

## インバースPCRによるP因子挿入位置の決定

BDGP (<http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html>) の方法に基づく

2001年3月1日 松林宏

### 1、ゲノムDNAの抽出

P因子の挿入した系統（ヘテロでもホモでもよい）メス1匹ないしはオス2匹をエッペンドルフチューブ内で50 $\mu$ lのTESバッファでイエローチップを用いて摺り潰す。サンプル毎にチップは必ず交換する。エッペン用のペッスルを用いる場合も必ずサンプル間でつかい回しをしない。70度30分処理後、7 $\mu$ lの8M K-Acetateを入れ混合し氷上で30分。4度で15krpm10分遠心し上清を新しいチューブに沈澱を取らないように注意し移す。0.6vol (34 $\mu$ l) のイソプロパノールを入れ良く混合し室温で5分放置後15krpm10分遠心し上清を除き沈澱を70%エタノールで洗う。風乾し7 $\mu$ lのRNase入りTEに溶解。この方法は他の用途、PCR、サザンハイブリ、 $\lambda$ によるゲノムライブラリー作成（SDSを除いたTESでホモジナイズした後にSDSを入れて、できるだけ高分子DNAが壊れない様にする）等ほとんどの用途に使える。スケールアップ可能。40匹位までなら500 $\mu$ lのTESでホモジナイズできる。

TES : 0.1M Tris-HCl (pH9.0), 0.1M EDTA, 1% SDS

### 2、制限酵素処理、ligation

3 $\mu$ lのHhaI =HinP1I（P因子により変える）およびバッファをあらかじめ混ぜた溶液を7 $\mu$ lのゲノム溶液に入れ、37度で2時間制限酵素処理（メス1匹分のDNAを10 $\mu$ lで切断）。酵素量は1サンプル当たり1Uも入れれば十分。70度15分処理し制限酵素活性を失活させる（HhaIの場合）。ここに40 $\mu$ lのあらかじめ調整したライゲーション溶液（最終1倍のバッファ、サンプル当たり30U/0.1 $\mu$ l、程度のT4 DNA ligase）を入れ16度で一晩 ligation（メス1匹分のDNAを50 $\mu$ lでligation）。

### 3、PCR

上記のligation溶液3 $\mu$ lを用い30 $\mu$ lの系で適当なプライマー対を用いPCRを行う。酵素はタカラExTaqを用いている。

例えばEP因子、pCaSpeRの5' ならHhaI処理、ligationしたサンプルを

Pwht1 (5' GTAACGCTAATCACTCCGAACAGGTCACA 3' ) および

Plac1 (5' CACCCAAGGCTCTGCTCCCACAAT 3' ) を用いて95度 30秒 / 62度 1分 / 72度 1分30秒 35サイクルでPCRを行う。

条件はプライマーにより変更する。上記の条件（アニーリング温度）はBDGPの物よりシビアだが非特異的産物を減らせる。

PCR終了後8 $\mu$ lを電気泳動し産物を確認する。通常一本のバンドが濃くでるはず。しかしバンドが見えない、または複数のバンドが出ることもあるが、その場合も次のシーケンスを行ってみる。通常このようなサンプルでも問題なくシーケンスできる。

### 4、シーケンス

上記のPCR溶液の残り20 $\mu$ lをエッペンチューブに移し12 $\mu$ lの PEG/NaCl（20% PEG6000、2.5M NaCl）を入れよく混合し室温で5分放置後、4度で15krpm、10分遠心し上清を除く。

70%エタノールで沈澱を洗い風乾。6 $\mu$ lのDWに溶解しこの5.5 $\mu$ lを用いてシーケンス。ABIのキットで通常の半分の系、4 $\mu$ lシーケンスプレミックス、0.5 $\mu$ lプライマー（1.8 $\mu$ mole）

および5.5  $\mu$  IDNA溶液。PCR条件は通常のシーケンスと全く同じ。反応終了後36  $\mu$  l 70%エタノールを入れ、遠心でフリーのddNTPを除き通常どおり泳動。泳動時間は（ABI310の場合）60分程度で十分。シーケンスプライマーはPCRとは別のnestedプライマーを使うことが肝心（非特異的産物が無ければPCRプライマーでもうまく行く時も有るが）。5'側のシーケンスには

PLWB3'（5' TTCCTCTCAACAAGCAAACG 3'）を用いている。

問題点としてHhaIサイト（GCGC）が挿入点近くに在るためゲノムのランキングな配列が短すぎblastに引っ掛かってこない事がまま在る。この場合HhaIでなくMspI、MboI等が使えるかも知れない。

ちなみに4の3/5volのPEG/NaCl（20% PEG6000、2.5M NaCl）による沈澱は他のPCR産物のダイレクトシーケンスの場合にも非常に有効。非特異的な産物が少なければゲルからの切り出しより遥かに手軽、またカラムのように金がかからない。

#### BDGPプロトコールより

type of P element	5' or 3' end	forward primer	reverse primer	annealing temperature
PZ P-element	5' end	Plac4	Plac1	60°
PZ P-element	3' end	Pry4	Pry1	55°
PZ P-element	3' end	Pry2	Pry1	60°
PlacW P-element	5' end	Plac4	Plac1	60°
PlacW P-element	3' end	Pry4	Plw3-1	55°
PlacW P-element	3' end	Pry2	Pry1	60°
PEP P-element	5' end	Pwht1	Plac1	60°
PEP P-element	3' end	Pry4	Pry1	55°
PEP P-element	3' end	Pry2	Pry1	60°