

分子クローニング

テクニカルガイド



NEB AR App
Owl Blinking



NEW ENGLAND
BioLabs[®] Japan Inc.

be INSPIRED
drive DISCOVERY
stay GENUINE

分子クローニング ー 過去、現在、そして未来へ

分子クローニングとは組換え DNA 分子の作成を指し、生命科学の進歩の礎となっている技術である。その発端は 1970 年代の制限酵素の発見、つまり DNA 分子を選択的かつ特異的に切断する酵素にあり、リガーゼの発見や PCR の開発によって、用途と精巧さの両面において飛躍的な成長を遂げている。現在では遺伝子のクローニングは非常に簡単かつ効率的に行えるようになり、リガーゼを使った基本的なクローニング (Traditional Cloning) だけでなく、相同配列を使用した DNA アッセンブル (DNA Assembly: NEBuilder®)、それに異なるプラスミド間で簡単に遺伝子をスワップできる方法 (DNA Assembly: Golden Gate) などの次世代型クローニング (Seamless Cloning) も簡便かつ効率的な方法となっている。特に後者は合成生物学に該当する技術であるが、*in silico* で設計したあらゆる DNA コンストラクトを *in vitro* で化学合成できることを意味すると共に、DNA クローンの構築と組換えが迅速になり、遺伝子治療ベクターや組換えタンパク質生産プロセス、新しいワクチンの開発などに応用されている。

基本的なクローニングワークフロー

分子クローニングとは組換え DNA の作成を指すことを先述したが、得られたクローンは遺伝子配列の解析やその遺伝子がコードするタンパク質の発現、そのタンパク質の機能解析などに使用できる。またクローンに変異を導入することで、その遺伝子とタンパク質の機能解析にも応用できる。最も基本的なクローニングのワークフローとしては以下 4 ステップになる。

1. 対象 DNA を単離する
2. 対象 DNA (インサート) をクローニングベクターに挿入し、リコンビナント分子 (プラスミド) を作成する
3. リコンビナントプラスミドを増幅ホスト (主に大腸菌) に形質転換する
4. 目的のリコンビナントプラスミドを持つホストをスクリーニング/セレクションする

それぞれの方法は 1960 年後半から 1970 年前半に開発され、その後の組み合わせと最適化によりこのようなワークフローが完成したのである (次項: クローニングの歴史を参照)。特に 2 の工程では様々な方法が編み出させているが、4 および 5 ページにて比較紹介をする。

目次

はじめに

- 2 クローニングの概要
- 4 クローニング・ワークフロー
- 8 クローニングのヒント
- 9 オンラインツール

Traditional Cloning

- 10 クイックガイド (Traditional Cloning)
- 12 核酸精製
- 16 DNA 増幅 (PCR)
- 18 cDNA 合成
- 20 DNA 切断
- 26 末端修飾
- 28 ライゲーション
- 30 形質転換
- 32 確認

DNA Assembly (Seamless Cloning)

- 34 DNA Assembly 概要
- 36 NEBuilder Assembly
- 38 Golden Gate Assembly

付録

- 40 トラブルシューティングガイド
- 43 DNA 定量
- 50 オーダーインフォメーション



www.neb.jp/re/Cloning



- ・ クローニングの概要とワークフロー
- ・ 様々なクローニング方法の説明
- ・ Traditional Cloning と DNA Assembly の各ステップの詳細を説明
- ・ 技術資料、動画など満載
- ・ 熟練した NEB テクニカルサポートが研究を支援

※左画面は英語版だが日本語版も公開

クローニングと合成生物学

Clone with Confidence

クローニングにおいては、対象 DNA とベクターの準備に加えて、これらの DNA の連結が重要である。この連結方法に基づいて様々なクローニング方法が考案されているが、NEB では大きく 2 つに分けている。

- 1) Traditional Cloning
- 2) DNA Assembly (Seamless Cloning)

Traditional Cloning は最も一般的に採用されている方法であり、その DNA 連結は T4 DNA Ligase によって行われる。DNA Assembly は様々な連結酵素（複数のこともある）を使用した比較的新しい方法である。これらのクローニング方法により既存の遺伝子の解析だけではなく、それを人為的に設計・操作・改変・作成することで、より深く生命現象への理解を深めたり、有用物質やエネルギーの生産、廃棄物処理、疾病診断・治療など、実に様々な分野に応用がされており、そのための学問領域が合成生物学と呼称されている。この合成生物学は特に DNA Assembly の発明により飛躍的進歩を遂げたのである。

NEB からは Traditional Cloning と DNA Assembly の各ステップに関する個々の酵素から、ワークフロー全体をカバーできる製品を提供している。1970 年代に NEB が設立されて以降、NEB は分子クローニング技術の発展を支える一幹であり続け、ともに成長をしてきた。これは絶え間ない基礎研究と製品開発、品質管理に裏付けされたものであり、本誌を読めば Clone with Confidence の意味がご理解いただけるだろう。

クローニングの歴史

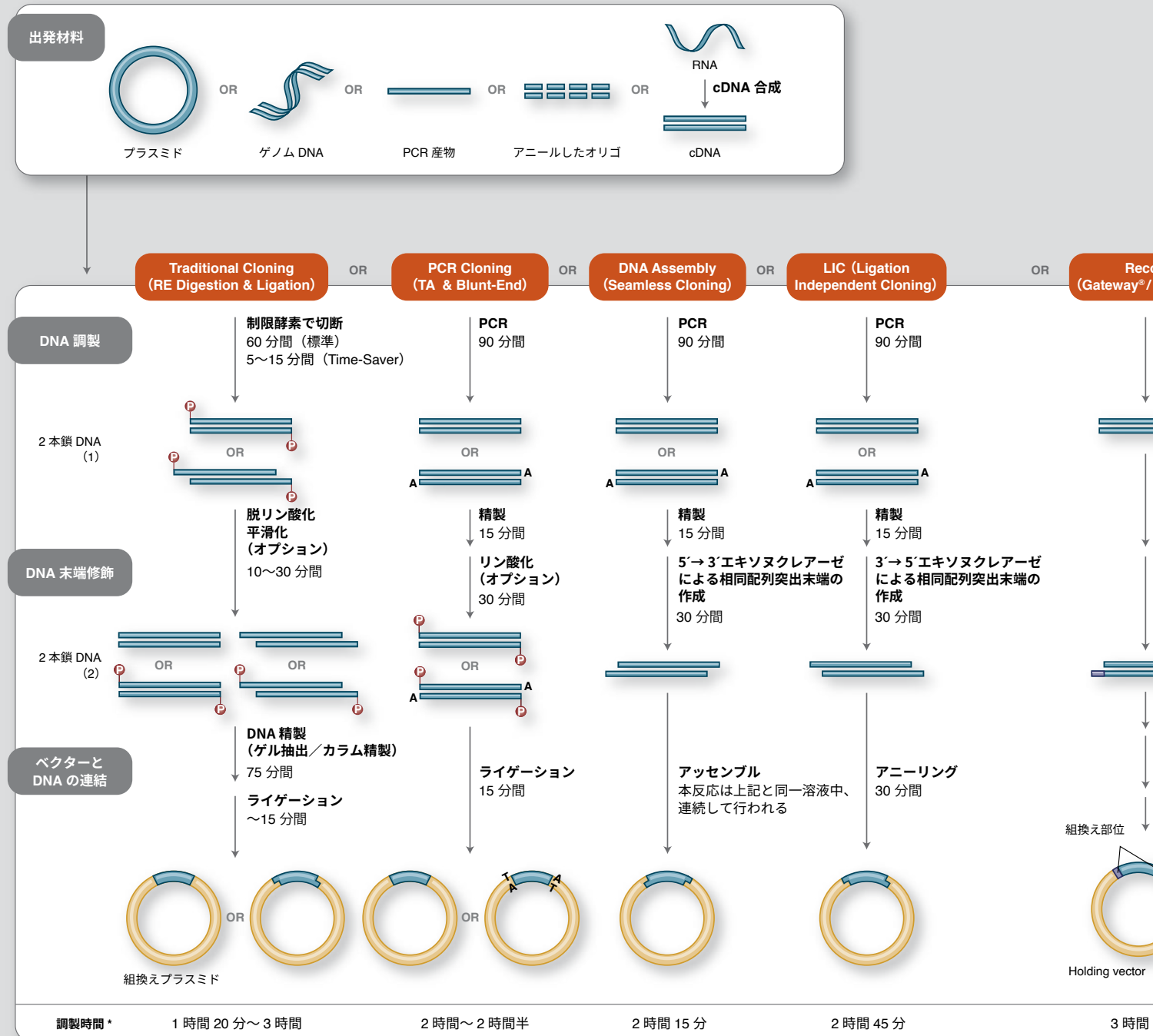




主なクローニングワークフロー

ここでは主に使われている5種類のクローニング方法を図解する。本誌では1つ目の Traditional Cloning (RE Digestion & Ligation) と2つ目の PCR クローニング (TA & Blunt-End) を広義に Traditional Cloning として扱う。

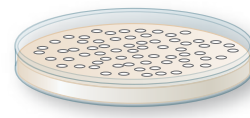
目的 DNA (インサート) の調製



* 出発材料がプラスミドで、その中の DNA を他のベクターにクローニングするときの調製時間を記す。出発材料がゲノム DNA の場合、2 時間が加算される。この調製時間には形質転換は含まれていない

** 翌日に 70 分間の組換え反応を行う

形質転換

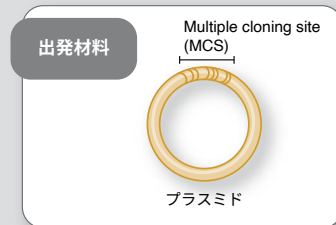




各ステップの説明 & プロトコール

- 12 核酸精製
- 16 DNA 増幅 (PCR)
- 18 cDNA 合成
- 20 DNA 切断
- 26 末端処理
- 28 ライゲーション
- 30 形質転換
- 32 確認
- 34 DNA Assembly

ベクターの調製



Combinational Creator / Univector)

PCR
90 分間

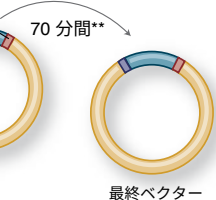
精製
15 分間

制限酵素切断
60 分間 (標準)
5~15 分間 (Time-Saver)

精製
15 分間

部位特異的組換え反応
60 分間

Proteinase K 処理
10 分間



15 分 ~ 5 時間 20 分

制限酵素での切断

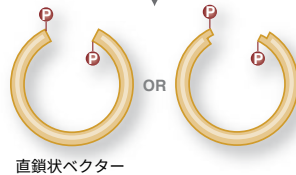
OR

PCR

ベクターの直鎖状化

制限酵素で切断
60 分間 (標準)
5~15 分間 (Time-Saver)

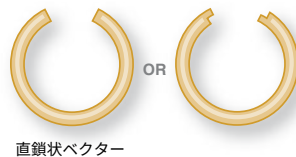
PCR
2 時間
精製
15 分間



DNA 末端修飾

脱リン酸化 (オプション)
10~30 分間
精製 15 分間 または
ゲル抽出 & カラム精製 75 分間

T 付加
1.5 時間



調製時間 20 分 ~ 2 時間 25 分

3 時間 45 分

プラスミド精製

確認



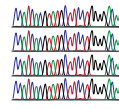
制限酵素切断パターン

OR



コロニー PCR

OR



シーケンス

タンパク質発現

遺伝子機能検証

部位特異的
変異導入



NEB の主なクローニング・ワークフロー

一般的な 5 種類のクローニング方法のうち（前項参照）、NEB では Traditional Cloning と DNA Assembly（Seamless Cloning）を主として用いている。ここでは

Traditional Cloning

Nucleic acid purification



核酸精製

材料となる DNA を精製する。ベクターのミニプレップ、PCR のテンプレートに使うゲノム DNA、PCR 産物などが含まれる。フェノール/クロロホルム精製やアルカリプレップ法、ビーズ法など様々な方法があるが、NEB ではカラム精製を推奨している。

