残存するプライマーや塩基を除いてDNAを精製する(10ページを参照)。

④回収した溶液をインサートDNA溶液とする。

★②で目的以外のDNA断片も観察された場合には、アガロースゲルから目的DNA断片のバンドを切り出して、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up 等を用いて精製する必要がある。

2. Tベクターとのライゲーション

Mighty TA-cloning Kit使用の場合

①新しいチューブに以下を用意する。

滅菌精製水	3 μl
pMD20-T Vector	1 μl (50 ng)
PCR産物 (インサートDNA溶液)	1 μl

②Ligation Mighty Mixを5 μl加え、穏やかに混合

③16°Cで30分間インキュベートする。

3. 形質転換

E. coli HST08 Premium Competent Cells使用の場合

①HST08コンピテントセル100 μlを使用直前に氷上で融解して穏やかに混和後、14 ml 丸底チューブに移す(ボルテックス不可)。

②ライゲーション反応後の溶液10 μlを加え、氷中30分間放置

③42°Cで45秒間インキュベート後、氷中1~2分間放置

④あらかじめ37°Cに保温したSOC培地を最終1 mlになるように加える。

⑤37°Cで1時間振とう(160~225 rpm)

⑥LB選択プレート(LB+Amp+X-Gal)に適当量まき、37°Cで一晩静置

⑦青/白判定で白コロニーを候補とする。

★E. coli JM109を使用する場合はアンピシリン、X-Gal、IPTGを含むLBプレートに塗布する。37°Cで一晩培養し、青/白判定で白コロニーを候補とする。

4. インサートチェックPCR

EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix使用の場合

①新しいチューブに以下を用意する。

EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (2×Premix)	25 μl
Forward Primer	0.2 μM (final conc.)
Reverse Primer	0.2 μM (final conc.)
滅菌精製水	up to 50 μl

②プレート上のコロニーをチップの先でごく少量掻き取り、上記のPCR反応液に懸濁して増幅する。

98°C 10 sec.	} 30 cycles
60°C 30 sec.	
72°C 1 min./kb	

③PCR反応液を一部アガロースゲル電気泳動に供し、インサートを確認する。

5. 培養、プラスミド精製

①目的のプラスミドを持つことを確認したコロニーを取り、LB+Amp培地2 mlに加えて一晩振とう培養する。

②NucleoSpin® Plasmid EasyPure 等を用いてプラスミドDNAを精製する。(精製手順は10ページ参照)

★精製したプラスミドDNAの構造を、制限酵素処理・アガロースゲル電気泳動により確認すると良い。

! PCR酵素の種類と末端形状

PCR用DNAポリメラーゼは大きく2つのタイプに分けられます。*Taq* DNA PolymeraseをはじめとするPol I型 (family A) 酵素と、*Pfu* DNA Polymeraseに代表される α 型 (family B) 酵素です。

Pol I型DNAポリメラーゼおよびPol I型をベースとする改良型PCR酵素 (*TaKaRa Ex Taq*®など) の増幅産物のほとんどは、その3'末端にデオキシアデノシン (dA) が一塩基付加されています。これを利用してPCR産物をそのままTAクローニングに使用可能です。

一方、 α 型DNAポリメラーゼによる増幅産物のほとんどは、酵素自身もつ強力な3'→5'exonuclease活性により平滑末端となっており、そのままではTAクローニングに使用できません。平滑末端のPCR産物をTAクローニングに用いる場合には、3'末端にdAを付加する必要があります。

タカラバイオでは、通常のTAクローニング用試薬「Mighty TA-cloning Kit」に加え、 α 型DNAポリメラーゼによる増幅産物専用のTAクローニング

用試薬「Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®」をご用意しています。本キットには平滑末端をもつPCR増幅産物の3'末端にdAを付加するためのA-overhang mixtureが添付されており、簡便な操作でTAクローニングが可能です。

PCR酵素のタイプ	Pol I型 (family A)	α 型 (family B)
増幅産物の3'末端の形状	dAが付加される (TAクローニング可)	平滑末端
酵素名	<i>TaKaRa Ex Taq</i> ® <i>TaKaRa LA Taq</i> ® <i>TaKaRa Taq</i> ™ MightyAmp™ シリーズ EmeraldAmp® MAX SapphireAmp® SpeedSTAR™	PrimeSTAR® シリーズ Tks Gflex™

