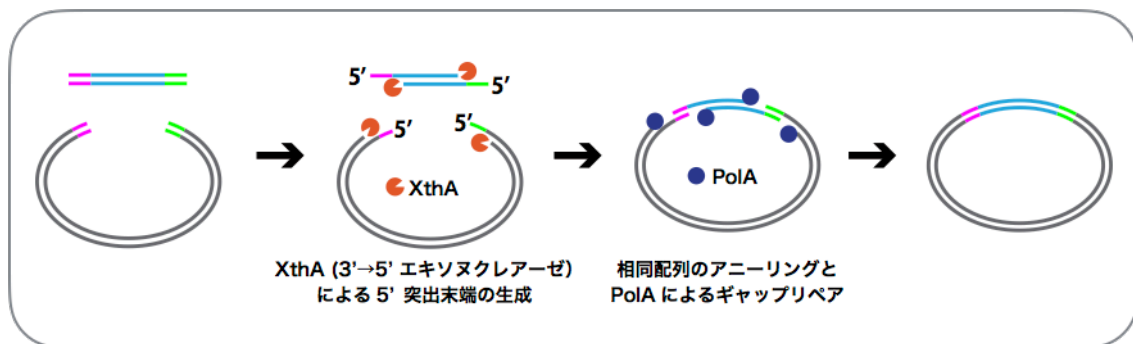


iVEC3 株の解説及び使用方法

iVEC は大腸菌に DNA 断片を取り込ませるだけで簡単にシームレスクローニングを行う方法です。この度、NBRP 大腸菌では、これまでの iVEC 株の欠点であったプラスミドのマルチマー化が起きない菌株 iVEC3 を公開しました。これまでの iVEC 株では、組換え酵素である RecET の発現によって *in vivo* クローニングを行なっていましたが、iVEC3 では RecET ではなく、3'-5' エキソヌクレアーゼである XthA に依存して *in vivo* クローニングが可能となっています。下記のようなメカニズムにより *in vivo* クローニングが起こると考えられます。

1. 導入した DNA 断片の 3'末端が XthA により分解されて、5'突出の一本鎖 DNA 領域が露出する。
2. 相同的な一本鎖 DNA 同士がアニールした後にギャップリペアにより修復されて、環状プラスミドとなる。

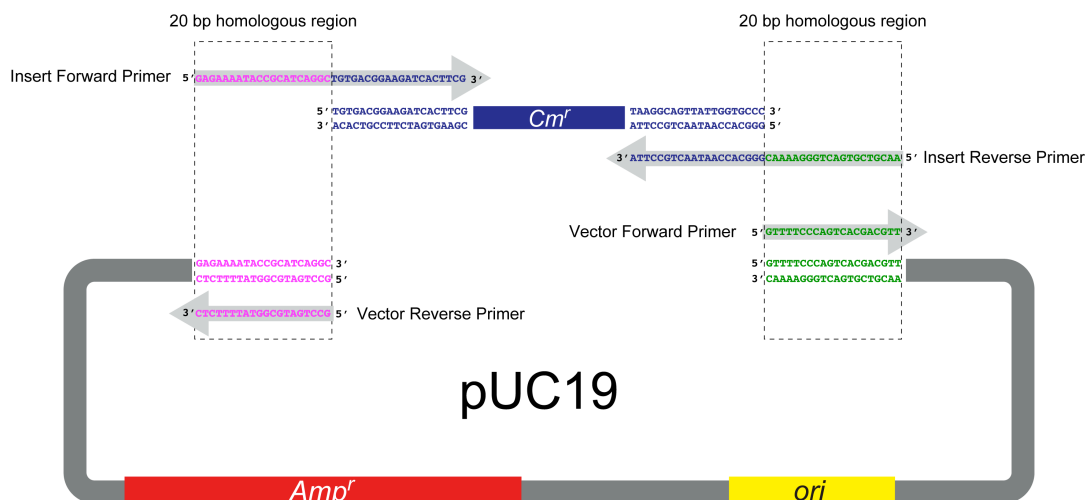


また、これまでの iVEC 株よりも *in vivo* クローニングの効率が向上しており、非常に使いやすくなっています。iVEC3 の詳しい情報につきましては現在論文投稿準備中です。