➡ Monarch カラム精製（P. 12 ～ 15）

PCR / amplification



DNA 増幅 (PCR)

目的 DNA を増幅する。プライマーには特異的配列に加えて制限サイトと足場配列（ランダムな 6 塩基）を付加したものを使用する。増幅時のエラーを防止するため、校正機能がある高正確性ポリメラーゼを使用するとよい。

➡ Q5 DNA Polymerase（P. 16 ～ 19）

Restriction enzyme digestion



DNA 切断

ベクターおよび PCR 産物を制限酵素で切断する。方向性の維持と効率的なライゲーションのため、異なる末端を生じる 2 種類の制限酵素を用いるのがよい。

➡ 新・制限酵素の基礎知識

➡ NEB 制限酵素（P. 20 ～ 25）

End modification



必要に応じて末端修飾とはインサートの 5' ターの脱リン酸化、イベクターの平滑化をこ

➡ NEB 修飾酵素（P. 26）

DNA Assembly

Nucleic acid purification



核酸精製

上記フローと同様、材料となる DNA を精製する。ベクターのミニプレップ、PCR のテンプレートに使うゲノム DNA、PCR 産物などが含まれる。詳細は各アッセンブルキットのマニュアルを参照する。

➡ Monarch カラム精製（P. 12 ～ 15）

DNA Preparation



DNA 準備

DNA Assembly においては、その方法によってインサート DNA とベクターの準備方法が異なる。例えば NEBuilder の場合、ベクターとの相同配列を付加したプライマーでインサート DNA を増幅する。各キットのマニュアルなどを参考にして、推奨方法で DNA を準備する。

➡ DNA 増幅 & 切断（P. 16 ～ 25）

Assembly



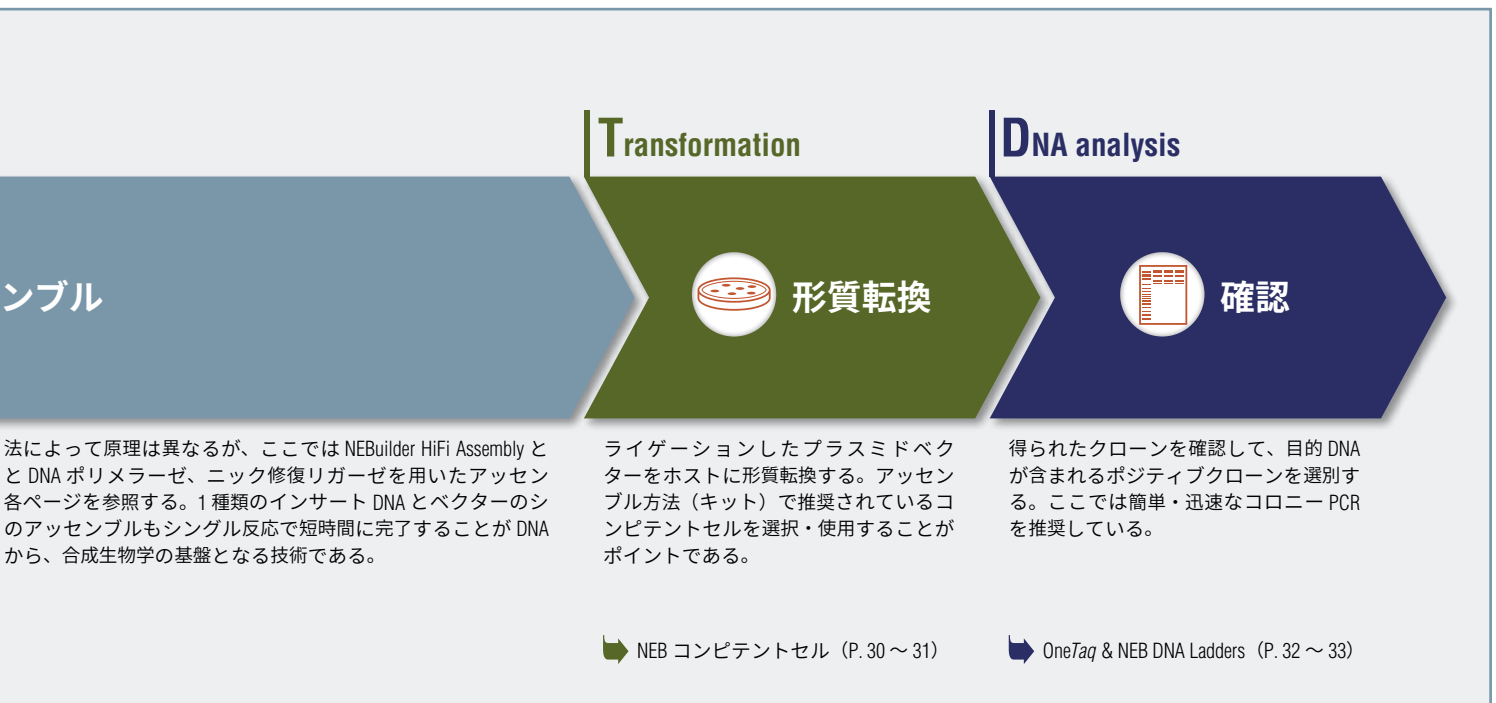
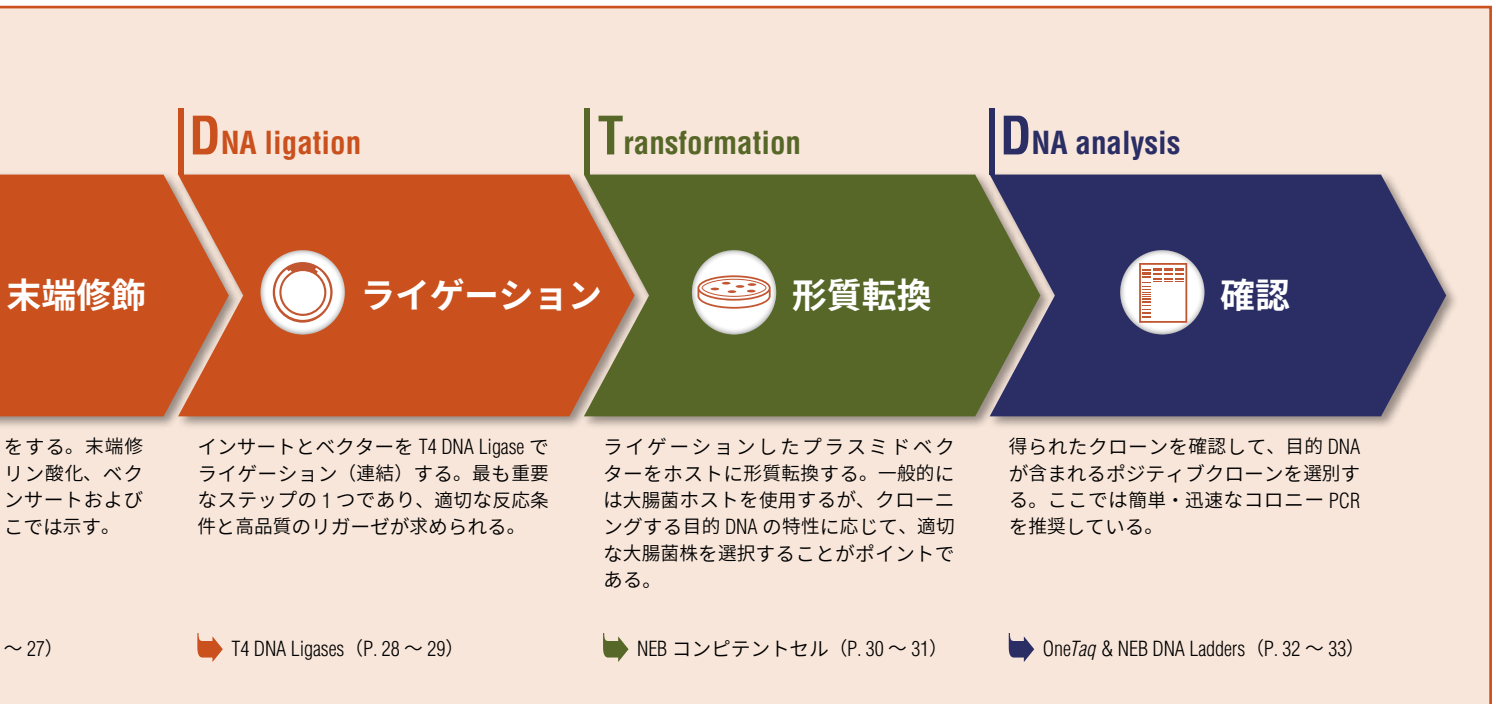
アッセ

目的 DNA（インサート DNA）とベクターを連結する。アッセンブル方法 Golden Gate Assembly を取り上げて紹介する。前者はエキソヌクレアーゼブル方法、後者は Type IIS 制限酵素と T4 DNA Ligase を用いた方法であり、ンプルなアッセンブルはもちろん、複数のインサート DNA とベクター Assembly の特長である。さらに自由度が高くアッセンブルできること

➡ DNA Assembly（P. 34 ～ 39）



それぞれの実験的ワークフローを図解すると共に、各ステップの説明を記す。個々のステップの詳細は記載されているページを参照する。





クローニングを始める前に：効率向上のためのヒント

ここではどのようなクローニング方法においても重要な効率向上のためのヒントを示す。

1. しっかりと事前に計画を練る

材料のインサート DNA とベクターから目的クローンを得るための計画をする。特にインサートとベクターの連結部分、つまり末端形状に注意して制限サイトの選定、プライマー設計をする (NEBcutter.neb.com を推奨)。タンパク質発現を最終目的とする場合はコドンフレームにも注意する。ホストの薬剤感受性とベクターの薬剤マーカーも十分確認しておく。

2. DNA 精製と使用量

使用する DNA を十分に精製し、ヌクレアーゼや非特異的酵素活性が混入していないことを確認する。一般的には市販されている DNA 精製スピカラム (NEB #T1030S) を用いる。精製途中で使用したフェノール、クロロホルム、エタノールなどが残存しないように注意する。また制限反応や PCR の障害を防ぐため、塩を含まないバッファー中に DNA を保存する。各反応によって使用する DNA 量が異なるため、適切な DNA 量を確認する。制限反応の場合は 0.2 ~ 1.0 µg であり、PCR の場合には数 ng で十分である。

3. 制限酵素による DNA 切断

下流の実験に合わせて反応容量を設定する。例えば電気泳動解析を行う場合にはアプライ量を基準に設定する。多くのクローニングにおいては 20 ~ 50 µl を使用する。反応に使用する制限酵素は全容量の 10% 以下とし、スター活性を防ぐためにグリセロール濃度が 5% 以下となるようにする。また PCR 産物はできる限り精製をしてから切断をする。

4. 末端処理

制限処理した DNA 末端には 5' リン酸、3' OH 基が付加されているため、そのままライゲーションに使用できる。ただし末端形状があっていない場合には平滑化などを行う必要がある。

Taq DNA Polymerase (NEB #M0273) の PCR 産物は 3' A である。Q5 DNA Polymerase (NEB #M0491) のような高正確性ポリメラーゼの PCR 産物は平滑末端を生じる。ポリメラーゼによって産物の形状が異なることに留意する。一般的に市販されているプライマーはリン酸化されていないため、PCR 産物は 5' リン酸化されない。脱リン酸化したベクターにライゲーションする場合、5' リン酸化プライマーを用いて PCR を行うか、Kinase で PCR 産物をリン酸化する必要がある。

5. ライゲーション前の DNA 精製

ベクターおよびインサートを電気泳動あるいはカラムで精製する。この操作により未切断のベクターや非特異的 PCR 産物などを取り除き、ライゲーション効率が向上できる。

まず切断した DNA をアガロースゲルで確認する。もし切断 DNA がシングルバンドを示すようであれば、カラム精製を行う。複数のバンドを示すのであれば、モナーク・ゲル抽出キット (NEB #T1020) や β-Agarase I (NEB #M0392) を使用してゲルを切り出して精製を行う。この際、長波長 (365 nm) の紫外線を使用して DNA 分解を最小限に留める。