! Tベクターについて

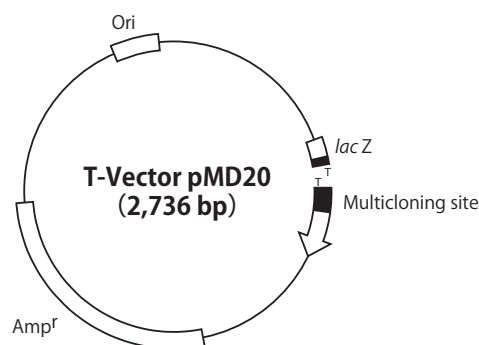
TA-cloning Kitの他にも、2種類のTベクター、T-Vector pMD20およびT-Vector pMD19 (Simple) を販売しています。いずれも形質転換体の青/白選択が可能です。

T-Vector pMD19 (Simple) ではpUC19に由来するマルチクローニングサイト上のすべての制限酵素サイトが除去されているため、クローニング後にインサート部分の制限酵素サイトを利用する場合に便利です。

! 5 kb以上のPCR産物のクローニング

長鎖のPCR産物 (5 kb以上) の場合、TAクローニング効率が低下するため、平滑末端クローニングをお勧めします。末端平滑化およびリン酸化のための簡便な前処理用試薬を含むMighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027) の使用が便利です。

PrimeSTAR®シリーズなど α 型ポリメラーゼで増幅した平滑末端のPCR産物をリン酸化して平滑末端クローニングを行う場合にも、Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) をご利用ください。



【関連製品リスト】

	製品名	容量	製品コード	価格 (税別)
TAクローニングキット およびTベクター	Mighty TA-cloning Kit	20回	6028	¥22,000
	Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®	20回	6019	¥33,000
	T-Vector pMD20	1 μ g	3270	¥10,500
	T-Vector pMD19 (Simple)	1 μ g	3271	¥10,500
平滑末端クローニングキット	Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End)	20回	6027	¥30,000
形質転換用コンピテントセル	<i>E. coli</i> HST08 Premium Competent Cells	1 Set (100 μ l \times 10)	9128	¥23,100
	<i>E. coli</i> JM109 Competent Cells	1 Set (100 μ l \times 10)	9052	¥21,000
	<i>E. coli</i> DH5 α Competent Cells	1 Set (100 μ l \times 10)	9057	¥21,000
インサートチェックPCR	EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix	160回	RR320A	¥7,000
DNAクリーンアップ	NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up ※	10回	740609.10	¥5,300
プラスミド精製	NucleoSpin® Plasmid EasyPure ※	10回	740727.10	¥4,200
電気泳動	Agarose L03 [TAKARA]	100 g	5003	¥18,000
	100 bp DNA Ladder (Dye Plus)	500 μ l (100回)	3422A	¥20,000
	λ -Hind III digest	100 μ g	3403	¥9,000

★各PCR酵素については、タカラバイオウェブサイトでご確認ください。

※マッハライ・ナーゲル社の製品です。

制限酵素／ライゲーションによるクローニング

制限酵素でベクタープラスミドとインサートDNAをそれぞれ切断した後、DNAリガーゼやライゲーション試薬を用いて連結させる方法です。遺伝子組換え実験の基本操作として長年利用されています。

操作方法の概要

1. インサートDNAの準備 (目的のDNA断片の調製)

(a) 制限酵素での切り出し

あらかじめ目的DNA断片の制限酵素切断箇所を確認し、次に使用するベクタープラスミドのクローニングサイトに合わせて、切り出しに使用する制限酵素を選定する。

★Takara Cut-Site Navigator (次ページ) が便利です。

制限酵素Hind IIIとBamH Iでのdouble digestionの例

① 反応液を調製する。

基質DNA	($\leq 1 \mu\text{g}$)
Hind III	1 μl
BamH I	1 μl
10 × K Buffer	2 μl
滅菌精製水	up to 20 μl (軽くタッピングして混合)

