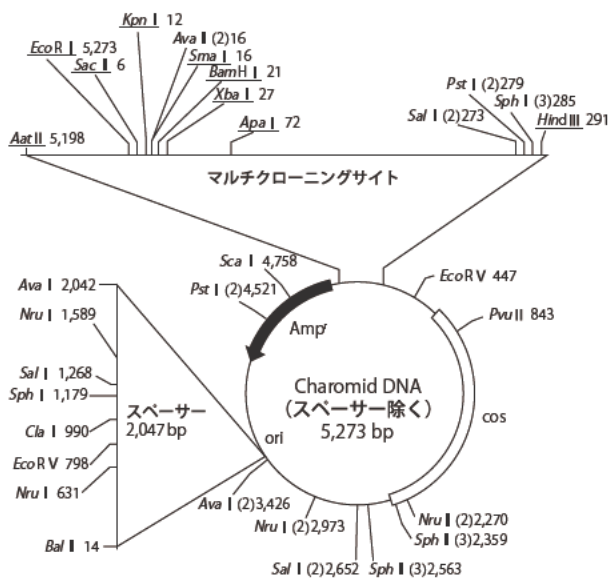


Charomid Cloning (Charomid Cloning Kit)

1. Charomid ベクターの特長

9種類のクローン化部位

λ 系のファージベクターは、ファージ自身の生活環に必須な領域に切断部位を持つ *Kpn* I, *Apa* I, *Sma* I などの制限酵素をクローン化に用いることはできない。しかし、Charomidベクターは、pUC18由来のマルチクローニングサイト (*Apa* I 部位はSV40由来) が導入されており、*Kpn* I, *Apa* I, *Sma* I を含む9種類のクローン化部位を利用できるので有効なベクターである。



マルチクローニングサイト : 5,198-291
 cos (cos 領域) : 642-2,380
 スペース : 3,431 の後ろにスペースが入る
 Amp^r (アンピシリン耐性遺伝子) : 5,067-4,207 (complementary)
 ori (DNA複製開始領域)
 クローン化可能な制限酵素部位は下線で示した。

パッケージングによる高いクローン化効率

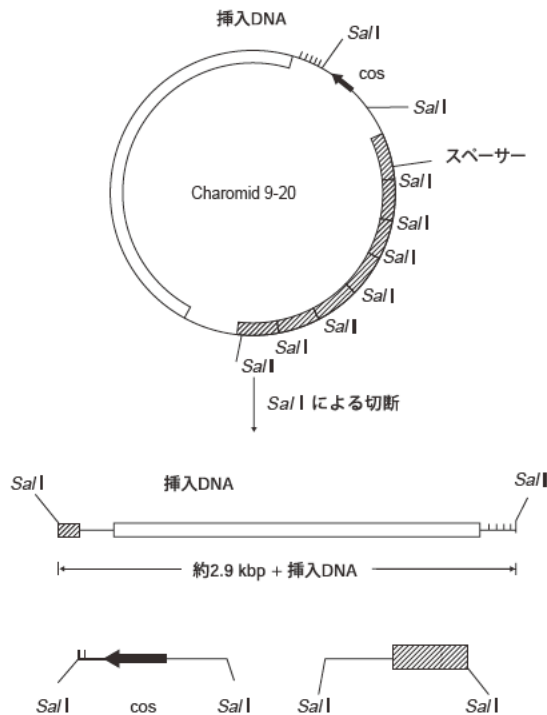
Charomidベクターは通常の *in vitro* パッケージングで、1 μ g (挿入DNA分子 : CharomidベクターDNA分子=1:1) 当たり約 $\sim 1 \times 10^6$ 個の組換え体が得られる。ところでCharomid 9-28, 9-36は、ベクター単独ではパッケージングサイズに満たない。例えば9-28は10kbp以上、9-36は2kbp以上のDNA断片が挿入されない限りパッケージングされない。従って制限酵素で開環した後の脱リン酸化処理を特に必要としない。

しかし、9-20はベクターのみが二量体の状態でパッケージングされ、9-42はベクターのみ単独でパッケージングされるので脱リン酸化処理が不可欠である。

容易なスペース除去

ファージベクターにクローン化した後に、クローン化されたDNA断片の制限酵素地図の作製や塩基配列決定のために、プラスミドベクターへのサブクローニングが必要になる場合がある。Charomidベクターの場合にはスペース除去を行えば、ベクター部分が約2.9kbp (*Sal* I を用いた場合) に縮小されるので特にサブクローニング用プラスミドを必要としない。