6. DNA 定量

下流の実験に最適な DNA 量を使用するため、電気泳動か吸光度系 (NanoSpec® など) にて定量を行う。43 ~ 49 ページの DNA 定量 (核酸濃度、純度測定) を参照する。

7. ライゲーション

使用するリガーゼのガイドラインに従って反応を行う。もしインサート：ベクター = 3 : 1 のモル比が推奨されている場合、これを用いるとよい。これはモル比であって質量比でないことに注意する。オンラインツール：NEBioCalculator を使用して計算するとよい。通常のクローニングでは短時間でライゲーション反応が進行するが、ライブラリー作製などでは反応時間を延長する。

8. コンピテントセル

自作のコンピテントセルは市販されているものよりも形質転換効率が低いことが多い。市販されているコンピテントセルを使用することで、結果として時間短縮、サンプルロスの回避、成功率向上が可能となる。

9. 確認

コロニー PCR を行う場合、クールドサンプルに適した PCR ポリメラーゼを使用する。



オンラインツール

ウェブサイト上の「NEB ツール」より各種オンラインツールが利用できる (www.neb.com/nebtools)。

NEBioCalculator



DNA および RNA の濃度を簡単に計算できる。質量からモルへの変換や、 A_{260} 吸光度からの核酸濃度変換、さらにリアルタイム PCR 用の検量線作成や濃度計算ができる。

PCR Selector



目的の PCR に最適なポリメラーゼを検索できる。増幅領域の長さ、複雑性、GC 含量やシングルコピー中の存在から目的に合致したポリメラーゼが選択できる。

Enzyme Finder



制限酵素の名称や認識配列、オーバーハングや特長から制限酵素を検索できる。配列を入力することで目的に適した制限酵素を簡単に検索することができる。

Double Digest Finder



ダブルダイジェストを行う際の最適バッファーと推奨反応条件を簡単に検索できる。最適バッファーを使用することにより、スター活性やサンプルの分解を防ぐことが可能である。

Competitor Cross-Reference Tool



市販試薬の NEB 同等品を検索するためのツールである。製品名や製品番号を選択して簡単に検索できる。

NEBuilder Assembly Tool



NEBuilder HiFi Assembly および Gibson Assembly を行うためのプライマー設計ツールである。アッセンブルしたい配列と使用するポリメラーゼを入力することで、最適なプライマーがデザインできる。

NEBeta (Ligase Fidelity Tools)



Golden Gate Assembly の使用を前提としたリガーゼと各末端形状 & 配列の正確性解析ツール。正確性を可視化 (Ligase Fidelity Viewer)、そのデータに基づいて推奨結合部を提案 (GetSet)、アッセンブル配列をデザインできる (SplitSet)。

DNA Sequences and Maps Tool



NEB のベクターの他、プラスミド、ウイルスおよびバクテリオファージベクターなどの一般的に使用される DNA の配列と地図が掲載されている。

Tm Calculator



プライマー配列、濃度、それに使用する PCR 酵素を入力することで、簡単に Tm 値およびアニーリング温度を求めることができる。

NEBcutter v3.0



調べたい DNA 配列をペーストまたはインポートして制限部位を表示、検索できる。Type II あるいは Type III 酵素を選択することで絞り込み検索も可能である。さらに各酵素の制限部位数やメチル化感受性情報も表示できる。

REBASE



制限酵素データベースである。REBASE (Restriction Enzyme DataBASE) には全ての制限酵素および関連するタンパク質の情報が集約されている。

NEBaseChanger



Q5 Site – Directed Mutagenesis Kit (E0554) を使用して変異導入を行う際のプライマーの設計を行うためのツールである。アニーリング温度の最適条件の検索も可能である。

NEB Golden Gate Assembly Tool



Golden Gate Assembly のプライマーとコンストラクトを設計ツール。使用する Type IIS 制限酵素とオーバーラップを選択して簡単に設計できる。

NEBcloner



目的に合致したクローニング各ステップ (DNA 切断、末端修飾、ライゲーション、形質転換) のプロトコールおよび推奨製品を検索できる。

モバイルアプリ



iPhone®、iPad® または Android™ 用 NEB アプリ

最も人気があるオンラインツールは iPhone、iPad または Android でも使用することができる。



クイックガイド (Traditional Cloning)

インサートおよびベクターの調製

インサートを別のプラスミドから調製する場合

- 目的 DNA を切り出すための適切な制限酵素を使用する。ベクターと末端形状があていれば、切り出した DNA をそのままライゲーションに使用できる。

インサートを PCR で調製する場合

- 目的 DNA の両末端に適切な制限サイトと足場配列を加えてプライマーを設計する。
- 足場配列はランダムな 6 塩基
- PCR 酵素は校正機能が高いものがよい (Q5 High Fidelity DNA Polymerase、NEB #M0491)。
- PCR 条件と最適化は 17 ページを参照。
- PCR 産物はアガロースゲル電気泳動からのゲル抽出、もしくはカラムで精製する (15 ページ参照)。
- 精製した PCR を用いて以下のように切断する (末端処理)。

DNA 切断プロトコール (標準制限酵素)

DNA	1 µg
10X NEBuffer	5 µl (1X)
制限酵素	1 µl (あるいは 10 units)
ヌクレアーゼフリー水	to 50 µl
反応時間	1 時間 *
反応温度	酵素の推奨温度

* Time-Saver 酵素であれば時間短縮が可能

DNA 切断プロトコール (Time-Saver 制限酵素)

DNA	1 µg
10X NEBuffer	5 µl (1X)
制限酵素 (Time-Saver 酵素)	1 µl
ヌクレアーゼフリー水	to 50 µl
反応時間	5 ~ 15 分間 *
反応温度	酵素の推奨温度

* オーバーナイト反応しても問題なし (スター活性を生じない)

インサートを合成オリゴのアニーリングで調製する場合

- 特に短い DNA を挿入する場合に効果的である (プロモーターやポリリンカーなど)。
- 適切な 5' あるいは 3' 突出末端を持つように設計すれば、アニーリング後にそのままライゲーションに使用できる。
- 5' リン酸オリゴとして合成するのがよいが、合成後でも T4 Polynucleotide Kinase (NEB #M0201) でリン酸化できる。

標準アニーリング反応

オリゴ 1	20 µM (終濃度)
オリゴ 2	20 µM (終濃度)
10X NEBuffer r2.1	5 µl
ヌクレアーゼフリー水	to 50 µl
反応	95°C で 5 分間、その後ゆっくりと室温にする

ベクター

- 適切な制限酵素で切断して直鎖状にする。2 種類の制限酵素を使うことでセルフアニーリングを予防できる。

脱リン酸化

- 必ずしも必要ないが、ベクターを脱リン酸化することでセルフアニーリングを完全に抑制できる。
- Quick CIP (NEB #M0525) は熱失活できるため、脱リン酸化後の精製は必要なく便利である。また、制限酵素バッファー: NEBuffer 中で使用できるため、制限反応に対添加するだけでよい。

Quick CIP による DNA の 5' 末端の脱リン酸化

DNA	1 pmol of DNA ends
10X rCutSmart Buffer*	2 µl
Quick CIP	1 µl
ヌクレアーゼフリー水	to 20 µl
反応	37°C で 10 分間
熱失活	80°C で 2 分間

* 他の NEBuffer も使用可能

平滑化

- 平滑末端が必要な場合、インサートとベクターを平滑化する。
- 校正機能を有する PCR 酵素 (Q5 など) を使用する場合、その産物は平滑末端であるため、平滑化は必要ない。
- T4 DNA Polymerase (NEB #M0203) あるいは Klenow (NEB #M0210) で平滑化できる (5' 突出の埋め込み、3' 突出の除去)。
- Quick Blunting Kit (NEB #E1201) で平滑化と 5' リン酸化が 30 分以内にできる。
- アガロースゲル電気泳動をする際、紫外線による DNA ダメージを最小限にするため、できる限り長波長 (365 nm など) を用いる。

平滑化プロトコール (Quick Blunting Kit)

DNA	Up to 5 µg
Blunting Buffer	2.5 µl
dNTP Mix (1 mM)	2.5 µl
Blunt Enzyme Mix	1 µl
ヌクレアーゼフリー水	to 25 µl
反応	室温で 15 分間 (制限酵素切断 DNA)、または室温で 30 分間 (PCR 産物) *
熱失活	70°C で 10 分間

* PCR 産物の場合、必ず精製してから平滑化を行う



リン酸化

- ライゲーションのためには少なくとも一方の DNA 末端（ベクターもしくはインサート）が 5' リン酸化されている必要がある。
- プライマーは通常リン酸化されていない。そのため PCR 産物は 5' リン酸化されていないので、ベクターを脱リン酸化する場合はリン酸化プライマーを注文するとよい。
- 制限処理した DNA は 5' リン酸化されている。
- PCR 産物や DNA 断片は T4 Polynucleotide Kinase (NEB #M0201) でリン酸化できる。

T4 PNK によるリン酸化反応

DNA (20 mer)	up to 300 pmol of 5' termini
10x T4 PNK Buffer	5 µl
10 mM ATP	5 µl (1 mM 終濃度)
T4 PNK	1 µl (10 units)
ヌクレアーゼフリー水	to 50 µl
反応	37°C で 30 分間

ベクターおよびインサートの精製

- ベクターおよびインサートを電気泳動で確認し、切れ残りや非特異的バンドが無い場合、スピнкаラムで精製する (NEB #T1030)。
- 切れ残りや非特異的バンドがある場合、アガロースゲルからの DNA 抽出キット (NEB #T1020) や、LMP アガロースと β-Agarase I (NEB #M0392) を使用して精製する。
- ゲルの観察や切り出しを行う際、DNA の分解を防ぐために長波長 (365 nm など) の紫外線を使用する。

ベクターとインサートのライゲーション

- ベクター：インサート = 1 : 3 のモル比を基準とする。
- T4 DNA Ligase (NEB #M0202) あるいは Quick Ligation Kit (NEB #M2200) を使用する場合、室温で完全にライゲーションバッファーを融解してから使用する。Ligase Master Mix は保存温度下で溶液であるため、融解の必要はない。
- Quick Ligation Kit (NEB #M2200) は突出末端および平滑末端のライゲーションに適している。
- Instant Sticky-end Ligase Master Mix (NEB #M0370) は突出末端のライゲーションに特化しており、インキュベーションは不要である。
- Blunt/TA Ligase Master Mix (NEB #M0367) は平滑末端 /TA のライゲーションに特化したリガーゼ・ミックスであり、特別な配合によりライゲーション効率を飛躍的に向上している。
- ライゲーション後は速やかに氷上に移して形質転換を行う。
- Quick Ligation Kit および Ligase Master Mix を使用した場合、熱による不活性化は形質転換効率を低下させる恐れがあるため、これを控える。
- エレクトロポレーションを行う場合、精製作業は一切不要、ライゲーション産物をそのままエレクトロポレーションできる ElectroLigase (NEB #M0369) を推奨する。

Quick Ligation Kit によるライゲーション反応

ベクター DNA (3 kb)	50 ng
インサート DNA (1 kb)	50 ng
2X Quick Ligation Buffer	10 µl
Quick T4 DNA Ligase	1 µl
ヌクレアーゼフリー水	全容量が 20 µl となるように加える
反応	室温で 5 分間

Instant Sticky-end Ligase Master Mix によるライゲーション反応

ベクター DNA (3 kb)	50 ng
インサート DNA (1 kb)	50 ng
Master Mix	5 µl
ヌクレアーゼフリー水	全容量が 10 µl となるように加える
反応	不要

Blunt/TA Ligase Master Mix によるライゲーション反応

ベクター DNA (3 kb)	50 ng
インサート DNA (1 kb)	50 ng
Master Mix	5 µl
ヌクレアーゼフリー水	全容量が 10 µl となるように加える
反応	室温で 15 分間

