

Vectorette PCR

- Template の環状化 ligation を要する inverse PCR と違い、高濃度で adapter ligation を行うので competent な template が効率よくでき、濃縮や精製をせずそのまま PCR にもっていけるという利点があります。
- 第一世代の GS 因子を想定したプロトコールです。他の因子に適用する場合は、それに応じてプライマー、制限酵素など検討してください。
- P 因子挿入点の決定の他、cDNA に対して同様の手順を行うと、misexpression system で発現された遺伝子の検出 (5' EST として) や、exon trap で生じた chimeric mRNA の検出に応用できます。
- 全般的に (特に nested PCR のとき)、増幅条件が過剰だと smear になりやすいです。そのようなときは、サイクル数を減らす、annealing 条件を厳しくする (場合によっては touch-down PCR)、template 量を減らす (希釈する) 等で対処してください。
- 引用の機会がありましたら、T. Lukacsovich et al. (2001) Genetics 157, 727-742、およびそのなかの該当部分で引用されている文献をご考慮ください。なお、クロンテックの Marathon cDNA kit と同様の原理ですので、詳しい原理的な情報は、その説明書を参照してください (<http://www.clontech.com/techinfo/manuals/PDF/PT1115-1.pdf>)。
- 正直なところ、5'側と 3'側とが両方そろって、きれいにうまくいくことはなかなかありません。まだ改良の余地があると思います。フィードバックをいただくと幸いです。また、ご不明の点がありましたら遠慮なくお尋ねください。

材料

ゲノム DNA

ハエ 10 匹から Rapid method (Tris/EDTA/SDS→熱処理→KOAc 塩析→ProOH ppt) で精製。終容量 50ul (1 匹/5 ul 相当、~0.2 ug/ul)。

Vectorette adapter/primers

Primers (各 10 pmol/ul)

TAP-1: 5' CAGGATATCGGCGACCACTAAGCG

TAP-2: 5' ACTAAGCGTCTACCGCTGAGATC

Adapter (100 pmol/ul)

5' CAGGATATCGGCGACCACTAAGCGTCTACCGCTGAGATCTCCCGACCA

3' (NH₂)GAGGGCTGGTGC(P)

それぞれのオリゴ DNA 鎖 (短鎖は 3'アミノ化、5'リン酸化) をオーダーして annealing。

Compatible ends: HpaII, TaqI, ClaI.

GS specific primers (各 10 pmol/ul)

GS5'-1: 5' AATAGGGAATTGGGAATTCGACTAGTT

GS5'-2: 5' GGAATTGGGAATTCGACTAGTTTCAT

GS3'-1: 5' TCTTGC GGCCGCGCTCGACCTG

GS3'-2: 5' CCGCGCTCGACCTGCAGCC

各種酵素・試薬類：お好みのもの

手順

1. ゲノム DNA 5ul を HpaII 1ul (~10U)、10 ul system で 37°C、1 時間消化。
2. 68°C、10 分で失活。
3. Digest 5ul と Adapter 1ul を T4 DNA ligase 1ul、20 ul system で 4°C、O/N、または r.t., 30 min (メーカーの推奨する条件ならなんでも可) 反応。
4. Ligation 産物 1ul を 50 ul system で primary PCR。
Primer (TAP-1 & GS5'-1 または、TAP-1 & GS3'-1)は、各 1 ul ずつ。
94°C, 2min → 25x(94°C, 15 sec → 60°C, 30 sec → 72°C, 2min) → 72°C, 2min → °C
5. PCR 産物 1ul を 50 ul system で nested PCR。
Primer (TAP-2 & GS5'-2 または、TAP-2 & GS3'-2)は、各 1 ul ずつ。
94°C, 2min → 20x(94°C, 15 sec → 60°C, 30 sec → 72°C, 2min) → 72°C, 2min → 4°C
6. PCR 産物を MicroSpin S-400 (Amersham)で精製 (脱プライマー) して Sequencing へ。

11/18/02

rev.3 12/20/02

Naoto JUNI

Vectorette PCRによるGS因子挿入点の決定