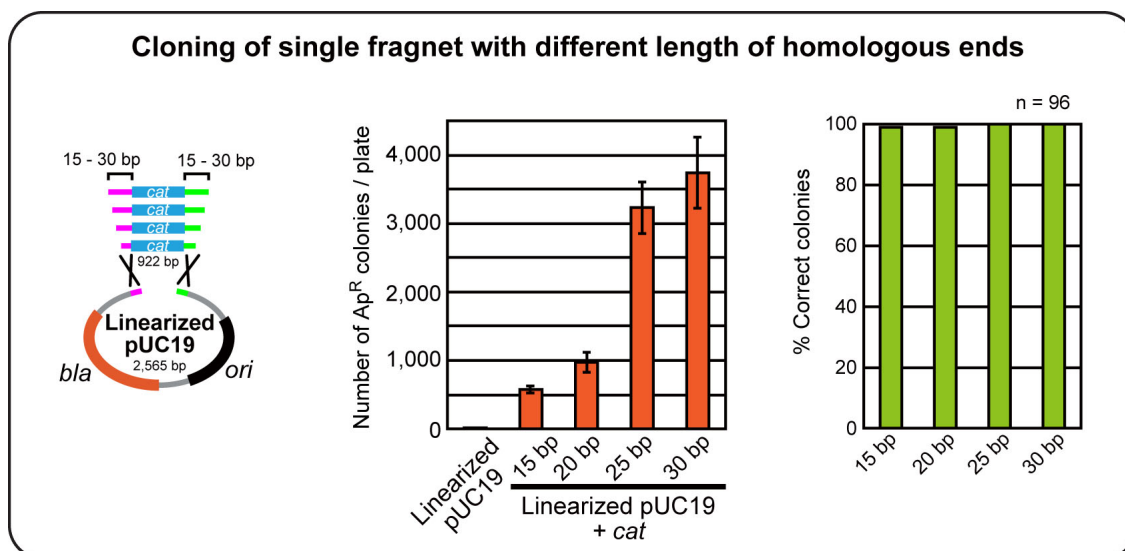
iVEC3 株の遺伝子型: MG1655 Δ hsdR Δ endA Δ recA

PCR 用の合成 DNA プライマーはベクター側と 20~40 bp 程度の相同的な配列、いわゆる“のりしろ”を持つように設計します。

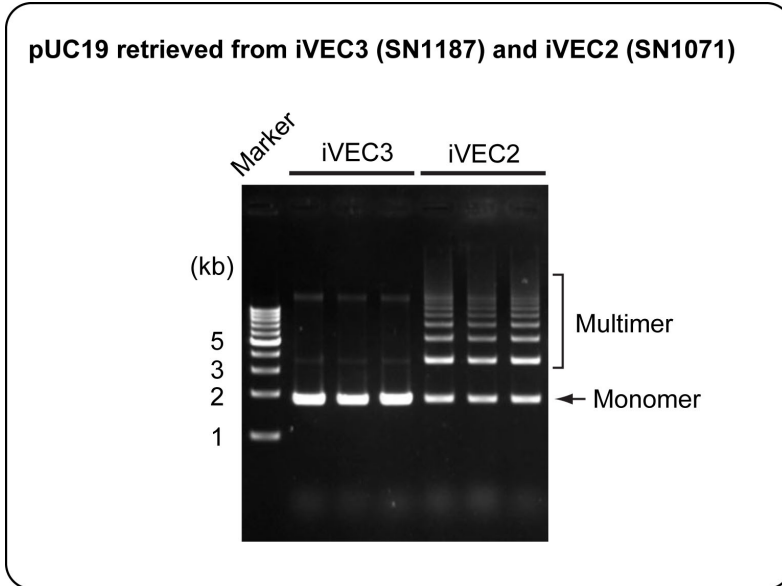
pUC19 ベクターへの pACYC184 由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子をクローニングする時に使用したプライマーの例を示します。