形質転換

- NEB Turbo Competent *E. coli* (NEB #C2984) を使用すれば 8 時間でコロニーが得られる。
- 相同組換えを低減するためには *RecA*⁻ 株である NEB 5-alpha (NEB #C2987) もしくは NEB 10-beta Competent *E. coli* (NEB #C3019) を使用する。
- 5 kb 以上のプラスミドのクローニングには NEB 10-beta Competent *E. coli* (NEB #C3019) を推奨する。
- エレクトロポレーションを行う場合、NEB 5-alpha Electrocompetent *E. coli* (NEB #C2989) あるいは NEB 10-beta Electrocompetent *E. coli* (NEB #C3020) を使用する。
- プレーティング前に培地を予め培養温度に温めておく。
- 適切なコロニーを得るため、SOC で 10 倍ずつの希釈系列をプレーティングする。

NEB 5-alpha Competent *E. coli* による形質転換

DNA	DNA 1 ~ 5 µl (1 pg ~ 100 ng プラスミド DNA 含む)
コンピテントセル	50 µl
反応	氷上で 30 分間
ヒートショック	42°C で 30 秒間
反応 (Outgrowth)	氷上で 5 分間 950 µl の室温 SOC を添加 37°C で 60 分間の振とう培養



核酸精製

クローニングにおいては、高純度の DNA (および RNA) を使用することが最重要事項の1つである。ケースとしては、細胞や組織からのゲノム DNA 抽出、大腸菌からのプラスミド精製、反応溶液中の DNA 精製 (PCR やライゲーションなど)、アガロースゲルからの DNA 抽出が挙げられる。それぞれに最適な DNA 精製方法があるが、スピンカラムタイプの Monarch 核酸精製キットは包括的に使用できるキットである。以下表を参考にして Monarch キットを選択するとよい。

Monarch 核酸精製キット

製品	アプリケーション	特長
Monarch Genomic DNA Purification Kit (NEB #T3010)	細胞、血液、組織などからのゲノム DNA 抽出および精製	- 幅広いサンプルに対応 - 難しいサンプルでも高収量 (脳や筋組織など) > 50 kb のゲノム DNA を精製 - 残存 RNA が最小限 (< 1%) - 粗精製ゲノム DNA の完全精製も可能
Monarch Plasmid Miniprep Kit (NEB #T1010)	大腸菌からのプラスミド精製 (~20 µg)	- 最小 30 µl で溶出 - カラムデザインの最適化により液残りを防止 - 色付けされたバッファーにより精製ステップの間違い防止 - バッファーに RNase A が添加済
Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (NEB #T1030)	酵素反応溶液から DNA をクリーンアップ (~5 µg)	- 最小 6 µl で溶出 - カラムデザインの最適化により液残りを防止 - オリゴや小分子 DNA もクリーンアップ可能 (オプションプロトコール)
Monarch DNA Gel Extraction Kit (NEB #T1020)	アガロースゲルからの DNA 精製 (バンド切り出し)	- 最小 6 µl で溶出 - カラムデザインの最適化により液残りを防止
Monarch Total RNA Miniprep Kit (NEB #T2010)	血液、細胞、組織、植物、バクテリアなど様々なサンプルからのトータル RNA 精製 (~100 µg)	- 全 RNA を精製可能、オプションプロトコールにより miRNA や small RNA (> 20 nt) も精製 - DNase I、gDNA 除去カラム、Proteinase K、RNA 安定化剤が付属 - RNA 分画や粗精製 RNA のクリーンアップも可能
Monarch RNA Cleanup Kits (NEB #T2030, T2040, T2050)	RNA のクリーンアップと濃縮 - RNA 抽出溶液 (TRIzol 抽出など) <i>in vitro</i> transcription 反応産物 - 酵素反応後の RNA - ゲル電気泳動	5 分間でクリーンアップ完了 - RNA 量に応じた 3 種類のキット - 夾雑物の残存がほぼゼロ - NTPs も除去

最適化のヒント

DNA 精製

- カラム洗浄ではカラム先端を素通り画分に触れないこと。もし触れたらもう一度クイックスピンをする。
- > 10 kb の DNA を精製する場合、50°C に温めた溶出液を使用するとよい。分子量が大きい DNA は強くカラムに結合しているためである。

プラスミド・ミニプレップ

- 大腸菌を使いすぎない (OD < 15 にする)：少なめの方が溶菌度が高くカラムのつまりを予防でき、結果として純度が高いプラスミドが精製できる。
- 完全に溶菌する：プラスミド回収率を最大限にするため、大腸菌を完全に懸濁、推奨温度で溶菌する。
- 溶菌後はボルテックスをしない：ボルテックスをするとゲノム DNA が断片化、それが夾雑する。
- RNase 処理をしっかりと行う：RNA 処理ステップをスキップしたり時間を短くしない。
- 洗浄をしっかりと行う：洗浄回数に注意する。洗浄工程で細胞夾雑物、エンドトキシン、塩が除去される。

ゲノム DNA 抽出 & 精製

- サンプルをカラムにリロードしない (アプライ回数は 1 回だけ)：2 回以上のサンプル (溶解液) のロードによりメンブレンが剥離する危険がある。
- サンプル量は推奨範囲内：多く入れすぎると溶解がしにくく、カラムが詰まって収量と純度が低下する。
- サンプルの破碎・溶解：はじめにしっかりとサンプルを破碎・ホモジェナイズしておく。

ゲル抽出 (バンド切り出し)

- ゲルカットは最小限にする：大きく切りすぎるとゲルの溶解残りやゲル成分の夾雑リスクが高くなる。
- UV 観察は手早く：ゲル観察・切り出し時の UV は DNA を損傷するため、短時間にする。またできる限り長波長を使用するとよい。
- ゲルを完全に溶解する：DNA はゲルの内側にあることが多いので、しっかりと溶解する。

RNA 抽出 & 精製

- サンプル中の RNase を失活させる：サンプル採取中・後にもその中の RNase が働くため、失活が必要不可欠である。採取は手短に行う。液体窒素での瞬間冷却や、RNA 保護液なども効果的である。
- サンプル量は推奨範囲内：多く入れすぎると溶解がしにくく、カラムが詰まって収量と純度が低下する。
- サンプルの破碎・溶解：はじめにしっかりとサンプルを破碎・ホモジェナイズしておく。





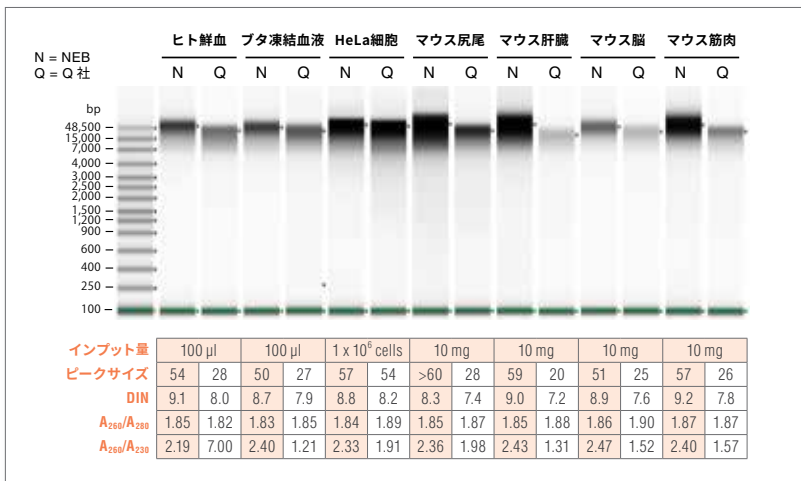
ゲノム精製：Monarch Genomic DNA Purification Kit

クローニングにおいて、目的 DNA をゲノム DNA (gDNA) から PCR で増幅・単離することは多い。この時、PCR を成功させるためには精製度が高いゲノムをテンプレートとすることが重要である。

モナーク・ゲノム DNA 精製キットは幅広いサンプルから高収量でゲノム DNA を精製するためのキットである。動物培養細胞、血液、哺乳類組織など様々な生物学的試料から、ピークサイズが 50 kb 以上の長い DNA を精製する。また残存 RNA も最小限にできる。さらに、オプションプロトコール（前処理）を行うことにより、破碎が困難な細菌や酵母細胞からも gDNA を精製することができる。

臨牀的に重要な唾液や口腔スワブからの gDNA 精製や、フェノール/クロロホルム抽出など抽出済 gDNA のクリーンアップ方法などのオプションプロトコールも用意されている。クローニングのための PCR はもちろん、qPCR、次世代シーケンス (NGS) 用ライブラリー調製などのテンプレートゲノム調製に最適である。

幅広いサンプルで高収量かつ長い gDNA の精製が可能



Agilent Technologies® 4200 TapeStation Genomic DNA ScreenTape により、各サンプルから Monarch Genomic DNA Purification Kit と Q 社キットを使って精製した gDNA を測定した。溶出は 100 µl で行い、100 倍希釈した精製 DNA を測定に用いた。モナークで精製した gDNA のピークサイズは 50 ~ 70 kb で、DIN = 9 前後であったが、Q 社キットで精製した gDNA はおよそ < 30 kb、DIN = 7 ~ 8 であった。また、Q 社キットでは凍結血液サンプル、肝臓、脳、筋肉において収量と A_{260/230} が低かった。

ゲノム DNA 抽出・精製ワークフロー



* 組織サンプルでは Proteinase K 処理後に添加
† 線維性組織におけるデブリス除去のステップも含む

推奨製品

Monarch Genomic DNA Purification Kit (NEB #T3010)

特長

- 幅広いサンプルに対応（ウェブサイト参照）
- 難しいサンプルでも高収量（脳や筋組織など）
- 残存 RNA が最小限（< 1%）の gDNA 精製
- 精製 DNA のピークサイズは > 50 kb、ロングリードシーケンスに最適
- 抽出済の gDNA のクリーンアップも可能
- 迅速なプロトコール、効率的な溶解ステップ、最小限のハンズオン
- NGS ライブラリー調製、PCR、qPCR などに最適
- カラム、バッファーの個別購入が可能

特性

- 推奨サンプル量：サンプルによる（ウェブサイト参照）
- DNA 結合能：30 µg gDNA
- ゲノムサイズ：ピークサイズは > 50 kb（唾液や口腔粘膜スワブからの精製 gDNA はやや小さくなる）
- 溶出量：≥ 35 µl（100 µl を推奨）
- 純度：A_{260/280} ≥ 1.8、A_{260/230} ≥ 2.0
- RNA 含有量：< 1%（RNase A 処理ステップを入れた場合）
- アプリケーション：PCR、qPCR、NGS 用 DNA ライブラリー作製



DNA 精製のヒント（動画）

モナーク・ゲノム精製キットの使い方（英語）



www.nebj.jp/re/monarchDNA_movie1

ゲノム精製に使用する組織サンプルの調製および保存のヒント（英語）



www.nebj.jp/re/monarchDNA_movie2



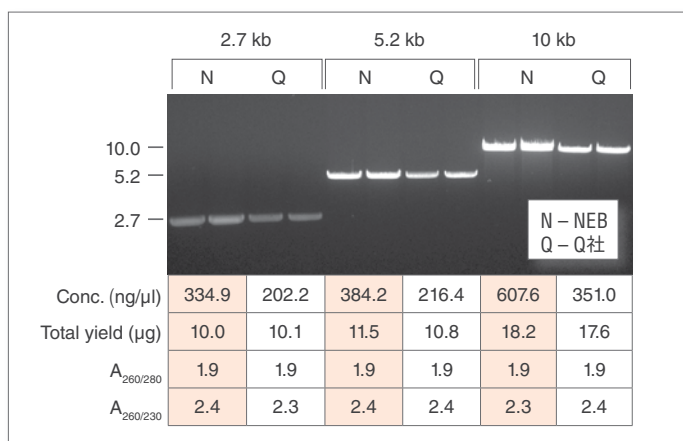
核酸精製 (Traditional Cloning & DNA Assembly)