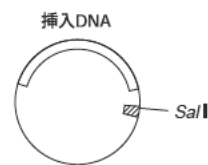
※ マルチクローニングサイト内の *Hind* III 部位は、*Sal* I より下流に存在するので挿入DNAを *Hind* III 部位にクローン化するには、スペース除去に用いる制限酵素を *Nru* I とする。 *Nru* I を用いると、ベクター部分は約5.3kbpに縮小される。



×6
 スペース

アガロースゲル電気泳動による約2.9kbp+挿入DNA断片の切り出しと抽出 (この操作を省略しても得られるコロニーの大半が組換えCharomidのコロニーである)

T4 DNA Ligaseによる約2.9kbp+挿入DNA断片の環状化



2. Charomid 9-36 を用いたクローン化の例

1) 組換え体の調製

- ① クローン化する DNA を切断し、目的の大きさの DNA 断片を T4 DNA Ligase の反応が可能ないように精製する。
- ② ① Charomid 9-36 DNA 2 μ g を取り、10 \times 制限酵素反応バッファー 5 μ l を加え、H₂Oを加えて反応容量を50 μ l にする。
- ③ 制限酵素 2unitsを加え、チップの先で穏やかによく混合し、37 $^{\circ}$ C で1時間反応後氷上または-20 $^{\circ}$ C に置く。
- ④ 1 μ l (40ng相当) を取り、制限酵素処理をしていない DNA と並べてアガロースゲル電気泳動を行い、切断状

況を確認する。(150V以上の高電圧で1~2時間泳動すると、線状DNAは閉環状DNAより速く泳動されるので区別できる。)大部分が切断されていればよく、完全切断する必要はない。むしろ、長時間切断を行った場合に生じるスター活性によって、目的以外のベクター断片がクローン化され、コロニーを形成することがあるので注意する。

⑥ 最終濃度100mmol/l NaCl, 15mmol/l EDTAになるようにNaCl, EDTAを加えて混合し、70°C、10分間で制限酵素を失活させる。(−20°Cで保存可)

③ ①のDNA断片0.1~0.5μgを②のCharomid DNAの半量(1μg)または全量(2μg)と混合し、エタノール沈殿^{注1)}を行う。上清を除いた後、残存するエタノールをキムワイブの先で丁寧に除き、ただちに5μlの2倍希釈TEバッファー(5mmol/l Tris-HCl, pH8.0, 0.5mmol/l EDTA)を加え、氷上で約15分間放置し、DNAを溶解させる。^{注2)}

④ 10×T4 DNA Ligase Bufferを約0.7μl, T4 DNA Ligase 約0.7μlを加えてチップの先で穏やかによく混合し、16°Cにて一晩反応させる。^{注3)}

2) テストパッケージング

In vitro Packaging Kit LAMBDA INN (Code No. 317-01741)を用いて、1)で調製したligated DNAをパッケージングする。

① Packaging Extract^{注4)}を−80°Cのフリーザーから氷中へ移し、速やかに融解する。

② 1)-④で調製したDNAを1μl^{注5)}加える。

③ 室温(約22°C)にて1~2時間放置する。

④ ③に、Phage Buffer^{注6)}を500μl加える。^{注7)}

3) 大腸菌への導入^{注8)}

ここではDH1へ導入する。

① 大腸菌の調製

a) DH1の単一コロニーから2mlのLB-broth(20%マルトースを70μl含む)に植菌し、37°Cにて一晩培養する。

b) 菌液1mlを1.5mlのチューブに取り、15秒間遠心分離して集菌し、上清を残さぬように取り除いた後、0.5mlの10mmol/l MgCl₂(またはMgSO₄)に懸濁する。

② 2)-④の1/5量(100μl)と3)-①-⑥の菌液100μlを1.5mlチューブで混合し、室温(約22°C)にて15分間放置し、組換えCharomidを菌に感染させる。

③ ②にLB-broth(アンピシリンを加えていないもの)を1ml加え、37°Cで30分間放置する。

④ 3枚のアンピシリンプレート(50~100μg/ml)に以下のように撒く。

a) ③の1/200(6μl)……プレートA

b) ③の1/20(60μl)……プレートB

c) ③の1/2(600μl)を、15秒間遠心分離して集菌し、上清を50μl程度残して懸濁し、プレートに撒く…プレートC

d) ③の残り(約530μl)……培養用チューブに移し、5mlのアンピシリン添加LB-broth(50~100μg/ml)を加える。

⑤ a)~d)を37°Cで一晩培養する。

大腸菌への導入状態を以下のように判断し、スクリーニングの方針を決定する。

⑥ プレートA、B、Cにそれぞれ10²、10³、10⁴個のコロニーが生じたとすると、3)-②で使ったテストパッケージングの残り(400μl)には、8×10⁴個のコロニーが、また2)-②注5)で保存した6μlのligated DNAからは、6×10³個のコロニーを得ることができる。

