

QIAGEN® PCR Cloning

プロトコールとトラブルシューティング

QIAGEN PCR Cloning Kit

QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit

目次	ページ
QIAGEN PCR Cloning Kitのライゲーション・プロトコール	2
QIAGEN PCR Cloning ^{plus} Kitのトランスフォーメーション・プロトコール	4
トラブルシューティング	6

April 2001



QIAGEN PCR Cloning Kitのライゲーション・プロトコール

実験前の注意事項

- ブルーフリーディングDNAポリメラーゼ (3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を持つDNAポリメラーゼ) により増幅したPCR産物を使用すると、増幅物の末端にオーバーハングAが付加されていないのでライゲーション効率が非常に低下します。
- ライゲーションにはpDrive Cloning Vector DNAに対してモル比で5～10倍のPCR産物を使用することを推奨しますが (表2)、より少量のPCR産物でも十分な場合があります。MinElute™ Kitを用いて高濃度のPCR産物が精製できます。
- ライゲーション前のPCR産物の精製 (例; QIAquick®, MinElute PCR PurificationあるいはGel Extraction Kitを用いて) は必ずしも必要ありませんが、一般的には精製によりトランスフォーメーション効率がより高くなります。Handbookの23ページ、Appendixの“Purification of PCR products”を参照。
- PCRプライマーの5'末端塩基は非ブルーフリーディングDNAポリメラーゼによるPCR産物へのオーバーハングA付加に影響を与えます。Handbookの21ページ、Appendixの“Effect of the 5'-terminal base of PCR products on cloning efficiency”を参照。
- PCRテンプレートがコロニー選択に使用する抗生物質の耐性遺伝子 (例; アンピシリンあるいはカナマイシン耐性遺伝子) を持つプラスミドDNAの場合、トランスフォーメーションの後バックグラウンドにコロニーが発生することがあります。このような場合には、テンプレートのプラスミドPCRを除去するために、ライゲーションの前にPCR産物をゲルを用いて分離精製します。アンピシリン耐性遺伝子を持つテンプレートプラスミドの場合にはカナマイシンで選択を行えば (その逆転写も同様) ゲルによる精製の必要はありません。
- トランスフォーメーションにQIAGEN EZ Competent Cellではなく、**エレクトロポレーションによるコンピテントセル**を使用する場合には、エレクトロポレーションの前にライゲーション反応液を70℃で10分間インキュベートすることにより、必ずリガーゼを非活性化してください (プロトコールのステップ4参照)。

表 2. ライゲーション反応に使用するPCR産物量に関するガイド

PCR産物のサイズ	ライゲーション反応に使用するPCR産物量	
	モル比で5倍量*	モル比で10倍量*
100 bp	6.5 ng	13 ng
200 bp	13 ng	26 ng
500 bp	32.5 ng	65 ng
1000 bp	65 ng	130 ng
1500 bp	97.5 ng	195 ng
2000 bp	130 ng	260 ng
3000 bp	195 ng	390 ng

* 以下の計算式を用いて50 ngのpDrive Cloning Vectorに対応するPCR産物量を計算した：
$$\text{ng PCR} = \frac{50 \text{ ng} \times \text{PCR産物のサイズ (bp)} \times \text{モル比}}{3851 \text{ bp}}$$

プロトコール

1. **2x Ligation Master Mix、pDrive Cloning Vector DNA および蒸留水（添付品）を解凍し、解凍後は氷上に置く。**

塩濃度が均一になるように、使用前に各溶液を十分に混合します。2x Ligation Master Mix は氷上に保存し、使用後は即-20℃あるいは-70℃に保存します。

2. **ライゲーション反応液を以下の表に従って調製する。**

成分	容量/ 反応
pDrive Cloning Vector (50 ng/μl)	1 μl
PCR 産物	1 ~ 4 μl*
蒸留水	変更可
Ligation Master Mix, 2x [†]	5 μl
最終容量	10 μl

* 精製したPCR 産物。非精製PCR を使用する場合には、PCR 産物を2 μl 以上添加しない。
Ligation Master Mix は最後に添加する。

3. **ライゲーション反応液を簡単にミックスした後、4 ~ 16℃で30分間インキュベートする（冷蔵庫中、水浴、サーマルサイクラーブロック）。**

ピペットで数回アップダウンするなどして反応液を静かにミックスします。

注：ライゲーション時間を2時間に延長すると、2 ~ 3 倍の組み換えDNA が得られます。2 kb より大きいPCR フラグメントをライゲートする場合には特に有効です。しかし、組み換えDNA の総数が重要ではない場合には、ライゲーション時間を15分に短縮可能です。