プラスミド・ミニプレップ： Monarch Plasmid Miniprep Kit

クローニング・ワークフローにおいてはプラスミド（ベクター）を大腸菌から精製するステップが複数ある（ケースによる）。すなわち骨格となるベクターの準備、インサート DNA の準備、最後のポジティブクローン選別後の組換えプラスミドの精製である。このように大腸菌からプラスミド（ベクター）を精製する工程をプラスミド・ミニプレップと呼び、アルカリ溶出法が一般的である。

NEB の Monarch Plasmid DNA Miniprep Kit は、大腸菌培養液から高品質プラスミド DNA を迅速かつ確実に精製することができるカラムタイプのキットである。プロトコールは標準的な細胞再懸濁、アルカリ溶解、中和のステップからなり、さらにカラーインジケーターにより反応をモニターすることができる。独自の洗浄バッファーにより、塩、タンパク質、RNA、細胞成分などを確実に除去するため、最小溶出量は 30 μ l、濃縮された高純度 DNA を精製することができる。得られた DNA は、クローニングにおける骨格ベクターはもちろん、様々な酵素処理、DNA シーケンシング、PCR 反応など、多彩なアプリケーションに使用できる。

モナークは少ない液量で溶出できるため高濃度で DNA を溶出可能



大腸菌（オーバーナイト培養、1.5 ml）から各社キットでプラスミド DNA を精製、HindIII-HF（NEB #R3104）の消化産物を電気泳動した。

推奨製品

Monarch Plasmid Miniprep Kit (NEB #T1010)

特長

- 独自の形状により低容量（高濃度）で DNA を溶出
- カラムデザインの最適化により液残りを防止
- 簡単、迅速なプロトコール
- 色付けされたバッファーにより精製ステップをモニタリング
- バッファーに RNase A が添加済
- カラム表面のつや消し加工によりラベリングが容易
- カラム、バッファーの個別購入が可能

特性

- 大腸菌培養液量：1 ～ 5 ml (O.D. 値 15 以下)
- DNA 結合能：最大 20 μ g
- プラスミド DNA サイズ：最大 25 kb
- 一般的回収率：最大 20 μ g
(プラスミドのコピー数、宿主株、培養量、増殖条件に依存)
- 溶出液量： $\geq$ 30 μ l
- 純度： $A_{260/280}$ 、 $A_{260/230}$ いずれも $\geq$ 1.8
- プロトコール時間：遠心とインキュベーションで 10 分 30 秒
- アプリケーション：制限酵素やその他の酵素を使用する様々な実験、形質転換、毒性に強い細胞へのトランスフェクション、DNA シーケンシング、PCR 反応、ラベリング、セルフリータンパク質合成など



プラスミド精製のヒント

1. 使用細胞数が過剰にならないよう注意
(培養液の O.D. 値 15 以下)
使用する細胞数を適正にすることで破碎効率が向上し、細胞デブリによるカラム目詰まりの心配がなくなる。
2. 細胞を完全に溶解する
プラスミド DNA の回収率を高めるためには全細胞を溶解する。細胞ペレットを完全に懸濁し、インキュベーション時間はプロトコールに従う。
3. 細胞の溶解後はボルテックスしない
ボルテックスにより宿主の染色体 DNA が剪断され、gDNA が混入する可能性がある。
4. RNase による RNA の除去
RNase 添加済の中和バッファーでインキュベーションすることで、RNA の残存を防止できる。
5. 洗浄工程を省かない
適切な洗浄処理により細胞デブリや塩などが除去される。
6. プラスミド DNA サイズが大きい場合は加熱した溶出バッファーを使用
高分子量の DNA はカラムマトリックスに強く結合するが、加熱した溶出バッファーを使うことで溶出が容易になり、回収率が向上する。

環境に配慮した製品デザイン *

have up to

44%

less plastic

could eliminate

>140

tons of plastic each year

use

recyclable packaging materials



use

boxes made from

100%

post-consumer paper

* 詳細は NEBMonarchPackaging.com を参照



ゲル精製&DNA クリーンアップ

クローニングの一部工程ではDNAをしっかりと精製（クリーンアップ）することが重要である。特に目的DNA（インサートDNA）をPCRで増幅した後、それにベクターを制限酵素で切断した後などが挙げられる。このクリーンアップではDNAをロスすることなく、夾雑物を取り除いた高純度DNAを回収することがポイントである。エタノール沈殿などでもよいが、NEBからはカラムタイプのキットを推奨する。

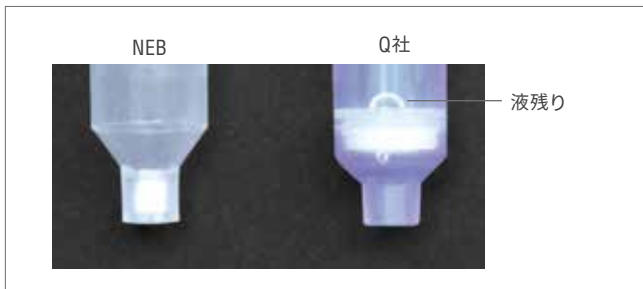
Monarch DNA Gel Extraction Kit

アガロースゲル電気泳動のバンドからDNAを抽出するためのカラムキットである。50 bp ~ 25 kb のDNAを高効率で回収できる。

Monarch PCR & DNA Cleanup Kit

本キットは酵素反応溶液中のDNAをクリーンアップするためのカラムキットである。クローニングにおいて、PCR産物中に非特異的増幅がない場合の精製（プライマー除去）や修飾反応後などに使用する。DNA Wash Buffer は、酵素、プライマー（ ≤ 25 nt）、界面活性剤、さらに低分子量のヌクレオチド、DMSO、ベタインなどを除去する。クローニングにおいてはほぼ必要ないが、オプションプロトコールにより、small DNA やオリゴヌクレオチドの精製も可能である。

独自のカラムとフィルター形状により液残りを防止



モナークカラムはOリングを使用していないため、バッファの液残りが少ない。

推奨製品

Monarch DNA Gel Extraction Kit (NEB #T1020)

Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (NEB #T1030)

特長

- わずか 6 μ l で溶出が可能
- 独自のカラムデザインによりバッファの液残りによる塩の残存を防止
- 簡単・迅速なプロトコール
- オプションプロトコールでオリゴDNAやsmall DNA断片も精製可能
- 構成成分を単品販売
- カラム、バッファの個別購入が可能

特性

- DNA 結合能：最大 5 μ g
- DNA サイズ：約 50 bp ~ 25 kb
オプションプロトコール (NEB #T1030) で
 ≥ 15 bp (dsDNA)、 ≥ 18 nt (ssDNA)
- 回収率：
70 ~ 90% / 50 bp ~ 10 kb DNA
50 ~ 70% / 11 ~ 25 kb DNA
70 ~ 85% / ≥ 18 nt (ssDNA) & ≥ 15 bp (dsDNA) (NEB #T1030)
- 溶出液量： ≥ 6 μ l
- 純度： $A_{260/280} \geq 1.8$
- プロトコール時間：
DNA ゲル抽出：10 分（遠心とインキュベーション）
PCR & DNA クリーンアップ：5 分
- アプリケーション：ライゲーション、制限酵素処理、ラベリング、その他の酵素反応、ライブラリー調製、DNA シーケンシングなど



DNA ゲル抽出のためのヒント

1. アガロースゲルをできるだけ小さく切り出す
アガロースが少ないほど抽出効率が高くなる。アガロースが多いと溶解時間が長くなり、必要なバッファ量も多くなる（結果、塩がサンプルと一緒に溶出される）。160 mg より大きいゲル切片ではアガロースとバッファとの総量がカラムの容量（800 μ l）を超過するため、カラムへの添加を2回に分ける必要がある。
2. UV 曝露を最小限にする
DNA 損傷を防ぐため、観察はできる限り長波長とし、ゲル切りは短時間にする。
3. アガロースを完全に溶解する
アガロースの溶解が不十分な場合、DNA がゲル中にトラップされるため溶出効率が低下する。
4. 大きい DNA 断片の場合は溶出バッファを加熱する
大きい DNA 断片はゲルに強く結合する。溶出バッファを温めることで、溶出効率が改善する。



DNA 増幅 (PCR)

クローニングにおいて、インサート DNA を特異的に、効率よく、正確に PCR 増幅することが重要ポイントの1つである。PCR 用の DNA ポリメラーゼには大きく 2 つのタイプが存在する。

1) 高正確性ポリメラーゼ (アーキア由来)

校正機能 (3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性) を有するポリメラーゼであり、正確性に加えて、増幅力と特異性も高いことが特長である。クローニングのインサート増幅にお薦めの酵素で、NEB では Q5 DNA Polymerase が挙げられる。PCR 産物は平滑末端である。

2) 汎用ポリメラーゼ (Taq ベース)

好熱性バクテリア由来の一般的な PCR 酵素である (Taq ベースのブレンド型を含む)。リーズナブルなコストで、PCR 産物には 3' A が付加されるため、TA クローニングによく使用される。ただしエラーが導入されやすいことに注意が必要である。NEB では特殊な PCR の他、クローニング最後のコロニー PCR にお薦めの OneTaq® DNA Polymerase を提供している。

いずれの酵素を使用する場合でも、ライゲーションに突出末端を利用する際には PCR プライマーに制限サイトを付加しておく。また、ベクターを一周 PCR して (Inverse PCR) 直鎖状することにも使用できる。

インサート DNA の PCR 用ポリメラーゼ

インサート DNA の PCR には正確性が高い Q5 DNA Polymerase をお薦めするが、用途に応じて以下表を参考に適切なポリメラーゼを選択するとよい。

特徴	高正確 PCR		ルーチン PCR		特殊 PCR	
	超高正確		OneTaq/ OneTaq Hot Start	Taq / Hot Start Taq	ロング PCR	dU の取り込み
	Q5/Q5 Hot Start	Phusion ⁽¹⁾ / Phusion Flex			LongAmp/ LongAmp Hot Start Taq	Q5U
正確性 (vs Taq)	~280X ⁽³⁾	> 39X	2X	1X	2X	ND
増幅サイズ	≤ 20 kb	≤ 20 kb	< 6 kb	≤ 5 kb	≤ 30 kb	app-specific
伸長時間	6 kb/min	4 kb/min	1 kb/min	1 kb/min	1.2 kb/min	2 kb/min
産物形状	Blunt	Blunt	3' A/Blunt	3' A	3' A/Blunt	Blunt
3' → 5' exo	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes
5' → 3' exo	No	No	Yes	Yes	Yes	No
Units/50 µl Reaction	1.0	1.0	1.25	1.25	5.0	1.0
アニーリング温度	Tm-3	Tm-3	Tm-5	Tm-5	Tm-5	Tm-3

アプリケーション						
ルーチン PCR	●	●	★	●	●	
コロニー PCR			★	●		
正確な増幅	★	●	●		●	
超高正確な増幅	★	●				
高収量	★	●	★	●		
短時間の PCR	★	●				
ロング PCR	★	●			★	
GC リッチ領域の増幅	★		★		●	
AT リッチ領域の増幅	★	●	★	●	●	★
ハイスループット	●	●	●	●		★
マルチプレックス PCR	●	●	●	★ ⁽²⁾		
DNA ラベリング				★		
部位特異的変異導入	★	●				
キャリアオーバー防止						★
USER クローニング						★

仕様 (通常仕様以外)						
ホットスタート	●	●	●	●	●	●
キット	●	●	●	●	●	●
マスターミックス	●	●	●	●	●	●
クイックロード			●	●		

推奨製品

インサート DNA の増幅:

Q5 DNA Polymerase (NEB #M0491)

※ TA クローニングの場合には OneTaq DNA Polymerase

コロニー PCR (クローニングの確認):

OneTaq DNA Polymerase (NEB #M0480)

技術情報

NEBPCRPolymers.com

- NEB のポリメラーゼの全リスト
- FAQs とトラブルシューティング
- オンラインツール (Tm や正確性計算)
- 動画 (オンラインチュートリアル)



動画: GC リッチ DNA の増幅のヒント



POINT!