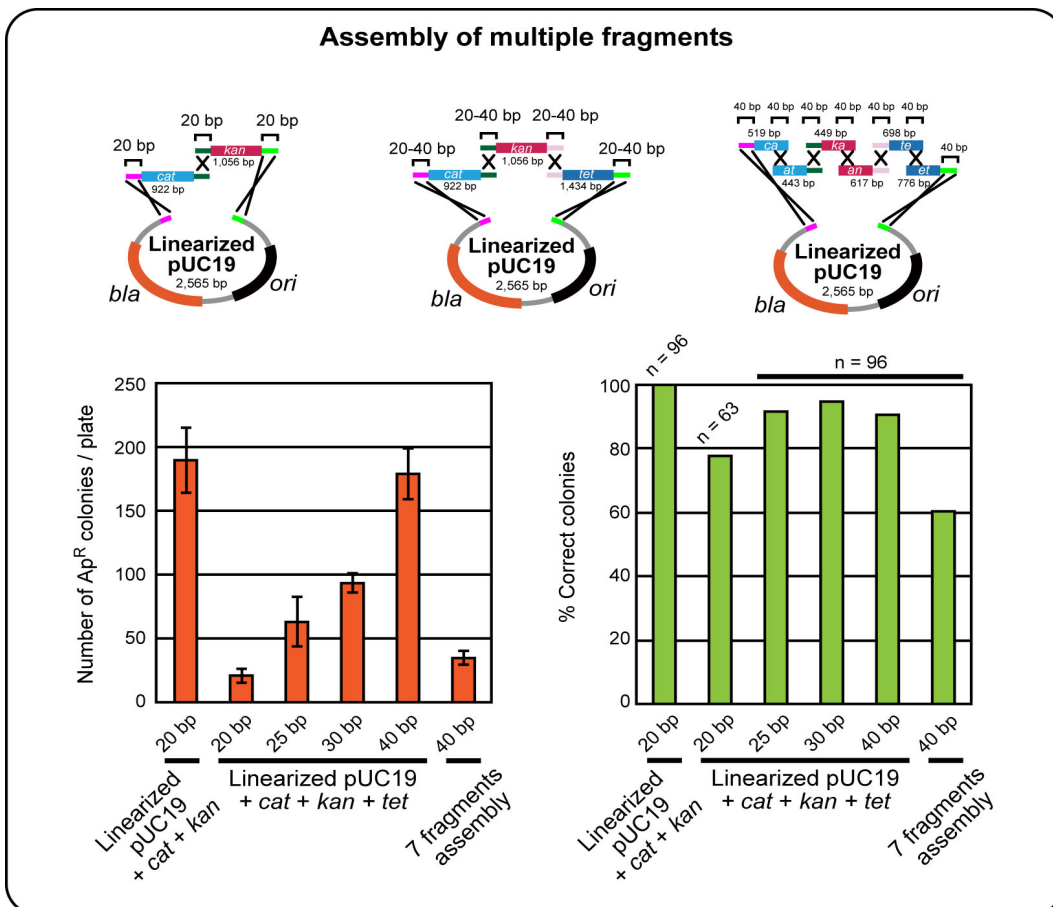
20 bp の“のりしろ”を持った約 1 kb の挿入 DNA 断片 0.15 pmol (約 100 ng) と 2.6 kb のベクター DNA 0.05 pmol (約 90 ng) で同時に、後述の方法で形質転換した場合、iVEC3 株では 1,000 個程度のコロニーが出現しました。さらに、形質転換体のほぼ 100% で目的の組換えプラスミドが形成されていました。数 kb 程度までのあまり長くない DNA のクローニングであれば、のりしろは 15 bp でも数百個程度と十分な数のコロニーが得られます。



また、これまでの iVEC 株で見られたようなプラスミドのマルチマー化は起きません。iVEC3 と iVEC2 から回収したプラスミドの電気泳動結果を示します。



複数の DNA 断片を一度にクローニングすることも可能で、40bp の"のりしろ"を付加した 6 断片の同時クローニングまで確認できています。



10 kb を超えるような大きなプラスミドを構築する場合、DNA 断片の取り込みの効率の低下により成功しない場合がありますので、ご注意ください。その場合は導入する DNA の量を増やしたり、のりしろ部分を長くしたりすることで解決する可能性があります。

新 iVEC 株もこれまでの iVEC 株と同様に 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 ₄	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 ₂ 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 40bp 程度が必要。出現するコロニー数は、20bp だと 15bp の 2 倍、25bp だとさらにその 2 倍程度増加する。
- ・ PCR 産物の濃度は 100 ng/ μ l 程度あれば良いが、5 kb を超えるような DNA を導入する場合はさらに濃い方が良い。
- ・ PCR 反応液中のベクターテンプレート DNA 量が 50 pg/ μ l 以下であれば、空ベクターの入ったハズレのコロニーは数個程度しか出ないため、PCR 産物は特に精製せずに使用することも可能である。
- ・ 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

- ・ 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。）またはグリセロールストックを滅菌した爪楊枝でかきとる。
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 で線状化したベクターとインサート DNA。PCR 直後の未精製の状態でも可能。

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 μ l に PCR で増幅したベクターおよびインサート DNA を 1~2 μ 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 μ 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. 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 μ 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。

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 ₄	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 40bp 程度が必要。出現するコロニー数は、20bp だと 15bp の 2 倍、25bp だとさらにその 2 倍程度増加する。
- ・ PCR 産物の濃度は 100 ng/μl 程度あれば良いが、5 kb を超えるような DNA を導入する場合はさらに濃い方が良い。
- ・ PCR 反応液中のベクターテンプレート DNA 量が 50 pg/μl 以下であれば、空ベクターの入ったハズレのコロニーは数個程度しか出ない。
- ・ 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またはグリセロールストックをかきとり、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、 $OD_{600} = 0.4 - 0.5$ 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 μ l ずつコンピテントセルに加えて、優しくピペ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 μ 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。