4. **トランスフォーメーションのプロトコール（ステップ14）に進むかライゲーション反応液を使用するまで-20℃で保存する。**

重要：4 ページのトランスフォーメーションプロトコールは、QIAGEN EZ Competent Cell 用です。エレクトロポレーションによるコンピテントセルを使用する場合には、エレクトロポレーションの前にライゲーション反応液を70℃で10分間インキュベートすることにより、必ずリガーゼを非活性化してください。あるいはMinElute Reaction Cleanup Kit を用いてライゲーション反応液からリガーゼを除去することも可能です。QIAGEN EZ Competent Cell を使用する際にはリガーゼを非活性化する必要はありません。

QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit のトランスフォーメーション・プロトコール

実験前の注意事項

- 本プロトコールはQIAGEN EZ Competent Cell 用のもので、エレクトロコンピテント細胞用ではありません。エレクトロポレーションによるコンピテント細胞を使用する場合には、エレクトロポレーションの前にライゲーション反応液を70℃で10分間インキュベートすることにより、**必ず**リガーゼを非活性化してください。詳細はライゲーション・プロトコール (3 ページ) を参照してください。
- コンピテント細胞は温度および機械的なストレスに対する感受性が非常に高いので、トランスフォーメーション前に、**QIAGEN EZ Competent Cell**を決して解凍しないでください。解凍した細胞は氷上に保存し、ピペッティングのような粗雑な取り扱いをしないでください。細胞は**静かに**チューブを軽く指でたたいてミックスしてください。
- SOC 培養液は解凍し、室温にします。使用後は-20~-70℃で保存します。
- 選択マーカーとしてアンピシリン (100 µg/ml LB 寒天) あるいはカナマイシン (30 µg/ml LB 寒天) を含むLB 寒天プレートを新しく調製します。組み換えコロニーの青色 / 白色スクリーニングのために Include IPTG (50 µM) および X-gal (80 µg/ml) を添加します。Appendix (Handbook 27 ページ) を参照してください。

プロトコール

1. 必要な数だけ**QIAGEN EZ Competent Cell**のチューブを氷上で解凍する。**SOC 培養液**を解凍し、室温にする。

重要: コンピテント細胞は必ず氷上で解凍します。使用しない**QIAGEN EZ Competent Cell**は解凍しないでください。チューブを軽く指でたたき細胞が解凍したかチェックします。細胞が解凍したら直ちにトランスフォーメーションステップに進みます。

2. **QIAGEN EZ Competent Cell**の入ったチューブ1本当たり1~2 µlのライゲーション・ミックスを添加し、静かにミックスし、氷上で5分間インキュベートする。

トランスフォーメーション・ミックスは指で数回たたきなどして、静かに混合します。

3. チューブを**42℃**に設定した水浴あるいはヒートブロック中で振盪することなく**30秒間加熱**する。

4. 氷上で**2分間インキュベート**する。

5. 室温にした**SOC 培養液**を**250 µl**各チューブに添加し、トランスフォーメーション・ミックス**100 µl**をアンピシリンを含む**LB 寒天プレート**に直接プレーティングする。

注: カナマイシン選択を行う場合には、組み換え体がよく増殖するように**37℃**で**30分間振盪**しながらインキュベートします。

トランスフォーメーション・ミックスは滅菌したスプレッターを用いてプレーティングできます。続いて行うシングルコロニー分離の際に単一のコロニーを確実に分

離できるようにトランスフォーメーション・ミックスの様々な量（例えば100 µlと20 µl）をプレーティングすることを推奨します。少量のトランスフォーメーション・ミックス（50 µl以下）をより効率的にプレーティングするには、プレート上にLB 培養液を100 µlピペッティングしておき、その上にトランスフォーメーション・ミックスをピペッティングします。

6. トランスフォーメーション・ミックスが寒天中に吸収されるまでプレートを室温でインキュベートする。プレートを逆さまにして37℃で1晩インキュベートする（例えば15～18時間）。

注：青色／白色スクリーニングには、4℃（例えば冷蔵庫中）で数時間、2回目のインキュベーションをお勧めします。このコールド・インキュベーションにより青い色がより強くなるので、青色と白色のコロニーの区別がしやすくなります。