② 37°Cで1時間 反応

③ 反応液の半分 (10 μl 程度) にLoading Bufferを加えてアガロースゲル電気泳動を行い、切断を確認する。

④ 目的DNA断片のバンドを含むゲルを切り出す。

★DNAの損傷を抑えるため、UV照射は短時間で行う。

⑤ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up 等を用いて、ゲルからDNAを精製 (ゲル抽出操作手順は10ページを参照)

⑥ インサートDNA溶液 [A] とする。

(b) PCRによる増幅

ベクターとの連結に使用する制限酵素切断部位を5'側に付加^{*}したプライマーを用いて、インサートDNAのPCR増幅を行う。

^{*}制限酵素切断部位 + さらに5'側に3塩基以上を付加

Tks Gflex™ DNA Polymeraseを使用した例

① PCR

2 × Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	25 μl
Forward Primer	0.2 ~ 0.3 μM (final conc.)
Reverse Primer	0.2 ~ 0.3 μM (final conc.)
鋳型DNA	< 500 ng
Tks Gflex DNA Polymerase	1.25 U
滅菌精製水	up to 50 μl (軽くタッピングして混合)

94°C 1 min.	} 30 cycles
98°C 10 sec.	
60°C 15 sec.	
68°C 30 sec./kb	

② PCR産物の精製

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up 等を用いて増幅産物を精製する (10ページを参照)。

③ 制限酵素反応により両端を切断 (必要に応じてスケールアップ)

上記精製済みPCR産物	$\leq 2 \mu\text{l}$
Hind III	1 μl
BamH I	1 μl
10 × K Buffer	2 μl
滅菌精製水	up to 20 μl (軽くタッピングして混合)

④ 37°Cで1時間 反応

⑤ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up 等を用いて、ゲルからDNAを精製 (10ページを参照)

⑥ 回収した溶液をインサートDNA溶液 [A] とする。

2. ベクタープラスミドの準備

① 目的のベクタープラスミド (環状) のクローニングサイトを制限酵素で切断【ベクターの線状化】

ベクタープラスミドDNA ($\leq 1 \mu\text{g}$)	
Hind III	1 μl
BamH I	1 μl
10 × K Buffer	2 μl
滅菌精製水	up to 20 μl (軽くタッピングして混合)

② 37°C、1時間 反応

③ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up 等を用いて、反応液からDNAを精製 (10ページを参照)

④ 回収した溶液をプラスミドDNA溶液 [B] とする。

! 1種類の制限酵素でインサートDNAの調製、ベクタープラスミドの線状化を行う場合は、線状化したベクターのセルフライゲーションを防止するため、下記の脱リン酸化処理を行う。

脱リン酸化処理 (セルフライゲーションの防止)

制限酵素処理済みベクタープラスミド	1~20 pmol
Alkaline Phosphatase (BAP)	0.3~0.6 U
10 × BAP Buffer	5 μl
滅菌精製水	up to 50 μl (軽くタッピングして混合)

37~65°Cで30分間反応

フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) 抽出 (2回)

クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) 抽出 (1回)

エタノール沈殿

TE Buffer (20 μl 以下) に溶解し、プラスミドDNA溶液 [B] とする。

★5'-突出末端の脱リン酸化はCIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) による処理でも十分ですが、平滑末端や3'-突出末端の脱リン酸化にはBAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) の使用を推奨します。

3. インサートDNAと線状化プラスミドのライゲーション

DNA Ligation Kit (Mighty Mix) 使用の場合

インサートDNA溶液 [A]	25~250 fmol
プラスミドDNA溶液 [B]	50 ng (25 fmol)
Ligation Mix	7.5 μ l
滅菌精製水	up to 15 μ l

↓
16°C、30分反応(または25°C、5分反応)

4. 形質転換

E. coli HST08 Premium Competent Cells使用の場合

- ① HST08コンピテントセル100 μ lを使用直前に氷上で融解して穏やかに混和後、14 ml丸底チューブに移す(ボルテックス不可)。
↓
- ② ライゲーション反応後の溶液10 μ lを加え、水中30分間放置
↓
- ③ 42°Cで45秒間インキュベート後、水中1~2分間放置
↓
- ④ あらかじめ37°Cに保温したSOC培地を最終1 mlになるように加える。
↓
- ⑤ 37°Cで1時間振とう(160~225 rpm)
↓
- ⑥ LB選択プレートに適当量まき、37°Cで一晩静置

5. インサートチェックPCR

6. 培養、プラスミド精製

インサートチェックPCRは5ページを、プラスミド精製は10ページを参照

よくある質問

[Q1] ライゲーションが起こりにくく、形質転換効率が悪いときに注意する点は?