⑦ 以下のようにしてインサートを持つ組換え体の割合を算出

する。

3)-④-⑥で増殖させた菌液は、プレートCに出たコロニーとほぼ同数の組換え体を持つ菌のプールである。菌液1.5mlから通常のミニプレップ法により、プラスミドDNAを抽出する(Plasmid Mini Prep Kit, Code No. 311-01521 p.253参照)。このDNAの1/5量をクローン化に用いた制限酵素で切断し、その1/2量、1/4量、1/8量、1/16量、1/32量を100Vで2時間程度アガロースゲル電気泳動する。注1)の例では、9kbpのインサートと、高分子のベクターのバンド(36kbpおよびリアレンジした40~50kbpのインサートを持たないCharomidが切断されたもの)が見られる。例えばコロニーの100%が9kbpのインサートと36kbpのCharomidの組換え体という理想的な場合には、9kbpのバンドとベクターの濃さの比は長さ按比例して1:4となり、上記1/2量のレーンの9kbpのバンドの濃さがほぼ1/8量のレーンのベクターのバンドの濃さに等しくなる。しかし、例えばコロニーの50%が9kbpのインサートを持つ組換え体で、残りが平均長45kbpのインサートを持たないリアレンジしたCharomidである時は、9kbpのバンドとベクターのバンドの濃度比は、9:36+45=1:9となり、上記1/2量のレーンの9kbpのバンドの濃さは、1/16量のレーンのベクターのバンドの濃さよりもやや薄くなる。

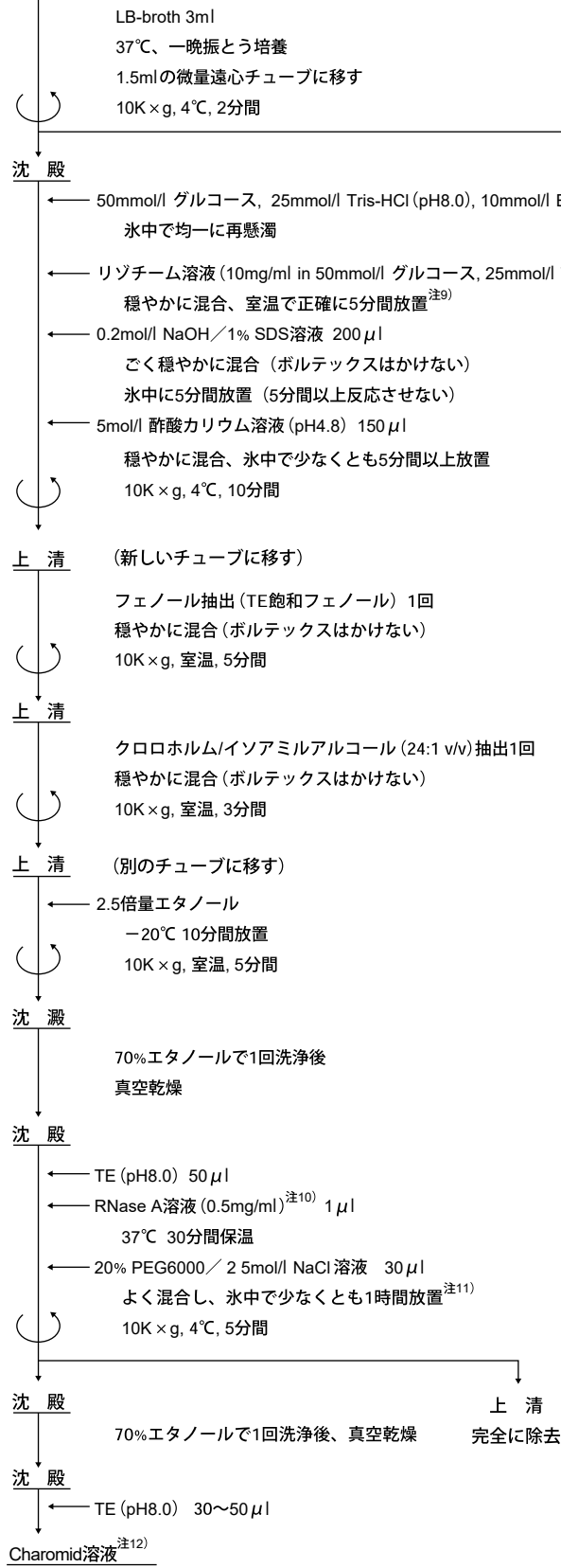
⑧ スクリーニングに必要なコロニー数を算出する。例えば、動物細胞ゲノム(haploid当たり3×10⁶kbp)のシングルコピー遺伝子をクローニングしている場合、細胞DNAを制限酵素切断、アガロースゲル電気泳動後、約9kbpのDNAをゲルから切り出して精製することにより約10倍濃縮されるとすれば、目的のクローンはインサート3.3×10⁴個(インサートの長さの合計が3×10⁶kbp)に1個の割合で得られる。インサートを持つCharomidが全体の70%の時、平均4個の目的のクローンを得る(この場合運悪くクローンが、1個も含まれない可能性は2%以下)には、3.3×10⁴×100/70×4=1.9×10⁶個のコロニーをスクリーニングすればよい。3)-⑥の場合には残った6μlのligated DNAを全部用いると、平均して12個のシングルコピーDNA断片が得られること、実際的にこの2μlをパッケージングして得られる2×10⁴個のコロニーをスクリーニングすればよいことがわかる。

