商品名: FEW^{Blue} TA Cloning Kit (pTAC-1)

(旧製品名 TA PCR Cloning Kit (pTAC-1))

商品コード	商品名	容量
DS125	FEW^{Blue} TA Cloning Kit (pTAC-1)	20 reactions
	pTAC-1 Vector, linearized	20 µl (50 ng/µl)
	2 × Ligation Buffer	100 µl
	Ligase Mixture	20 µl
	M13 BDFw Primer	100 µl (3.2 pmol /µl)
	M13 BDRev Primer	100 µl (3.2 pmol /µl)
	Sterile Water	1000 µl

保存条件: −20 ℃

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。ライゲーション操作は PCR 産物を、pTAC-1 Vector と 2 × Ligation Buffer、そして Ligase mixture とを混合し、16 ℃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、直接ケミカルコンピテントセルの形質転換に用いることができます。

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。ノンプ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 ℃、10 分の付加ステップを行うことをおすすめします。
- プ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.3)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ンカ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。

株式会社バイオダイナミクス研究所
www.biodynamics.co.jp

- 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 µlの反応液に、直接10-20 units の*Dpn*I を加え、37℃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ンカラムで精製し、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 10µlライゲーション反応液を調製する。

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

2. 16 ℃で 30 分反応。
3. ライゲーション反応液 5 µlをそのままケミカルコンピテントセル 50 µl 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.4参照）。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、直接ケミカルコンピテントセルの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 ℃にて保存可能です。

3. 形質転換

形質転換手順はご使用のケミカルコンピテントセルの説明書に従って行ってください。

ご使用されるコンピテントセルは、6 分間の迅速操作で高形質転換効率 (>1×10^9 cfu/100 µl/tube)*なコンピテントセルである DynaCompetent® Cells JetGiga DH5α (#DS230)をおすすめします。DynaCompetent® Cells JetGiga DH5α を用いた場合、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 分で行えます。

＊1 回の形質転換に使用するコンピテントセル量は 50 µl となりますので、形質転換効率は>5×10^8 cfu/50 µl/tube となります。

4. クローンの取得

コロニーを、ピックアップし、100 μg/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クエンスでご確認ください。

また、キット付属のシークエ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. シークエンシング

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

M13 BDFw Primer; 5'- CAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'
M13 BDRev Primer; 5'- CGGATAACAATTTCACACAGG -3'

M13 BDFw Primer は、*Eco*RI サイトの 45 塩基上流に、M13 BDRev Primer は *Hin*dIII 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

プ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。

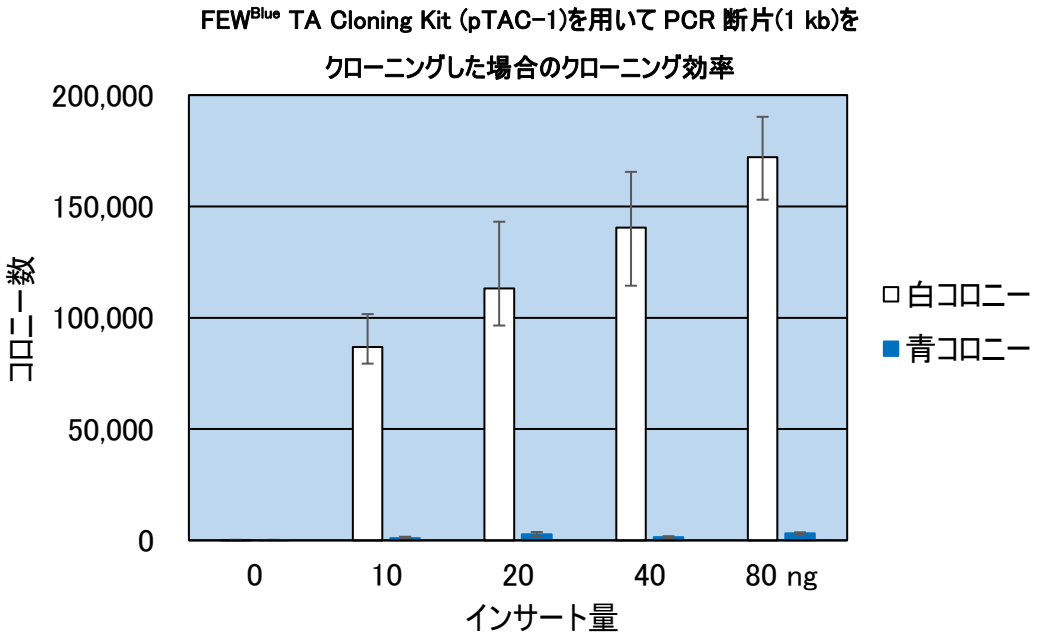
1. 平滑末端PCR産物に1 unitの *Taq* DNA polymeraseを添加する*[1]。
2. 72 °C で10分反応。
3. シリカベースのスピンカラムにて精製する*[2]。

*[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] スピンカラムを用いると、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、エタノール沈澱で、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 を用いてクローニングした結果を示しています。ライゲーション反応液 5 µlを用いて、$^{DynaCompetent®\ Cells}$ JetGiga DH5α(#DS230) 50 µl 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ます。バックグランドが低く、かつ高いクローニング効率を示しています(下図)。



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	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	プ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。	プ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。	電気泳動か分光光度計にて、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、スピンカ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ンカラにて精製するか、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 *DpnI* 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。	*lacZ* 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、*lacZ* 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します。 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の毒性があり、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、充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。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 DH5α ・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		

株式会社バイオダイナミクス研究所
www.biodynamics.co.jp

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、*lacZα* 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
```

EcoRI　KpnI　SmaI

T7 Primer binding site　SacI

```
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　BamHI

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

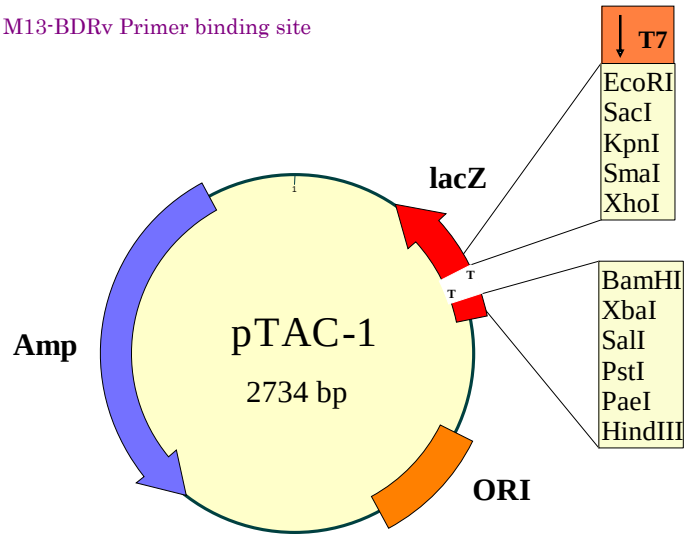
XbaI　SalI　PstI　PaeI　HindIII

```
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
```

LacZα-Peptide

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

M13-BDRv Primer binding site



株式会社バイオダイナミクス研究所
www.biodynamics.co.jp