

無細胞くん:テンプレート用プラスミド DNA 作成例

1. はじめに

無細胞くんによるタンパク質を発現には、T7 プロモーター及びターミネーター、リボソーム結合部位などの配列をもつ市販のプラスミドベクターが使用できます。

本法ではその一例として、pET-3a (Novagen) に CAT 遺伝子を挿入し、pET-CAT を作成した例をご紹介します。

2. 使用器具および試薬

2. 1. 使用器具

| | | |
|---|----------------------|-----|
| A | PCR チューブ | --- |
| B | 0.6 mL チューブ | --- |
| C | 1.5 mL チューブ | --- |
| D | 冷却遠心機 | 1 台 |
| E | 2ml 用アングルローター | 1 台 |
| F | サーマルサイクラー | 1 台 |
| G | 1000 μ L ピペット | 1 本 |
| H | 1000 μ L ピペットチップ | --- |
| I | 200 μ L ピペット | 1 本 |
| J | 200 μ L ピペットチップ | --- |
| K | 10 μ L ピペット | 1 本 |
| L | 10 μ L ピペットチップ | --- |

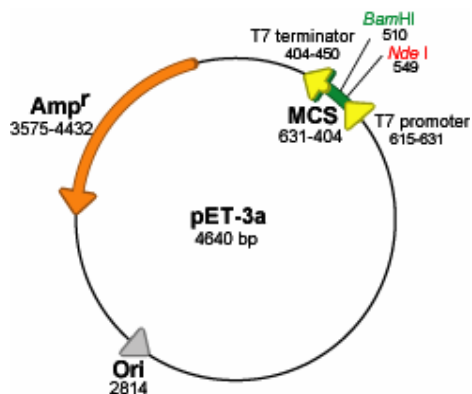
2. 2. 使用試薬

| 試薬名 | 使用量 |
|--|------|
| pET-3a (Novagen) Cat.No.69418-3 | 1 本 |
| Expand Hi-Fi PCR system (ロツシュ・ダイアグノスティックス) Cat.No.1759078 | 1キット |
| dNTP Mixture (each 2.5 mM) (タカラバイオ) Cat.No.4030 | 1 本 |
| Nde I (400U) (タカラバイオ) Cat.No.1161A | 1 本 |
| Bam H I (10,000U) (タカラバイオ) Cat.No.1010A | 1 本 |
| illustra GFX PCR Purification Kit (GE Health Care) Cat.No.28-9034-70 | --- |
| Competent High DH5 α (TOYOBO) Cat.No.DNA-903 | 1 本 |
| T4 DNA ligase (25,000U) (タカラバイオ) Cat.No.2011A | 1 本 |
| LB/Amp (100 μ g/ml) プレート | --- |
| Milli-Q water (滅菌処理したもの) | 適量 |

3. プライマーの設計

*プライマーの設計に当たっては、目的遺伝子上流及び下流に制限酵素切断部位を付加するようにプライマーの設計を行う。

pET-3aは T7 プロモーターの下流に Nde I 切断部位があり、それと T7 ターミネーターの上流にある Bam HI 切断部位との間に目的遺伝子を挿入する。



AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAAT

T7 プロモーター

RBS Nde I

AATTTTGTTTAACTTTAAG **AAGGAG** ATATA CATATG GCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTC

MetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGlnMetGlyA

Bam HI

GC GGATCC GGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAAC

rgGlySerGlyCysEnd

3. 1. CAT 遺伝子取得のためのプライマー配列

Forward プライマー

5' - ggaattc^{Nde I}catatggagaaaaaatcactgg

Reverse プライマー

5' - aaggatc^{Bam HI}ccttacgccccgcctgc

* *Nde I* は上流及び下流に 7 塩基以上の予備配列が必要

** *Bam HI* は上流および下流に 2 塩基以上の予備配列が必要

(New England Bio laboratories カタログ Cleavage Close to the End of DNA Fragments (oligonucleotides) 参照)

4. CAT 遺伝子の取得 (PCR)

PCR 条件

| | | |
|-------------------------|-------------|----------|
| 鑄型:pUC-CAT | 0.915 μg/ml | 0.5 μL |
| プライマー:Forward | 100 μM | 1 μL |
| プライマー:Reverse | 100 μM | 1 μL |
| PCR 緩衝液 | ×10 | 5 μL |
| dNTP mixture | 2.5 mM each | 4 μL |
| Expand Hi-Fi polymerase | 350 U/μL | 0.35 μL |
| Milli-Q water | | 37.15 μL |

| | | |
|------|---------------------|----------|
| 94°C | 120 sec | |
| 94°C | 30 sec | ← |
| 60°C | 30 sec | 10cycles |
| 72°C | 60 sec | → |
| 94°C | 30 sec | ← |
| 60°C | 30 sec | 20cycles |
| 72°C | 60 sec + 5sec/cycle | → |
| 72°C | 300 sec | |
| 4°C | | |

