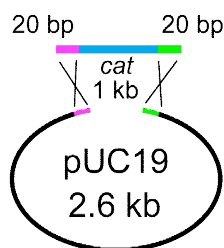
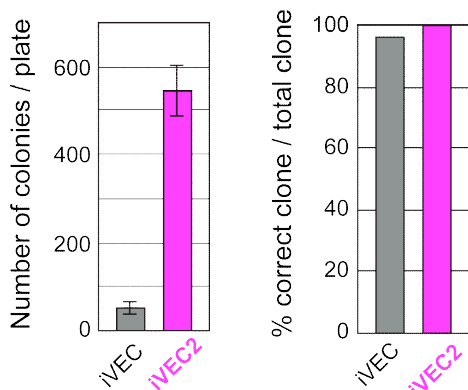


## iVEC2 (ME9783 株) 使用方法



この度 NBRP 大腸菌では、iVEC 用大腸菌 AQ3625 株に変異を導入することにより、コロニー出現数が 10 倍ほど上昇した新たな iVEC 用大腸菌株 (ME9783) を開発しました。



pUC19 に *cat* 遺伝子をクローニングしたときのコロニー数と正しいクローンの割合

まず、1 kb の挿入 DNA 断片と 2.6 kb のベクター DNA で同時に形質転換した時、新 iVEC 株では 500 以上のコロニーが出現します。

さらに、形質転換体のほぼ 100% で目的の組換えプラスミドが形成されています。これにより、より長い挿入 DNA の組換えや複数の DNA 断片の組換えの効率なども向上することが期待できます。

新 iVEC 株 ME9783 は AQ3625 と同様に TSS 法での *in vivo* クローニングで、その最大の性能を発揮します。

ここで紹介する TSS 法は、コンピテントセルの作製から形質転換までを 1 本のチューブで行える非常に簡便な形質転換方法です。

## iVEC 用形質転換

### 使用試薬

- TSS 溶液組成 50 ml (約 500 回分)

L 培地	25 ml
2xTSS 溶液	20 ml
DMSO	5 ml

4°Cで保存可能

- 2xTSS 溶液組成 (20 ml)

PEG8000	4 g
1M MgSO <sub>4</sub>	2 ml
80 % glycerol	5 ml
L 培地	to 20 ml

オートクレーブ 120°Cで 15 分

よく混ぜてから使用する。

4°Cで保存可能

- L 培地組成 (1,000 ml)

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O	to 1,000 ml

5N NaOH で pH を 7.0 に調整

オートクレーブ 120°Cで 15 分

## iVEC クローニングする DNA の準備

- ・ ベクターとインサートの両端の“のりしろ”となる相同配列は、15 から 30bp 程度が必要。
- ・ ベクター、インサートともに KOD plus Neo (TOYOBO) 等の校正活性の高いポリメラーゼを使用する。
- ・ 末端にアデニンが付加されるようなポリメラーゼを使用するとクローニング効率が低下する。
- ・ PCR 反応液中のベクターテンプレート DNA 量が 10 pg/ $\mu$ l 以下であれば、鑄型ベクターが導入されることはほとんどない。
- ・ ベクターテンプレート DNA 量を減らせない場合は、PCR 後に DpnI 処理などをして鑄型ベクターを不活性化させておくと当たりコロニーの割合が上昇する。

## コンピテントセルの作製及び形質転換のプロトコル

### 一日目 コンピテントセルの準備（所要時間約 3 分）

#### 準備するもの

- ・ 寒天培地に広げた iVEC 株のコロニー（前日調整したものか、数日前に調整して冷蔵保存していた比較的新しいコロニー）
- ・ L 培地
- ・ 滅菌爪楊枝または滅菌チップ
- ・ 37°Cのインキュベーター

1. 寒天培地上の iVEC 株のコロニーを滅菌した爪楊枝でつつく（ごく少量で良い）。
2. 1ml の L 培地を加えた 1.5 ml チューブ中で軽くかき混ぜて植菌する。
3. 蓋を閉めた状態で、37°Cで 20 時間（16–24 時間でも可能）静置培養する。

### 二日目 コンピテントセルの作製及び形質転換（所要時間約 80 分、実作業時間 5 分程度）

#### 準備するもの

- ・ 小型冷却遠心機
- ・ 37°Cのウォーターバスインキュベーター
- ・ 液体窒素
- ・ PCR によるベクターとインサート DNA。いずれも 100 ng/ $\mu$ l もあれば十分で、PCR 後の未精製サンプルでも可能。