4) スクリーニング

コロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニングに関しては、Sambrook, J. et al.: "Molecular Cloning", A Laboratory Manual, 2nd ed., 1.90 (1989); Screening by Hybridization 参照

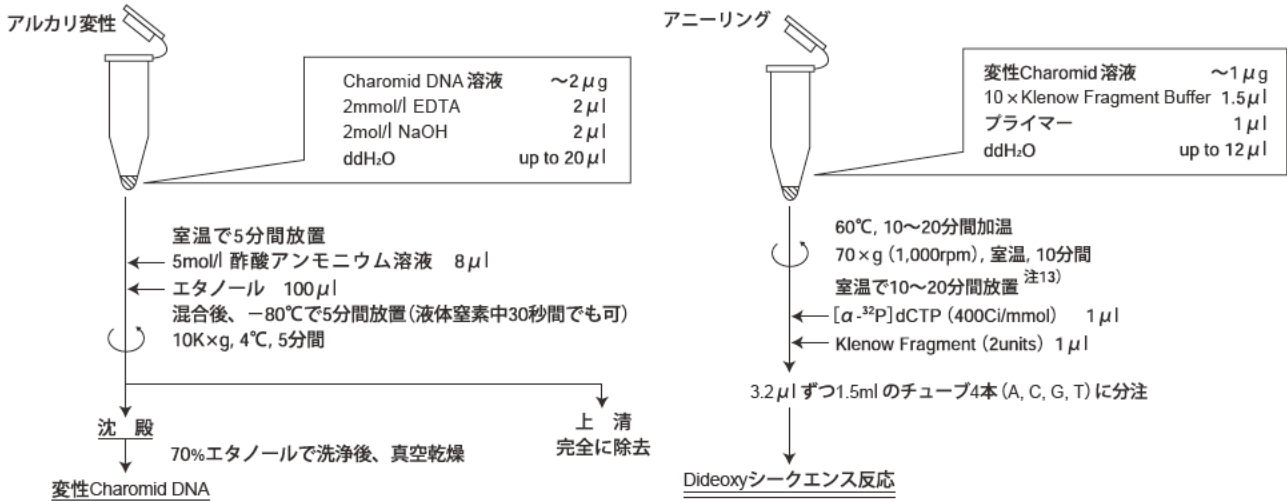
プロトコール1 DNAの調製

組換え体コロニー



- 注1) 例えば、9kbpのDNA断片0.25 μgにCharomid 9-36切断DNA 1 μgならばモル比で1:1になり、2~5×10⁶個の組換え体が予想される。これは泳動ゲルから切り出して精製したDNAの場合、シングルコピー遺伝子をクローン化するのに十分である。Charomid 1 μg当たり約1×10⁶個のインサートを持たないが、リアレンジして大きくなったCharomidが生じる。従って、ベクターを2 μg使うと、インサートを持った組換え体の総数も何割かは増えるが、インサートを持たないものは2倍になってしまう。(注3)参照)。またインサートが過剰になると、インサートが複数組み込まれ、その長さの合計がクローン化可能な長さを越え、パッケージングされないので出現するコロニーが減ってしまうことに注意する。
- 注2) Charomid DNAは大きいので、エタノール沈殿によるペレットを乾燥させるとほとんど溶解させることができなくなる。また初めからT4 DNA Ligase バッファーの入った液に溶解することはできない。
- 注3) 反応容量は極力小さく、高いDNA濃度で、ライゲーションを行う。この結果生じる、インサートとCharomid DNAが直鎖状に多数連結した巨大分子が、パッケージングの最もよい基質となる。DNA濃度が低いと分子は環状化してしまい、パッケージング効率は1/100以下に低下する。従ってインサートのDNA断片の量が少量しか得られない場合でも、インサートとCharomid DNAの比にこだわることなくCharomid DNAは1 μgを用い、それ以下にしない。
- 注4) *In vitro* Packaging Kit LAMBDA INN (Code No. 317-01741)は1チューブのpackaging extractである。
- 注5) ライゲーションの結果、巨大分子が効率よく生成していると、DNA液はかなり粘稠になり、1 μlを分取しにくいことがあるので注意する。ただし、粘稠にならなくとも失敗とは限らない。また、このときT4 DNA Ligaseを失活させる必要はない。残ったDNA液6 μlは、-20°Cに保存する。
- 注6) Phage Buffer
- | | |
|---------------------------------------|-------|
| NaCl | 2.9g |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 1g |
| 1mol/l Tris-HCl (pH7.5) | 25ml |
| 2% Gelatin | 2.5ml |
- 以上をH₂Oにて500mlとし、オートクレーブをかけ4°Cに保存する。