[A1]

- ・ライゲーション反応時間を延長してください。
 - ・DNA溶液の塩濃度が高いとライゲーション効率が低下します。特にエタノール沈澱時の酢酸アンモニウム塩は阻害作用を示しますので、エタノール沈澱の際には塩が残らないよう、丁寧に洗浄操作を行ってください。
 - ・DNA抽出キットを使用した場合、抽出液のエタノール沈澱を行いバッファー交換することで、ライゲーション効率が改善することがあります。
 - ・突出末端のライゲーションの場合、DNA溶液(ベクター+インサートDNA)を60~65°Cで2~3分加温後、急冷してからLigation Kitの各試薬を加え反応を行ってください。ライゲーションに有効な突出末端が確保され、形質転換効率が改善されることがあります。
- 以上の操作で改善されない場合はDNAの再精製を推奨します。

[Q2] 長鎖のクローニングで気をつける点は?

[A2] 長鎖になるほどライゲーション効率が低下する傾向があります。TaKaRa DNA Ligation Kit LONG (製品コード 6024) は長鎖DNAのライゲーションに最適化しており、10 kb以上のライゲーションを行う場合に威力を発揮します。

また、インサートDNAを含めたプラスミドの全サイズが大きい場合(特に10 kbを超える場合)は大腸菌への導入効率が低くなり、大腸菌内でのプラスミドの安定性も低下することがあるため、欠失したクローンになる確率が高くなります。大きなサイズのDNAを効率よく形質転換できるE. coli HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128) の使用をお勧めします。

タカラバイオウェブサイト上の制限酵素認識配列検索ツール

Takara Cut-Site Navigator

DNA配列を読み込んで条件を設定すると、切断サイトを一覧や模式図、配列の詳細で表示できます。



【関連製品リスト】

	製品名	容量	製品コード	価格(税別)
制限酵素、 脱リン酸化	Hind III	10,000 U	1060A	¥7,000
	BamH I	10,000 U	1010A	¥7,000
	Alkaline Phosphatase (E. coli C75)	50 U	2120A	¥11,500
	Alkaline Phosphatase (Calf intestine)	1,000 U	2250A	¥11,500
PCR	Tks Gflex™ DNA Polymerase	250 U	R060A	¥32,000
ライゲーション、 形質転換	DNA Ligation Kit (Mighty Mix)	1 Kit	6023	¥27,000
	TaKaRa DNA Ligation Kit LONG	1 Kit	6024	¥27,000
	E. coli HST08 Premium Competent Cells	1 Set (100 μ l \times 10)	9128	¥23,100
	E. coli JM109 Competent Cells	1 Set (100 μ l \times 10)	9052	¥21,000
DNAクリーンアップ	NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up ※	10回	740609.10	¥5,300
プラスミド精製	NucleoSpin® Plasmid EasyPure ※	10回	740727.10	¥4,200
電気泳動	Agarose L03 [TAKARA]	100 g	5003	¥18,000
	100 bp DNA Ladder	500 μ l (100回)	3407A	¥20,000
	λ -Hind III digest	100 μ g	3403	¥9,000

※ マッハライ・ナーゲル社の製品です。

逆転写酵素 & cDNA合成

単離精製されたRNAから、RT-PCRやLibrary作製を行う場合、まず逆転写酵素 (Reverse Transcriptase: RTase) でcDNA化する必要があります。ここでは、PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kitを用いてcDNA合成を行うための一般的なプロトコルを紹介します。

現在、研究用試薬として汎用されている逆転写酵素には、avian myeloblastosis virus (AMV) 由来と、moloney murine leukemia virus (M-MLV) 由来の2種類があります。従来、mRNA高次構造の影響を回避する手段として熱安定性が高いAMV RTaseが使用されてきましたが、近年、M-MLV由来の改良型逆転写酵素 (PrimeScript™ シリーズなど) の性能が向上したため、こちらが主流になりつつあります。