1. 一晩培養した 1.5 ml チューブを、氷上で 5~10 分程度静置する。
2. 4°Cに冷やした遠心機で、5,000 g で 1 分間遠心
3. 上清を素早く除き、氷上へ置く。
4. 氷冷した TSS 溶液 100  $\mu$ l に PCR で増幅したベクターおよびインサート

DNA を 1~2  $\mu$ l ずつ加え、氷上で静置しておく。※操作 1 から 2 の間にやっておくと良い。

5. TSS-DNA 溶液(100  $\mu$ l)で細胞をピペッティングにより素早くけん濁する。
6. すぐに液体窒素で凍らせる。  
※ **重要** 液体窒素での凍結を推奨。-80°Cまたは-30°Cのフリーザーに 20 分置いて凍らせた場合では、出現するコロニー数が 1/20 程度に減少する。
7. 一度完全に凍結したチューブを氷上に 10 分間置いて溶かす。
8. 溶けたら 1 秒間ボルテックスで軽く混ぜて、すぐに氷上へ戻し、さらに 10 分間氷上で静置する。
9. 氷上から取り出して、1 ml の L 培地（室温）を加えて転倒混和。
10. 37°Cのウォーターバスインキュベーターで 45 分間静置する。※ヒートショックは必要ない。
11. 5,000 g、室温で 1 分遠心後、上清を 100  $\mu$ l 程度残して捨てて、沈殿した細胞を残った上清でけん濁する。
12. 全量を寒天培地に塗り広げて、37°Cで一晩培養する。

#### 注意点

本菌株では RecET の過剰発現により組換え頻度が上昇しているため、一部プラスミド同士が組換えを起こしてマルチマーを生じます。

## 凍結保存用コンピテントセル作製プロトコル

iVEC 用のコンピテントセルを、一度に作成し、凍結保存しておくことができます。この方法でも、用時調整したコンピテントセルと同じぐらい高い形質転換効率が期待できます。

### 使用試薬

#### ● 2xTSS 溶液組成 (20 ml)

PEG8000	4 g
1M MgSO <sub>4</sub>	2 ml
80 % glycerol	5 ml
L 培地	to 20 ml

オートクレーブ 120°C で 15 分

よく混ぜてから使用する。

4°C で保存可能

#### ● DMSO

### iVEC クローニングする DNA の準備

- ・ ベクターとインサートの両端の“のりしろ”となる相同配列は、15 から 30bp 程度が必要。
- ・ ベクター、インサートともに KOD plus Neo (TOYOBO) 等の校正活性の高いポリメラーゼを使用する。
- ・ 末端にアデニンが付加されるようなポリメラーゼを使用するとクローニング効率が低下する。
- ・ PCR 反応液中のベクターテンプレート DNA 量が 10 pg/μl 以下であれば、鑄型ベクターが導入されることはほとんどない。
- ・ ベクターテンプレート DNA 量を減らせない場合は、PCR 後に DpnI 処理などをして鑄型ベクターを不活性化させておくと当たりコロニーの割合が上昇する。

## 凍結保存用コンピテントセル作製プロトコル

### 一日目

1. 寒天培地上のコロニーを 3ml の L 液体培地に植菌する。
2. 37°C で一晩 (16 時間程度) 振とう培養する。

### 二日目

1. 1 ml の一晩培養液を 60ml の 37 °C に暖めておいた L 液体培地に植菌して、37 °C で 90 分振とう培養する。これで通常は、OD600 = 0.4 - 0.5 程度になる。
2. 培養を止め氷中で冷やす。以降の操作はすべて冷やした状態で行う。
3. 5000 g、4° C で 5 分間遠心後、上清を捨てる。
4. 大腸菌のペレットを 2 ml の氷冷した L 液体培地に懸濁する。
5. 1.6 ml の氷冷した 2xTSS 溶液を加えて混ぜる。
6. 0.4 ml の DMSO (この時の DMSO は凝固するため室温で OK) を加えて混ぜる。
7. 0.1 ml ずつ氷上で分注する。
8. 液体窒素で凍結後、-80 °C で保存する。

## 凍結保存用コンピテントセルによる形質転換

1. 凍結したコンピテントセルを氷上に置いて溶かす。
2. ベクターとインサートの PCR 産物を 1~2  $\mu$ l ずつコンピテントセルに加えて、優しくピペッティングして混ぜる。
3. 氷上で 20 分静置する。
4. 1 ml の L 培地 (室温) を加えて転倒混和。
5. 37°C のウォーターバスインキュベーターで 45 分間静置する。※ヒートショックは必要ない。
6. 5,000 g、室温で 1 分遠心後、上清を 100  $\mu$ l 程度残して捨てて、沈殿した細胞を残った上清でけん濁する。
7. 全量を寒天培地に塗り広げて、37°C で一晩培養する。