- 注7) 4°Cに保存可能である。一週間以上の保存には、クロロホルムを3 μl加える。titerは、3か月ごとに1/5になるので、長期間保存する場合は注5)のligated DNAの方が安全である。
- 注8) Charomidベクターは、比較的サイズの大きいベクターであり同一配列のスペーサーを複数持っているので*in vivo*でのrecombinationやディレクション現象を避けるために*recA*を欠失しており、さらにスペーサー部分に*EcoK*の切断部位が存在するので*EcoK*の制限系を欠失した大腸菌を宿主として用いる (例えばDH1、DH5)。なお、Charomidベクターは*EcoK*のメチラーゼを持つ大腸菌 (DH1) を宿主として調製してある。
- 注9) サンプル数が多いときには、氷中で約30分間放置した後、室温に戻す。
- 注10) RNase A 溶液 (10mg/ml in 10mmol/l Tris-HCl, pH7.5, 15mmol/l NaCl) は、熱処理 (100°C, 15分間) したものをストックとし、これを希釈して用いる。使用時の濃度は、10 μg/mlがよく、あまり高くするとプラスミドDNAにニックが入ることがある。
- 注11) ここでエタノール沈殿も可能だが、PEG沈殿の方がRNAの混入がほとんどなく、オートラジオグラフィーの時のバックグラウンドが低くなる。
- 注12) この方法で5~10 μgのプラスミドDNAが得られる。1 μg DNA (~0.5pmol) はds (double strand) DNA3.3kbpに相当する。

プロトコール2 アルカリ変性とアニーリング



注13) 少なくとも10分間は放置する。1時間放置しても泳動パターンには影響しない。

トラブルシューティング

トラブル	予想される原因	対策
大腸菌の形質転換効率が低い	ライゲーションが不十分	目的DNA断片がライゲーション可能かどうかをあらかじめ確認して下さい。
	DNA断片の長さが不適當	あらかじめDNA断片の長さをゲル電気泳動で確認して下さい。
	導入大腸菌がEcoKの制限系を持っている	DH1やDH5のようにEcoKの制限系を持たない宿主を用いて下さい。
インサートがない	Charomid 9-20の二量体または9-42がパッケージングされている	Charomid 9-20または9-42を使用する場合は制限酵素処理後必ず脱りん酸を行って下さい。

文献

- 1) Saito, I. and Stark, G. R. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8664 (1986)
- 2) Giulotto, E, Saito, I. and Stark, G. R. : *EMBO J.*, 5, 2115 (1986)
- 3) 齋藤 泉 : *実験医学*, 6(4), 356 (1988)
- 4) Sambrook, J. et al. : *"Molecular Cloning"*, A Laboratory Manual, 2nd ed., 3, 25 (1989)

関連製品

In vitro Packaging Kit LAMBDA INN (Code No. 317-01741)
 p.143参照