

コンストラクト作製法

ここでのコンストラクトの定義：タンパク質の cDNA を組み込んだ発現ベクターのこと

コンストラクト作製の目的：主に機能未知のタンパク質の解析を行う際、タンパク質発現系を樹立するために（発現系樹立の一環として）コンストラクト作製を行う。

方法

ベクターに組み込むインサートの増幅・調製

対象となる動物の cDNA から目的のタンパク質をコードする部位を PCR で増幅する（プライマーの設計、PCR のタイム・コースについては割愛）。なお目的部位の両端に制限酵素の認識サイトを付加しておくことと後々ベクターに導入する際の作業が楽になる。制限酵素認識配列を付ける時は制限酵素認識配列の外側に余分に数塩基加えること。

PCR 終了後、まずは未反応のプライマーを除去する。常法通りフェノール抽出~エタノール沈殿を行う。塩は PCR 産物液と等量の 5 M 酢酸アンモニウムを使用すること。なお次の制限酵素処理を行う前に目的物が増幅されているかを泳動により確認する。

PCR 産物を制限酵素で処理する（具体的な方法は割愛）。制限酵素処理を行う前に泳動切り出しを行うとベクターとのライゲーション効率が低下する可能性があるため避けること。

PCR 産物を泳動後、UV 照射下で目的のバンドを切り出す。なお切り出しの際は通常のアガロースより高純度の GTG アガロースを用いる方が好ましい。DNA に与える影響を避けるために UV に曝す時間はなるべく短くする。UV に反応して光る定規をあてバンドの位置に目星をつけて非 UV 照射下で切り出すことも可能である。この場合切り出し後に、切り出しが上手く行われたか確かめる。

切り出したゲルから DNA 断片を抽出する。抽出法は様々と思われるが竹島研では透析膜にゲル（及び 200 μ l ~500 μ l 程度の 1 \times TBE）を入れ、TBE 中で 15 分程度泳動する（110 V 前後）ことで抽出している。

抽出後の TBE に対して常法通り、フェノール抽出~エタノール沈殿・リンスする。最終的に得た DNA 沈殿は TE（pH 7.4）に溶かしている。ただし MilliQ に溶解させてもよい。

以上でインサートの調製は終了

ベクターの調製

利用するベクターの選択については省略する。実験の目的に応じたベクターを選択する。ベクターをインサートの両端に付加した制限酵素で処理する。処理後泳動してカットされたベクターのみを切り出して回収する（切り出しから抽出、後処理に関してはインサート調製の項を参照）。泳動 切り出し・抽出をサボらないこと。切れた断片が残ったままライゲーションに用いるとベクターのセルフライゲーションが起りライゲーション効率に大きく影響する場合がある。なお 2 種類の制限酵素でカットする場合、BAP 処理は必ずしも必要ではない。

以上でベクターの調製終了

ライゲーション

竹島研では主に以下のキットを利用してライゲーションを行っている。

「TaKaRa Ligation Kit Ver.1 製品コード：6021」

このキットの使用に基づいたプロトコールについて記載する。

まずライゲーションに用いるインサートとベクターの比率を決定する。目安としてインサートとベクターのモル比が1:5程度にするのが目安とされるが、インサートやベクターの濃度が低い場合、吸光度測定では正確なDNA量が分からない場合がある。そのためできるだけサンプルの一部を流してバンドの太さを比較し、比率を決定した方が無難である。実際ライゲーションするに当たってはインサートとベクターの総体積が2~10 µl程度になるよう調製する。インサートとベクターのMixに体積で4倍量のA液と等量のB液を加える。なおB液には酵素であるDNAリガーゼが含まれるので扱いに注意する(失活に気をつける)。

16 で30分 incubation する。26 以上では環状DNAの生成効率が落ちるとの記述がある。そのため温度を上げないように注意する。なお incubation 時間は16時間くらいまで伸ばす場合もある。コロニーが生じにくい場合などはO/Nで反応させてもよい。以上でライゲーション終了

形質転換(トランスフォーメーション)

ライゲーション産物そのまま形質転換に利用できる。当研究室では以下のプロトコールで行っている。

ライゲーション産物：全体積の1/3~1/5程度・・・4 µl前後 10×CM：2 µl MQで総量が20 µlになるように調製する。最後にコンピテントセル(HB101使用)を20 µl加える。なおコンピテントセルは小分けしたものを用時溶解して用いる。溶かす際は氷上で溶かす。余った分は廃棄している。全て混ぜ終えたものを氷上で20分 incubation する。続いて室温(15~25)で10分 incubation する。

200 µlのLB(抗生物質を含む必要はない)を加え37 で30分~1時間 incubation する。なおLBにカビ等が発生していないか確認の上で用いること。

目的の抗生物質を含むLBプレートにスプレッターで塗布する。コロニーがどの程度生じるか予想がつかない場合は、プレートを2分して片方に180 µl、もう片方に30 µl塗布するようにする。

37 で12~16時間 incubation する。早い場合は10時間程度でコロニーが生じ始める。逆にコロニーが生じるのに時間がかかる場合もあるためコロニーが生じない場合は1日程度様子を見てよい(カビ等が発生するリスクも大きくなるが)。