- 用途に合わせて PCR 酵素を選択
- 酵素によって産物の末端が異なる (平滑 or 3' A)

(1) Phusion DNA Polymerase was developed by Finnzymes Oy, now a part of Thermo Fisher Scientific. This product is manufactured by New England Biolabs, Inc. under agreement with, and under the performance specifications of Thermo Fisher Scientific.

(2) Use Multiplex PCR 5X Master Mix.

(3) Due to the very low frequency of misincorporation events being measured, the error rate of high-fidelity enzymes like Q5 is challenging to measure in a statistically significant manner. We continue to investigate improved assays to characterize Q5's very low error rate to ensure that we present the most robust accurate fidelity data possible (Popatov, V. and Ong, J.L. (2017) PLoS One, 12(1):e0169774. doi:10.1371/journal.pone.0169774).

★ indicates recommended choice for application

Q5 DNA Polymerase の利点



詳細は裏表紙を参照



PCR プロトコール (Q5 DNA Polymerase)

	25 µl REACTION	50 µl REACTION	終濃度
5X Q5 Reaction Buffer*	5 µl	10 µl	1X
10 mM dNTPs	0.5 µl	1 µl	200 µM
10 µM primers (forward and reverse)	1.25 µl	2.5 µl	0.5 µM
テンプレート DNA	variable	variable	< 1 µg
ヌクレアーゼフリー水	to 25 µl	to 50 µl	
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase**	0.25 µl	0.5 µl	0.02 units/50 µl rxn

* 増幅困難なテンプレートの場合、付属の Q5 High GC Enhance を添加する

** > 6 kb の増幅の場合、2 units/50 µl rxn まで増やすことができる

	サイクル数	温度	時間
初期熱変性	1	98°C	30 秒間
変性	30	98°C	5 ~ 10 秒間
アニーリング		50 ~ 72°C *	10 ~ 30 秒間
伸長		72°C	1 kb あたり 20 ~ 30 秒間
最終伸長	1	72°C	2 分間
ホールド	1	4 ~ 10°C	

* Tm 値はオンラインツール (TmCalculator.neb.com) で計算

PCR プロトコール (OneTaq DNA Polymerase)

	25 µl REACTION	50 µl REACTION	終濃度
OneTaq Standard 5X Reaction Buffer	5 µl	10 µl	1X
10 mM dNTPs	0.5 µl	1 µl	200 µM
10 µM primers (forward and reverse)	0.5 µl	1 µl	0.2 µM
テンプレート DNA	variable	variable	< 1 µg
ヌクレアーゼフリー水	to 25 µl	to 50 µl	
OneTaq DNA Polymerase*	0.125 µl	0.25 µl	1.25 units/50 µl rxn

* 詳細な使用酵素量は製品プロトコールを参照

	サイクル数	温度	時間
初期熱変性	1	94°C	30 秒間
変性	30	94°C	15 ~ 30 秒間
アニーリング		45 ~ 68°C *	15 ~ 60 秒間
伸長		68°C	1 kb あたり 5 分間
最終伸長	1	68°C	5 分間
ホールド	1	4 ~ 10°C	

Tm 値はオンラインツール (TmCalculator.neb.com) で計算

最適化のヒント

Q5 DNA Polymerase を使用する際に特に注意する点:

- Taq とはアニーリング温度が異なるため、オンラインツールで確認 (TmCalculator.neb.com)
- 変性温度は 98°C
- プライマー濃度は高め
- サイクル反応は短め

DNA テンプレート

- 高品質の精製済み DNA テンプレートを使用する。コロニー PCR は 32 ページ参照。
- 複雑性の低いテンプレート (プラスミド、ラムダ、BAC DNA など) を使用する場合には、反応容量 50 µl あたり 1 pg ~ 10 ng の DNA を使用する。
- 複雑性の高いテンプレート (ゲノム DNA など) を使用する場合には、反応容量 50 µl あたり 1 ng ~ 1 µg の DNA を使用する。
- DNA テンプレートの濃度が高くなると、増幅産物の特異性が低下する。特にサイクル数が多いほど顕著となるため、テンプレート濃度をふって最適化するとよい。

プライマー

- 通常 20 ~ 40 nt のプライマーを用いる。
- 理想的な GC 含量は 40 ~ 60% である。
- Tm 値は NEB の Tm Calculator を用いて計算する (TmCalculator.neb.com)。

- プライマーペアの Tm 値の差は 5°C 以内とする。
- 各プライマーが 2 次構造 (ヘアピン構造など) を形成しない、およびプライマー同士が二量体を形成しないように設計する。
- プライマーに制限サイトを入れる場合、切断部位の外側に 6 塩基を付加する。

酵素濃度

- 反応液中の最適酵素濃度は各ポリメラーゼによって異なる。詳細は各製品情報を参照する。
- 一般的に酵素量が過剰の場合、増幅が失敗しやすい。特に長い領域の増幅を行う場合に顕著である。

マグネシウム濃度

- 大部分の PCR ポリメラーゼの至適 Mg²⁺ 濃度は 1.5 ~ 2.0 mM である (バッファーに添加済)。
- Mg²⁺ 濃度をさらに最適化する必要がある場合は、0.2 ~ 1 mM ずつ増加させる (最大 6 mM)。

デオキシヌクレオチド (dNTPS)

- 一般的な dNTP 濃度は各 200 µM。
- プライマーやテンプレート、デオキシヌクレオチド溶液中にウラシルが存在する場合、Q5U を使用する。

反応のセットアップ

- 反応成分は全て氷上で調製する。ホットスタート酵素はこの必要がない。
- ポリメラーゼを最後に加える。
- サーマルサイクラーを予め変性温度に加熱しておく。ホットスタート酵素はこの必要はない。

変性

- 高 GC 含量のテンプレートを用いる場合を除き、推奨以上の長時間または高温を避ける。
- NEB のホットスタート仕様の酵素はアダプターに基づいているため、酵素活性化のための変性ステップは必要ない。

アニーリング

- プライマーの Tm 値は NEB の Tm Calculator を用いて計算する (TmCalculator.neb.com)。
- 特異的増幅がみられた場合、プライマーの再設計かアニーリングの最適化、ホットスタート酵素の使用で改善できる。

伸長

- 伸長速度は PCR ポリメラーゼによって異なる。一般的には 1 kb あたり 15 ~ 60 秒である。
- 伸長反応を推奨時間よりも長く行った場合、エラー率が上がり、非特異的増幅が増え、増幅収量が低下することがある。

cDNA 合成

RNA を逆転写して cDNA を合成、それをテンプレートにして PCR 増幅を行うことにより、間接的に RNA のクローニングが可能である。以下チャートを参照にして cDNA 合成キットまたは逆転写酵素を選択するとよい。

cDNA 合成キット／酵素 選択チャート

cDNA SYNTHESIS	特長
キット	
ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB #E6560)	> 10 kb の cDNA を合成、cDNA クローニングに最適 - M-MuLV よりも耐熱性が向上 (～ 50°C)、RNase H 活性を低減 - dNTPs、オリゴ dT プライマーおよびランダムプライマー付属
ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB #E6300)	> 5 kb の cDNA を合成 - M-MuLV Reverse Transcriptase 付属 - dNTPs、オリゴ dT プライマーおよびランダムプライマー付属
LunaScript RT Master Mix Kit (Primer-free) (NEB #E3025)	2-Step の RT-qPCR の cDNA 合成に最適 - マスターミックス (ランダムヘキサマー、オリゴ dT プライマー、dNTPs、Murine RNA Inhibitor、Luna 逆転写酵素) - ピベッティング、分注ミスを低減する青色のマスターミックス - わずか 13 分のプロトコール
Template Switching RT Enzyme Mix (NEB #M0466)	- 逆転写時に合成 cDNA の 3' 末端に universal adaptor sequence を付加 - テンプレート・スイッチ反応に最適化された酵素とバッファー (5' RACE) - 逆転写酵素ミックスには RNA 阻害剤も含有 - 微量 RNA から高効率で逆転写 — シングルセルまたは 2 pg ヒト・トータル RNA から cDNA を合成 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 法に最適 - 第 2 鎖 cDNA 合成に必要な転写産物の 5' 末端を維持
単品酵素	
ProtoScript II Reverse Transcriptase (NEB #M0368) An alternative to SuperScript® II	- RNase H 型 M-MuLV 逆転写酵素 - RNase H 活性が低減 37 ～ 50°C で反応可能
M-MuLV Reverse Transcriptase (NEB #M0253)	- 野生型 M-MuLV 逆転写酵素 37 ～ 45°C の反応温度
AMV Reverse Transcriptase (NEB #M0277)	37 ～ 52°C の反応温度を有する力強い逆転写酵素 - 高温での反応に必要なテンプレートに最適
WarmStart® RTx Reverse Transcriptase (NEB #M0380)	50 ～ 65°C の反応温度 - 高い特異性と反応性 - RT-LAMP に最適

推奨製品

ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB #E6560)

cDNA 合成のヒント

RNA サンプル

- 高純度の RNA サンプルを精製することが成功の鍵である。
- RNA サンプル中の DNA を除去しておく (DNase I 処理など)。
- 基本的にはトータル RNA を使用して逆転写を行う。mRNA も使用できる。この場合は Magnetic mRNA Isolation Kit (NEB #S1550) で精製をするといよい。
- cDNA 合成 (逆転写) に必要な RNA 量は、サンプル中の目的 RNA の存在量によって異なる。トータル RNA の場合は 1 ng ～ 1 µg、mRNA の場合は 0.1 ～ 100 ng で最適化するとよい。

製品の選択

- ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB #E6560) がお薦め。
- その外用途に応じて左表を参考にして選択する。

効率

- ProtoScript II Reverse Transcriptase およびこれが含まれたキット (NEB #E6560) は通常 42°C で逆転写を行うが、48°C まで上げて RNA の二次構造を乖離することで、10 kb 以上の逆転写ができる。
- 酵素量と dNTPs 量を 2 倍にすることで収量向上ができる。

添加物

- 逆転写後に PCR を行う場合 (RT-PCR)、RNase H 処理は基本的に不要である。ただしうまく増幅できない場合には 2 units の *E.coli* RNase H を逆転写産物に添加、37°C で 20 分間インキュベーションをするといよい。

cDNA 合成 (逆転写) プロトコール (#E6560)

	変性
Total RNA	1 ～ 6 µl (up to 1 µg)
d(T)₂₃ VN (50 µM)	2 µl
ヌクレアーゼフリー水	to a total volume of 8 µl
反応	65°C で 5 分間 スピンドウンして氷上に保存

	逆転写 (cDNA 合成)
Denatured RNA	8 µl
Reaction Mix	10 µl
Enzyme Mix	2 µl
反応	42°C で 1 時間
熱失活	80°C で 5 分間 ※ -20°C で保存可能

※ PCR テンプレートに使用 (1/10 以下の持ち込みとする)



cDNA 合成のための RNA 精製： Monarch Total RNA Miniprep Kit

モナーク・トータル RNA 精製キットは、培養細胞、血液、哺乳類の組織など様々なサンプルに対応しており、サンプルの保存、溶解、gDNA の除去を含んだトータル RNA 精製の包括的ソリューションである。さらにオプションプロトコルにより、細菌、酵母、植物などからも RNA 精製ができる。また、酵素反応後の RNA や TRIzol 試薬で抽出した RNA のクリーンアップも可能である。精製される RNA は $A_{260/280}$ および $A_{260/230}$ が ≥ 1.8 で、RIN スコアが高く（分解度が低く）、残存 DNA が極めて少なく、高品質である。さらに結合条件を変えることで（オプションプロトコル）、200nt より小さい Small RNA（miRNA、5S rRNA、tRNA など）の精製など、RNA の選択的精製も可能であり、完全長 rRNA からインタクトな miRNA までの精製をカバーしている。精製された RNA は、RT-qPCR、cDNA 合成、ノーザンブロットング解析、NGS ライブラリー調製など多くのアプリケーションに最適である。