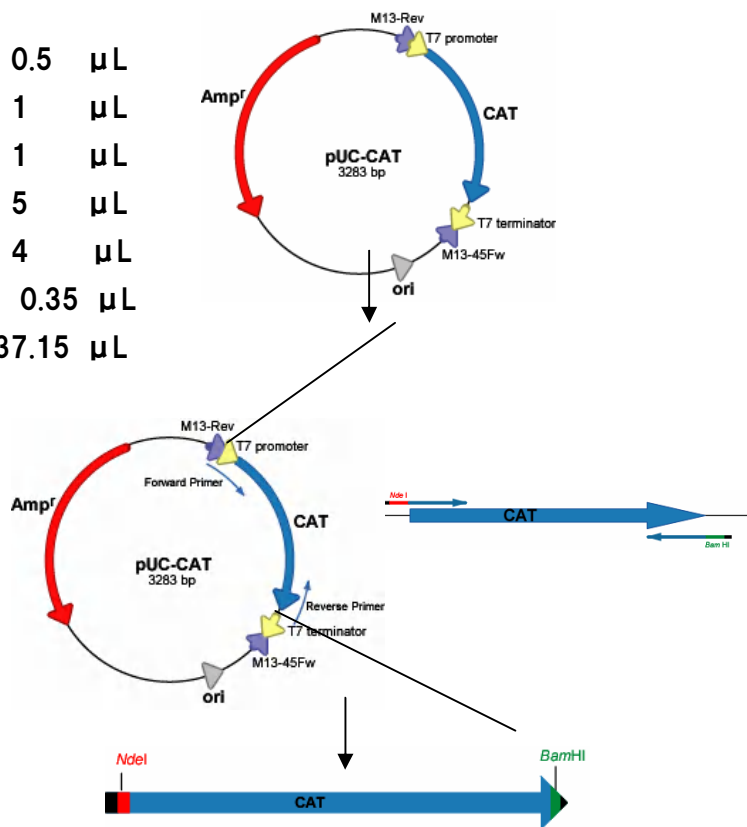


図 2 CAT 遺伝子の取得

illustra GFX PCR Purification Kit にて精製 (収量 20 μL)

```

NdeI
ggaattc_catATGAGAGAAAAAATCACTGGATATAACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAA
GAACATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTAC
GGCCTTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTACATTCTTGCCC
GCCTGATGAATGCTCATCCGGAATCCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGT
GTTACCCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCA
CGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTTACGGTGAAAACCTGGCCT
ATTTCCCTAAAGGTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGT
TTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTTCACCATGGGCAAATATTATAC
GCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTTCAGGTTTCATCATGCCGCTGTGATGGCTTCCATG
    
```

5. CAT 遺伝子及び pET-3a ベクターの制限酵素処理

5. 1. *Bam* HI による切断

| | CAT 断片 | pET-3a |
|----------------------|------------|---------------------------|
| DNA | 20 μ L | 20 μ L (5 μ g 相当) |
| 10 \times K Buffer | 20 | 20 |
| <i>Bam</i> HI | 10 | 10 |
| Milli-Q water | 150 | 150 |

↓ 30°C, 3 時間

↓ illustra GFX PCR Purification Kit で精製 (収量 20 μ L)

5. 2. *Nde* I による切断

| | CAT 断片 | pET-3a |
|----------------------|------------|---------------------------|
| DNA | 20 μ L | 20 μ L (5 μ g 相当) |
| 10 \times H Buffer | 20 | 20 |
| <i>Nde</i> I | 10 | 10 |
| Milli-Q water | 150 | 150 |

↓ 30°C, 3 時間

↓ illustra GFX PCR Purification Kit で精製 (収量 20 μ L)

6. ライゲーション反応

| | |
|--|-----------|
| pET-3a (<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> HI cut) | 1 μ L |
| CAT (<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> HI cut) | 2 μ L |
| 10 \times Ligation Buffer | 1 μ L |
| T4 DNA Ligase | 1 μ L |
| Milli-Q water | 5 μ L |

↓ 16°C

↓ 大腸菌 (*Escherichia coli* DH5 α) に導入

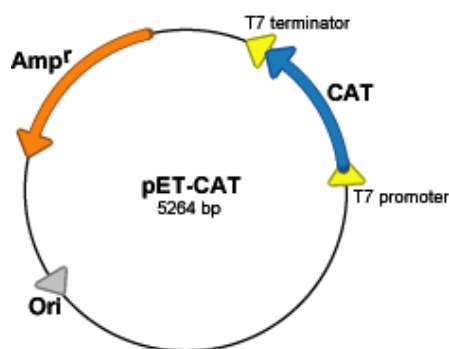


図 4 pET-CAT

7. 大腸菌の導入

*Competent High DH5 α (TOYOBO) を使用する。

Competent High DH5 α 1 チューブを氷上で解凍する。

↓ピペットで穏やかに攪拌する。

↓→50 μ L を新しい 1.5mL チューブに移す。

↓←10 μ L pET-CAT (ライゲーション反応液) を加える。

↓穏やかに攪拌

↓氷上で 30 分間静置する。

↓42°C で 30 秒間加温する。

↓氷上で 2 分間静置する。

↓←450 μ L SOC (Competent High DH5 α 付属) を加える。

↓37°C で 1 時間振とうする。

↓100 μ L、200 μ L をそれぞれ LB/Amp (100 μ g/ml) プレートに撒く

↓ 37℃で一晩静置する。

↓ 生育したコロニーを任意に選択し、プラスミドの確認を行う。

(選択したコロニーを LB/Amp (100 μg/ml) プレートに接種し 37℃で一晩培養しレプリカを作製する。)

以上