なお、逆転写酵素を用いたcDNA合成では、RNA上に反応開始位置となるプライマーをアニールさせますが、このプライマーには使用目的の違いから、以下の3種類が用いられます。

- オリゴdTプライマー：mRNAのpolyA tailにアニールさせ、3'側からcDNAを合成します。
- ランダムプライマー (通常、6塩基から9塩基程度)：mRNA、rRNA等すべてのRNAからcDNAを合成します。
- 既知の配列特異的なプライマー：特定のcDNAのみを合成します。

操作方法の概要

1st strand cDNA合成

PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit 使用の場合

①マイクロチューブ内に以下の鑄型RNA/Primer混合液を調製する。

Oligo dT Primer (50 μM)	1 μl
(or Random 6mers (50 μM))	1 μl
(or Gene Specific Primer)	2 pmol
dNTP mixture (10 mM each)	1 μl
鑄型RNA	total RNA : ≤5 μg (or polyA RNA : ≤1 μg)
RNase free dH ₂ O	up to 10 μl

②65°Cで5分間保温した後、氷上で急冷する。

③以下の反応液を加え、全量を20 μlにする。

上記鑄型RNA/Primer Mixture	10 μl
5 × PrimeScript II Buffer	4 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0.5 μl
PrimeScript II RTase (200 U/μl)	1 μl
RNase free dH ₂ O	up to 20 μl

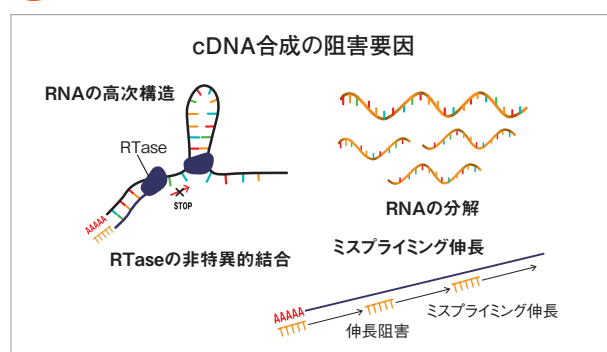
④軽く攪拌する。

⑤以下の条件で反応する。

(30°C 10 min.) ※Random 6mersを用いた場合に必要
42°C 30~60 min.

⑥95°Cで5分間保温した後、氷上で冷却する。

! cDNA合成の阻害要因を克服



cDNA合成を行う際には、RNAの高次構造や分解、RTase自身のRNAへの非特異的な結合、氷上放置による伸長阻害などがしばしば問題となります。

PrimeScript™ II RTaseは、もともと優れた性能を持つ逆転写酵素PrimeScript™と独自のアクセサリタンパク質の添加により、これらの阻害要因を克服しました。

PrimeScript™
RTase

- ☑ 高次構造をとるRNAに強い
- ☑ 42°C反応でRNAのダメージを抑制

+

アクセサリ
タンパク質

- ☑ RTase自身のRNAへの非特異的結合を抑制
- ☑ 氷上放置による伸長阻害を抑制

【関連製品リスト】

	製品名	容量	製品コード	価格 (税別)
最高品質の1st strand cDNAの合成に推奨	PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit	50回	6210A	¥37,000
高正確性PCR酵素と組み合わせたRT-PCRキット	PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit	50回	R023A	¥52,000
	PrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit	50回	R026A	¥52,000

核酸の精製

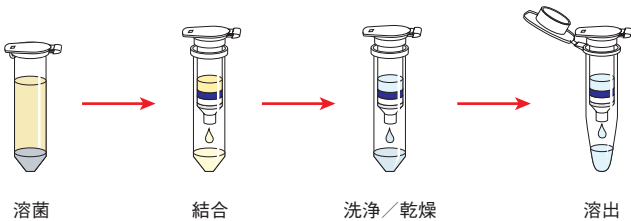
PCR反応後のプライマー除去、アガロースゲルからのDNA回収、プラスミドDNA精製など、クローニングの様々な場面で迅速・簡便かつ高純度に核酸精製を行うためにスピнкаラムタイプの核酸精製キットを使用します。
ここでは、シリカメンブレンスピнкаラムを使用したDNAの精製方法を紹介します。