推奨製品

Monarch Total RNA Miniprep Kit (NEB #T2010)

特長

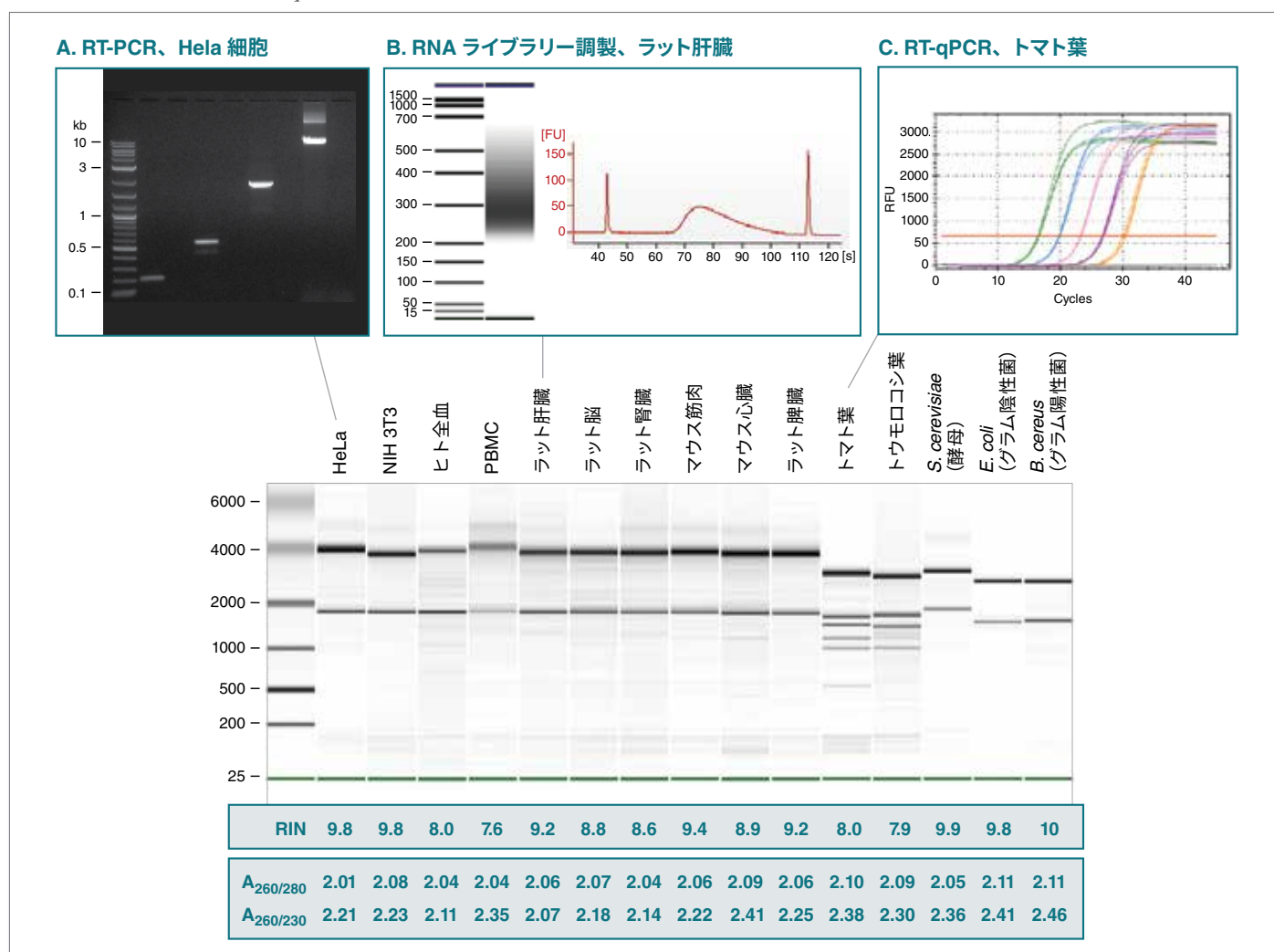
- 様々なサンプルに対応
- miRNA や small RNA (> 20 nt) を含む全 RNA を精製可能
- DNase I、gDNA 除去カラム、Proteinase K、RNA 安定化剤が付属
- 価格を抑えたオールインワンキットで、コストを節約
- カラム、バッファーの個別購入が可能

特性

- RNA 結合能：100 μ g
- RNA サイズ： ≥ 20 nt
- 純度： $A_{260/280}$ 、 $A_{260/230}$ いずれも通常 ≥ 1.8
- 最大サンプル量：細胞 1×10^7 、組織 50 mg*
- 溶出液量：30 ~ 100 μ l
- 回収率：サンプルによる
- アプリケーション：NGS 用ライブラリー調製、RT-PCR、RT-qPCR、ノーザンブロットなど

* 詳細は www.neb.jp/re/RNA-guide を参照

NGS ライブラリー調製や RT-qPCR 用などの RNA 調製に最適



Monarch Total RNA Miniprep Kit (NEB #T2010) で様々なサンプルからトータル RNA を精製したところ、全てにおいて分解がなく高品質な RNA が得られた。また A (RT-PCR)、B (NGS ライブラリープレップ)、C (RT-qPCR) において良好な結果が得られることを確認した。精製した RNA は Agilent Bioanalyzer® 2100 および Nano 6000 RNA chip (植物では plant Nano assay を使用) で測定を行った。それぞれで使用した試薬は A : Protoscript II Reverse Transcriptase (NEB #M0368) / LongAmp Taq DNA Polymerase (NEB #M0323)、B : NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit (NEB #E7760)、C : Luna One-Step RT-qPCR Reagents (NEB #E3005)

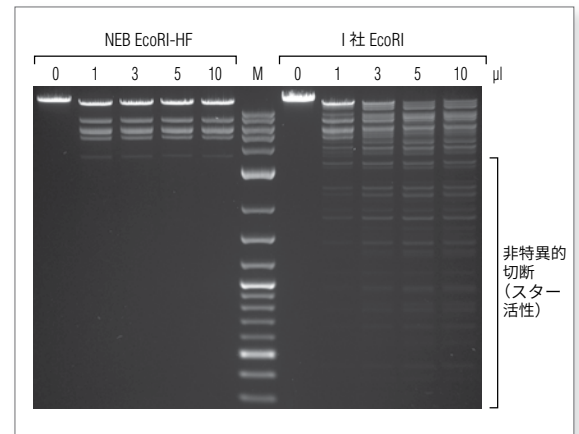


DNA 切断 (制限酵素)

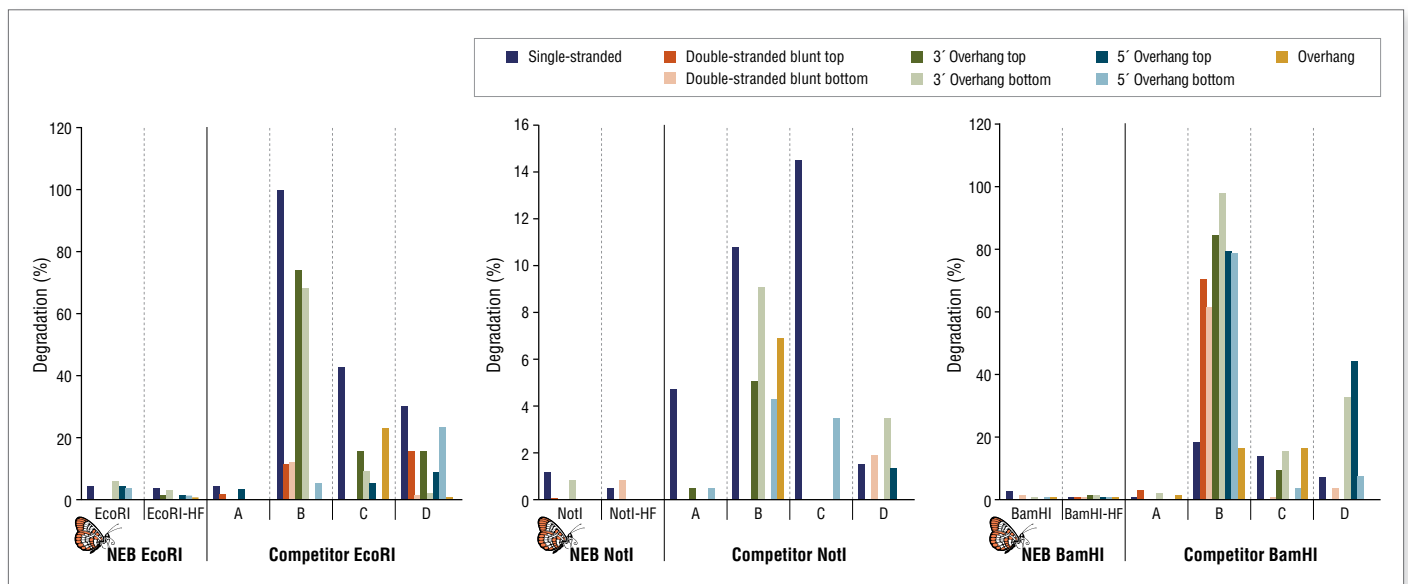
Traditional Cloning においては、制限酵素でベクター切断 (直鎖状化) と PCR 増幅したインサート DNA の末端処理を行うことが基本である。また DNA Assembly (Seamless Cloning) でも制限酵素でベクター切断 (直鎖状化) を行うことが多い。本稿および別冊「NEB 新・制限酵素の基礎知識」を参考にして効率のかつ特異的な切断を行う。

NEB は約 300 種類の制限酵素を提供している。切断効率と特異性、使いやすさの点から様々な工夫がされている。ハイフィデリティー (HF) 制限酵素は野生型酵素にアミノ酸変異を導入することにより、非特異的切断 (スター活性) を大きく抑制できる (右図)。また反応バッファーも工夫されており、約 80% の酵素が rCutSmart Buffer を最適とするため、ダブルダイジェストがしやすい。

また、各社から制限酵素が市販されており、いずれも良好に DNA を切断できるが、夾雑ヌクレアーゼ量が大きく異なる (下図参照)。場合によっては完全に切断されているように観察されても、末端構造が損なわれている (突出末端が平滑化するなど) ことがある。NEB の制限酵素は最適化された精製方法と厳密な品質管理により、夾雑ヌクレアーゼが最小限であり、それゆえ切断効率だけでなくクローニング効率も高い。



NEB の EcoRI-HF と他社 EcoRI で Lambda DNA を切断した結果、NEB の EcoRI-HF はオーバーナイト反応、過剰な酵素量でもスター活性を生じないことが示された。



各社の制限酵素の夾雑ヌクレアーゼを調べた結果、NEB の制限酵素が最も少ないことが示された。EcoRI、NotI、BamHI について、蛍光標識した平滑末端、5' 突出末端、3' 突出末端を基質として、推奨条件で反応、キャピラリー電気泳動で分解度を測定した。この測定は 1 塩基レベルの解像度である。夾雑ヌクレアーゼが多いということは、切断後に末端が損なわれてしまい、ライゲーション効率の低下を引き起こすことを意味する。



POINT!