トラブルシューティング

コメントと提案

寒天プレート上にコロニーがない

- | | |
|-----------------------------------|---|
| a) 未添加の試薬がある | ライゲーション・ミックスにすべての試薬を添加したか、トランスフォーメーションの前にライゲーション・ミックスを添加したかをチェックする。 |
| b) コンピテント細胞のトランスフォーメーション効率が低い | 受容能の高い細胞 (>1.0 x 10 ⁸ cfu/μg 環状プラスミドDNA) を使用する。QIAGEN EZ Competent Cell を使用しない場合には、環状プラスミドDNA の決まった量を用いてトランスフォーメーション効率をテストする。 |
| c) トランスフォーメーション操作が正確でない | 適切なトランスフォーメーション操作を行ったか確かめる：外部DNA を取り入れられるように化学的処理した細胞 (QIAGEN EZ Competent Cell) には42℃でヒートショックを行い、電気的に受容能を与える細胞にはエレクトロポレーションを行う。 |
| d) エレクトロポレーションの前にリガーゼの非活性化を行わなかった | トランスフォーメーションにエレクトロポレーションを使用する場合には、その前に 必ず ライゲーション・ミックス中のリガーゼを非活性化する。ライゲーション後、ライゲーション・ミックスを70℃で10分間インキュベートしてからエレクトロポレーションを行う。ライゲーション・ミックスからのリガーゼ除去にMinElute Reaction Cleanup Kit を使用することもできる。 |
| e) 抗生物質が適正ではない | 適切な抗生物質をLB寒天プレートに使用したかどうかチェックする。 |
| f) インキュベーション温度が適切ではない | 正しいインキュベーション温度を使用したかを確認する。 |

コメントと提案

- g) PCR に使用したDNA
ポリメラーゼが適切ではない
- QIAGEN PCR Cloning Kitは、ブルーフリーディング活性を持たないDNAポリメラーゼ（例えばTaq DNAポリメラーゼ）により増幅したPCR産物のクローニング用にデザインされている。ブルーフリーディング活性を持つDNAポリメラーゼは平滑末端PCR産物を増幅するので、pDrive Cloning Vector と効率的にライゲートしない。このようなPCR産物には適切なポリメラーゼ処理によりオーバーハングAを付加できる。
- 白色コロニーの数が少ない
- a) PCR に使用したDNA
ポリメラーゼが適切ではない
- QIAGEN PCR Cloning Kitは、ブルーフリーディング活性を持たないDNAポリメラーゼ（例えばTaq DNAポリメラーゼ）により増幅したPCR産物のクローニング用にデザインされている。ブルーフリーディング活性を持つDNAポリメラーゼは平滑末端PCR産物を増幅するので、pDrive Cloning Vector と効率的にライゲートしない。このようなPCR産物には適切なポリメラーゼ処理によりオーバーハングAを付加できる。
- b) インサートとベクターの
比率が適切ではない
- アガロースゲル解析によりPCR産物を定量する(Handbook 23 ページ“Quantitation of PCR products”)。インサートとベクターの比率は5 : 1 から10 : 1 を推奨する。稀ではあるが、インサートとベクター比率をさらに至適化する必要があることもある。
- c) ライゲーション時間が短い
- ライゲーション時間を延長すると組み換えコロニー数が増加できる。
- d) DNAポリメラーゼによる
PCR産物へのオーバーハングA
の付加が不十分である
- PCR過程で末端に効果的にオーバーハングAが付加されるように、最終のエクステンション操作は少なくとも10分間行う。PCR産物へ効率良くオーバーハングAが付加されるかはシークエンスにも依存している。Handbook 21 ページの “Effect of the 5'-terminal base of PCR primers on cloning efficiency” を参照。
- e) PCR 溶液中に阻害物質が
存在する
- ライゲーションの前に、QIAquick あるいはMinElute システムを用いてPCR産物を精製する。Handbook 23 ページ “Purification of PCR products” を参照する。
- f) PCR産物に紫外線を長時間照射
- ゲル抽出の際に、PCR産物の可視化のためには長波長の紫外線を使用し、DNAにできるだけ短時間しか照射しない。紫外線の長時間照射によりピリミジン2量体が形成されコロニー形成効率が低下する。

コメントと提案

- g) ライゲーション温度が適切ではない
ライゲーション温度は16℃を超えていなかったかチェックする。より高温では（例えば25℃以上）バックグラウンドが高くなり、組み換えコロニーがより少なくなる。
- h) ヌクレアーゼのコンタミ
ヌクレアーゼにより付加されたオーバーハングUが分解され得る。ライゲーション反応にはヌクレアーゼの不在をテストした添付の蒸留水、Ligation Master Mixのみを使用する。