操作方法の概要

プラスミドDNAの精製

NucleoSpin® Plasmid EasyPure使用の場合

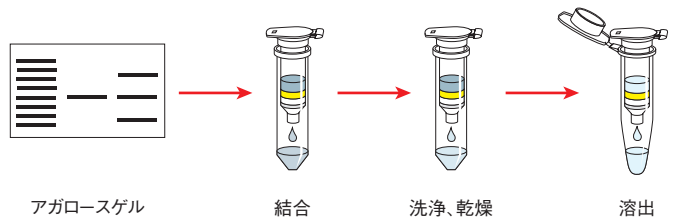
- ①大腸菌培養液(高コピープラスミド: 2~10 ml)を遠心分離(12,000 × g, 30秒)し、上清を捨ててペレットを得る。
- ②A1バッファー(+RNase A) 150 μlを加え、Vortexで菌体を懸濁する。
- ③A2バッファー250 μlを加え、5回ほど転倒混和後、2分静置する。
【溶菌】
- ④A3バッファー350 μlを加え、液体の色が青色から完全に無色になるまで転倒混和する。青色が残っていないことを確認し、遠心分離(12,000 × g, 3分)を行う。
- ⑤上清をNucleoSpin® Plasmid EasyPureカラムに移して遠心(1,000~2,000 × g, 30秒)する。【結合】
- ⑥AQバッファー(+EtOH) 450 μlを加えて、遠心(12,000 × g, 1分)する。【洗浄/乾燥】
- ⑦AEバッファー50 μlをカラムに加えて室温で1分置く。
- ⑧遠心(12,000 × g, 1分)によりプラスミド溶液を回収する。【溶出】



アガロースゲルからDNAを精製

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up使用の場合

- ①ゲル100 mgにNTIバッファー200 μlを加え、50°C 10分インキュベートしてゲルを溶解する。
- ②NucleoSpin®カラムに溶液を移して遠心(11,000 × g, 30秒)する。
【結合】
- ③NT3バッファー(+EtOH) 700 μlを加えて遠心(11,000 × g, 30秒)する。【洗浄】
- ④カラムのメンブレンを乾燥(11,000 × g, 1分)する。
- ⑤NEバッファー(15~30 μl)をカラムに加えて室温で1分静置後、遠心(11,000 × g, 1分)する。【溶出】



★NucleoSpin® Gel and PCR Clean-upは、同じバッファーを用いてPCR産物のクリーンアップにも使用可能です。
PCR反応液100 μl(必要に応じて滅菌精製水を加え100 μlとする)にNTIバッファー200 μlを加えて混合し、上記の②以降のステップを行ってください。

！ チェックポイント

陰イオン交換クロマトグラフィー (NucleoBond®シリーズ)

核酸は、低pH条件下でプラスにチャージしたイオン交換基に結合するが、高pH・高塩濃度条件にするとイオン交換基から解離する。これにより、核酸を高純度に精製することができる。
(→トランスフェクショングレードのプラスミドDNA精製など)

シリカメンブレンスピнкаラム (NucleoSpin®シリーズ)

高濃度のカオトロピック塩を含むBinding Bufferと混合した核酸は、水和水が奪われた状態となりシリカメンブレンに結合するが、低塩濃度のElution Bufferを加えると核酸は再び水和水を獲得し、シリカメンブレンから解離して溶出される。シリカメンブレンの使用により、簡便かつ低コストでDNA精製を行うことができる。

【関連製品リスト】

下記リストの製品は、マッハライ・ナーゲル社の製品です。



	製品名	容量	製品コード	価格(税別)
プラスミドDNAミニプレップ	NucleoSpin® Plasmid	50回	740588.50	¥10,700
		250回	740588.250	¥50,000
	NucleoSpin® Plasmid EasyPure	50回	740727.50	¥10,500
		250回	740727.250	¥36,700
トランスフェクショングレードのプラスミドDNA精製(EFはエンドトキシンフリー)	NucleoBond® Xtra Midi	10回	740410.10	¥14,500
	NucleoBond® Xtra Midi EF	10回	740420.10	¥21,900
PCR産物のクリーンアップとゲル抽出の両方に使用可能	NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	50回	740609.50	¥13,500
		250回	740609.250	¥50,000
細胞・組織などからのtotal RNA精製	NucleoSpin® RNA	50回	740955.50	¥34,500