プレート上に白色コロニーしか存在しない

- a) 青色／白色スクリーニングに適切でないバクテリア株を使用した
トランスフォーメーションに使用したバクテリア株が *lacI^qZΔM15* 遺伝子型を持っているか確認する。QIAGEN EZ Competent Cell に存在するこの異変は、通常F'プラスミド上にあり、青色／白色スクリーニングに必須である。
- b) X-gal、IPTG が不十分あるいは添加されていない
寒天プレートにX-gal/IPTG が十分に含まれているかをチェックする。新しく調製したプレートを使用する。
- c) PCR 反応液に残留していたプラスミドDNAテンプレート
を細胞にトランスフォームした
PCR テンプレートがコロニー選択に使用する抗生物質の耐性遺伝子（例；アンピシリンあるいはカナマイシン耐性遺伝子）を持つプラスミドDNAの場合、トランスフォーメーションの後バックグラウンドにコロニーが発生することがある。このような場合には、テンプレートのプラスミドPCRを除去するため、ライゲーションの前にPCR産物をゲルを用いて分離精製するべきである。アンピシリン耐性遺伝子を持つテンプレートプラスミドの場合にはカナマイシンで選択を行えば（その逆も同様）ゲルによる精製の必要はない。カナマイシン耐性にはアンピシリンに耐性の白色コロニーをスクリーニング、あるいはその逆を行う。
- d) 抗生物質が分解
寒天プレート中の抗生物質の活性が失われて、形質転換していないコロニーも増殖している。新しく調製したプレートを使用する。冷却した寒天溶液（55℃以下）に抗生物質を添加しプレートに注ぐ。

プレート上に青色コロニーのみ

- a) 青色／白色スクリーニングに使用したバクテリア株が適切ではない
トランスフォーメーションに使用したバクテリア株が *lacZ* 変異（例； QIAGEN EZ Competent Cell）を有しているか確認する。*lacZ*⁺ 株は青色／白色スクリーニングに適切ではない。
- b) *LacZ* α-ペプチド融合タンパク質の機能を持つ
ごく稀ではあるが、クローニングした PCR 産物が機能的に *LacZ* α-ペプチドとして作用する融合タンパク質を発現した。このようなクローニングされたフラグメントの長さは通常3塩基の倍数である（付加されたオーバーハングAを含めて）
- c) ヌクレアーゼのコンタミ
ヌクレアーゼにより付加されたオーバーハングUが分解され得る。ライゲーション反応にはヌクレアーゼの不在をテストした添付の蒸留水、Ligation Master Mixのみを使用する。
- d) PCR 産物がライゲーション・ミックスに添加されなかった
PCR 産物をライゲーション・ミックスに添加したか確認する。

一方向のみのPCR産物を含むクローン

適切なリーディングフレームのPCR産物の発現が細胞にとって毒性がある（例； *LacZ* α-ペプチドを持つ融合タンパク質など）。培養液からIPTGを除去すると P_{lac} からの発現レベルが低下し、細胞が生き残る可能性がある。しかし、通常、青色／白色選択はIPTGなしには不可能である。

白色コロニーが目的のPCR産物を含んでいない

- a) PCR 反応液に残留していたプラスミドDNAテンプレートを細胞にトランスフォームした
PCR テンプレートがコロニー選択に使用する抗生物質の耐性遺伝子（例； アンピシリンあるいはカナマイシン耐性遺伝子）を持つプラスミドDNAの場合、トランスフォーメーションの後バックグラウンドにコロニーが発生することがある。このような場合には、テンプレートのプラスミドPCRを除去するために、ライゲーションの前にPCR産物をゲルを用いて分離精製すべきである。アンピシリン耐性遺伝子を持つテンプレートプラスミドの場合にはカナマイシンで選択を行えば（その逆も同様）ゲルによる精製の必要はない。カナマイシン耐性にはアンピシリンに耐性の白色コロニーをスクリーニング、あるいはその逆を行う。

コメントと提案

- b) pDrive Cloning Vector に非特異的なPCR 産物あるいはプライマー・ダイマーがクローニングされた
- アニーリング温度を増加、あるいはホットスタート法（例えば HotStarTaq™ DNA Polymerase）等を使用してPCR 条件の厳密性を高める。あるいはライゲーション前にPCR 産物をゲル抽出により精製する。
- c) ヌクレアーゼのコンタミ
- ヌクレアーゼにより付加されたオーバーハングUが分解され得る。ライゲーション反応にはヌクレアーゼの不在をテストした添付の蒸留水、Ligation Master Mix のみを使用する。

Memo

株式会社 **キアゲン**

〒104-0054 東京都中央区勝どき3-13-1 Forefront Tower II

Tel: 03-6890-7300

Fax: 03-5547-0818

E-mail: techservice-jp@qiagen.com

www.qiagen.com