アガロースゲル電気泳動

クローニング実験において、DNAの検出、定量は欠くことのできない操作です。中でもアガロースゲル電気泳動によるDNA検出は日常的におこなわれる手法です。ここではアガロースゲル作製を中心に紹介します。

操作方法の概要

1. アガロースゲルの作製 (1%ゲル、150 ml作製の場合)

- ①アガロース粉末を1.5 g量り取る。
- ②適切な大きさの容器中*1で、室温または冷却したバッファー*2 150 mlを攪拌しながらアガロース粉末を加える。(容器全体の重量を量って記録しておく。)
- ③ラップで覆った後蒸気抜き穴を開け、電子レンジにセットし加熱する。時々とめて攪拌し、完全に溶解する*3。
- ④加熱終了後電子レンジから出し、静かに攪拌して均一にし泡を取り除く。(必要に応じて再び重量を量り、温めた蒸留水を加えて蒸発した水分を補う。)
- ⑤溶液を室温に置いて50~60℃まで冷却し、コームをセットしたゲルトレイに流し入れる。ピペットチップなどで泡を取り除き、冷やし固める。
- ⑥適量のバッファーを重層後コームを外し、泳動槽に移す。(すぐ 사용하지 ない場合は、バッファーを満たした容器に入れ冷暗所保存する。)

2. 電気泳動サンプルの準備

泳動サンプル溶液に1/10量の10 × Loading Bufferを加えてよく混合する。DNA分子量マーカーも同様に準備する。ゲルのウェルにサンプル溶液をアプライする。

3. 電気泳動

泳動装置(パワーサプライ)のスイッチを入れて電気泳動を開始する。電流の向きに注意する(泳動上流側に陰極、下流側に陽極をセットする)。適度に分離した時点でスイッチを切る。

4. ゲルの染色

泳動後のゲルをエチジウムブロマイド(EtBr)、SYBR® Green Iなどの染色液に浸す。

【関連製品リスト】

	製品名	概要	容量	製品コード	価格(税別)
アガロース各種	Agarose L03 [TAKARA]	1 kb以上の核酸の分離に	100 g	5003	¥18,000
	PrimeGel™ Agarose LE 1-20K GAT	1 kb以上の核酸の分離・回収に(高品質タイプ)	100 g	5801A	¥34,000
	PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve	PCR増幅産物など1 kb以下の核酸の分離に	100 g	5810A	¥48,000
バッファーパウダー	Tris-Acetate-EDTA Buffer(TAE) 50 × Powder, pH8.3	1包を蒸留水に溶解して1 Lの50 × TAEを作製	1包	T9131	¥18,900
	Tris-Borate-EDTA Buffer(TBE) Powder, pH8.3	1包を蒸留水に溶解して1 LのTBEを作製	10包	T9121	¥10,500
分子量マーカー	100 bp DNA Ladder (Dye Plus)	100~1,500 bpの11本のバンド	500 µl(100回)	3422A	¥20,000
	1 kb DNA Ladder (Dye Plus)	1~10 kbの10本のバンド	500 µl(100回)	3426A	¥14,000
電気泳動装置	Mupid®-2plus ※	スタンダードモデル	一式	M-2P	¥40,760
	Mupid®-exU ※	高機能モデル	一式	EXU-1	¥56,950
	Mupid®-One ※	CE(ヨーロッパ電気安全規格)に準拠	一式	O1-01	¥62,000

※ミュールビッド社の製品です。

In-Fusion Cloning Products : This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 7,575,860 and its foreign counterpart patent claims.

その他のライセンス(最新のライセンス情報)に関しては弊社ウェブサイトにてご確認ください。

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用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。

・本パンフレット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。

・本パンフレット記載の価格は2021年4月8日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

タカラバイオ株式会社

首都圏支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

テクニカルサポートライン

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website <https://www.takara-bio.co.jp>

Facebook <https://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店