- HF 酵素を使えばスター活性を回避
- 切断効率だけではなく、夾雑による末端分解の少なさが重要
- 詳細は「新・制限酵素の基礎知識」を参照 (ウェブサイトで公開、依頼)



最適化のヒント

酵素

- フリーザーから酵素を出したら、常に氷上で保持する。
- 酵素は最後に加える。
- 混合はピペット操作かタッピングにて行い、微量遠心分離機でチューブ内の溶液をスピンドウンさせる。ボルテックスによる混合は控える。
- 通常は1時間の反応において、1 µg の DNA に対して 5 ~ 10 units の酵素の使用を推奨する。ゲノムDNAの場合には10~20 unitsを使用する。

スター活性

- 以下のような条件下ではスター活性（非特異的切断）を生じることがある：
 - 酵素量が過剰
 - 長時間反応
 - 最適バッファー以外を使用
 - 5%以上のグリセロール濃度
- ハイフィデリティ制限酵素を使用すればスター活性を低減できる。あるいは反応時間の短縮、Time-Saver 品質酵素の使用、全反応溶液を増やすことで低減できる。

DNA

- DNA は、フェノール、クロロホルム、アルコール、EDTA、界面活性剤、過剰な塩などが混入していないものを用いる。DNA サンプル調製時に追加の洗浄作業を行うことを推奨する。
- 制限酵素のメチル化感受性と DNA のメチル化状況を確認する。
- 50 µl 反応溶液あたり、1 µg を超える DNA を切断する場合には切断効率が低下することがある。この場合、1 µg DNA/50 µl となるようにスケールアップをして反応を行う。

バッファー

- 各制限酵素には10倍濃度の最適バッファーが付属しているが、反応時には1X濃度に希釈して使用する。
- NEBuffer r1.1、r2.1、r3.1 および rCutSmart バッファーには既にアルブミンが含まれているので、反応セットアップ時に BSA 添加は不要である。

反応容量

- 1 µg の基質 DNA を分解する場合、50 µl の反応容量を推奨する。容量が少ない場合にはミニプレップ DNA 中に残存している塩が影響を与える場合がある。
- 添加する酵素量は全反応容量の10%とする。これはスター活性を防ぐために、グリセロール濃度を5%未満にするためである。
- 反応容量が少ない場合（50 µl 未満）、酵素溶液中に含まれる塩やグリセロール、あるいはサンプル DNA 溶液中に含まれる EDTA や残存アルコールなどが酵素活性の低下やスター活性の増加などを引き起こす可能性があるため、注意する。小スケールにおける反応条件では、目安として下記表を参考にされたい。

	制限酵素 *	DNA	10X NEBUFFER
10 µl rxn**	1 unit	0.1 µg	1 µl
25 µl rxn	5 units	0.5 µg	2.5 µl
50 µl rxn	10 units	1 µg	5 µl

* 微量酵素を使用する場合、反応直前に1x バッファーで希釈する

** 10 µl の系の場合、1時間以上の反応は避ける

反応時間

- 通常は1時間で行う。Time-Saver 酵素を用いる場合、5 ~ 15 分間で行う。
- Time-Saver 酵素については <https://www.neb.jp/t/961> を参照。
- 多くの酵素においては、酵素量を少なくして16時間まで反応時間を延長できる。

保存

- 大半の制限酵素は、-20°C で保存する。ただし一部の酵素については、30 日以上保存する場合、-70°C で保存することが推奨されている。酵素の保存条件に関しては、製品に同封されているデータシートまたは本カタログの各製品の情報を参照。
- 10X NEBuffer についても -20°C で保存する。
- 消費期限はチューブラベル上に印字されている。
- 20°C 以上における酵素の保存は最大限控える。

PCR 産物の切断

PCR 産物を制限処理する機会は多い。この時、PCR 産物をエタノール沈殿、ビーズ精製、カラム精製などで精製してから制限反応を行うことを推奨する。しかしながら、ステップ簡略化のため、PCR 産物を精製せずに直接制限反応を行う場合もある。この際、PCR バッファー中の因子が制限酵素に影響する。影響度（阻害度）は制限酵素によって異なるため、下記表と最適化のヒントを参照にして最適化するとよい。

PCR 産物の直接切断プロトコール

右表を参考にセットアップする。PCR 産物を精製せずに切断したい場合、カラムなどで精製したものをコントロールとして設けるとよい。

PCR 産物切断の最適化のヒント

- できる限り制限反応を阻害しない PCR 酵素とバッファーを選択して PCR を行う
- PCR 溶液の影響を受けにくい制限酵素を選択する
- 極力 PCR 溶液の持ち込みを少なくして制限反応をセットアップする。少ないほどよい
- PCR の持ち込みを 2、5、10、25 µl のように変えて最適化する
- PCR 産物を精製したものをコントロールにする



POINT!

- 精製した PCR 産物をコントロールにする
- 持ち込み量を極力少なくする



プライマーに制限サイトを入れる場合

制限部位をプライマーなどに組み込む場合など、DNA 末端付近で制限反応を行う場合、ほとんどの制限酵素は制限部位の外側に塩基を必要とする。これは制限酵素が DNA に結合して切断するために、“足場”を必要とするためである。足場の長さ（付加する配列数）によって切断効率が変わる。6 bp 以上付加すれば 100% の切断効率が得られるため、どの制限酵素でも 6 bp 以上を付加することを推奨している。またその付加配列はランダムなものがよい。



POINT!

- とにかく 6 bp を付加すればよい

Acil の場合（認識配列：CCGC）

5'-**TCCG**CNNN...NNN-3'
3'-**AGGC**CNNN...NNN-5'

0 or 1 bp

切断効率：0%

5'-**CATC**CGCNNN...NNN-3'
3'-**GTAG**CGCNNN...NNN-5'

2 or 3 bp

切断効率：0 ~ 20%

5'-**GCATC**CGCNNN...NNN-3'
3'-**CGTAG**CGCNNN...NNN-5'

4 bp

切断効率：20 ~ 50%

5'-**ATGCATC**CGCNNN...NNN-3'
3'-**TACGTAG**CGCNNN...NNN-5'

5 or > 6 bp

切断効率：50 ~ 100%

DNA 断片の末端付近における制限酵素活性

下記表は、5' FAM 標識オリゴ DNA をアニールした 2 本鎖 DNA に対して、各種制限酵素（10 units/1 pmol オリゴ）を添加し、推奨条件下で 60 分間インキュベーションしたときの切断効率を示す。切断効率は、TBE アクリルアミドゲルを用いた電気泳動と蛍光イメージ検出によって評価した。2 本鎖 DNA は各認識配列の上流に 1 ~ 5 bp、下流に 12 bp を付加してある。非対称な切断が観察される場合があるが、その場合は切断されないものとして扱った。非対称な切断は付加する塩基数を増やすほど減少する傾向にあった。

メモ：表中に記載がない制限酵素の場合、効率的に切断するためには認識部位の末端のいずれか一方に 6 塩基対付加する必要がある。付加する塩基配列はパルンドローム配列やプライマーダイマーを形成しないように設計する。多くの場合、特定の配列を付加する必要はない。

酵素	末端への付加塩基数				
	1 bp	2 bp	3 bp	4 bp	5 bp
Acil	—	+	+	++	+++
AgeI	+++	+++	+++	+++	+++
AgeI-HF	++	+++	+++	+++	+++
AluI	—	+++	+++	+++	+++
Apal	+++	+++	+++	+++	+++
AscI	+++	+++	+++	+++	+++
AvrII	++	++	+++	+++	+++
BamHI	+	++	+++	+++	+++
BamHI-HF	+	+	+++	+++	+++
BbsI-HF	+++	+++	+++	+++	+++
BclI-HF	—	—	+++	+++	+++
BglII	++	+++	+++	+++	+++
BmtI	+++	+++	+++	+++	+++
BmtI-HF	+++	+++	+++	+++	+++
BsaI	+++	+++	+++	+++	+++
BsaI-HFv2	+++	+++	+++	+++	+++
BsiWI	++	+++	+++	+++	+++
BsiWI-HF	+++	+++	+++	+++	+++
BsmBI	+++	+++	+++	+++	+++
BsrGI	+++	+++	+++	+++	+++
BssHII	+	++	+++	+++	+++
BstZ17I-HF	+	+++	+++	+++	+++
Clal	—	—	+	+++	+++
DdeI	+++	+++	+++	+++	+++
DpnI	—	++	++	NT	NT
DraIII-HF	+++	+++	+++	+++	+++
EagI	++	+++	+++	+++	+++
EagI-HF	+	+++	+++	+++	+++
EcoRI	+	+	++	++	+++
EcoRI-HF	+	+	++	+++	+++
EcoRV	++	++	++	++	+++
EcoRV-HF	+	++	++	++	+++
Esp3I	+++	+++	+++	+++	+++
FseI	+	++	+++	+++	+++
HindIII	—	+	+++	+++	+++
HindIII-HF	—	+	+++	+++	+++
HpaI	+++	+++	+++	+++	+++
KpnI	+	+++	+++	+++	+++
KpnI-HF	+	+++	+++	+++	+++
MfeI	+	++	+++	+++	+++
MfeI-HF	+	++	+++	+++	+++
MluI	+	++	+++	+++	+++
MseI	+++	+++	+++	+++	+++

酵素	末端への付加塩基数				
	1 bp	2 bp	3 bp	4 bp	5 bp
NcoI	—	++	+++	+++	+++
NcoI-HF	+	++	+++	+++	+++
NdeI	+	+	+++	+++	+++
NheI	+	++	+++	+++	+++
NheI-HF	++	++	+++	+++	+++
NlaIII	++	+++	+++	+++	+++
NotI	++	++	++	++	++
NotI-HF	++	++	++	++	++
NsiI	+	+	+++	+++	+++
NspI	—	—	+	+	+++
PacI	+++	+++	+++	+++	+++
PciI	+++	+++	+++	+++	+++
PmeI	+++	+++	+++	+++	+++
PstI	+	+++	+++	+++	+++
PstI-HF	++	+++	+++	+++	+++
PvuI	+++	+++	+++	+++	+++
PvuI-HF	+++	+++	+++	+++	+++
PvuII	++	++	++	+++	+++
PvuII-HF	—	++	++	+++	+++
RsaI	+	+++	+++	+++	+++
SacI	—	++	+++	+++	+++
SacI-HF	—	+	+++	+++	+++
SacII	+++	+++	+++	+++	+++
Sall	—	++	+++	+++	+++
Sall-HF	—	++	+++	+++	+++
SapI	+++	+++	+++	+++	+++
Sau3AI	+++	+++	+++	+++	+++
SbfI	++	+++	+++	+++	+++
SbfI-HF	++	+++	+++	+++	+++
Scal-HF	+	+++	+++	+++	+++
SfiI	+++	+++	+++	+++	+++
SmaI	+++	+++	+++	+++	+++
SpeI	+	++	++	++	++
SpeI-HF	+	++	++	++	++
SphI	+++	+++	+++	+++	+++
SphI-HF	++	++	+++	+++	+++
SspI	+	+++	+++	+++	+++
SspI-HF	+	+++	+++	+++	+++
StuI	+++	+++	+++	+++	+++
StyI	+	++	+++	+++	+++
StyI-HF	+	++	+++	+++	+++
XbaI	++	++	++	++	++
XhoI	++	++	++	+++	+++
XmaI	+++	+++	+++	+++	+++

— 0% + 0 ~ 20% ++ 20 ~ 50% +++ 50 ~ 100% nt not tested

表にない酵素：1 ~ 5 bp では低活性（6 bp 付加を推奨）



環状 DNA (ベクター&プラスミド) の切断

制限酵素は基質 DNA の種類によって異なる切断効率を示す。一般的に、比較的短い直鎖状 DNA は切断されやすく、環状 DNA は切断されにくい。このような切断されにくい環状 DNA を切断する場合、1 µg DNA あたり、10 ~ 20 units の制限酵素を使用するとよい。

環状 DNA の切断プロトコール

下表に従って反応を調製する。

酵素の推奨温度下、1 時間でインキュベーションする。切断しにくい場合、オーバーナイト反応を行う。

	反応	ネガティブコントロール	ポジティブコントロール
制限酵素	10 ~ 20 units*	— (入れない)	10 ~ 20 units
環状 DNA	最大 1 µg	最大 1 µg	1 µg
10X NEBuffer	5 µl	5 µl	5 µl
ヌクレアーゼフリー水	Up to 50 µl	Up to 50 µl	Up to 50 µl
全反応容量	50 µl	50 µl	50 µl

* 制限酵素によって酵素濃度 (1 µl あたりのユニット数) が異なることに注意

環状 DNA の切断のヒント

- プラスミド・ミニプレップでは、アルコールや塩が残りやすいので十分注意する
- 反応系への DNA 溶液の持ち込みを少なくする、また全反応容量を 50 µl にすることで、夾雑物の影響を少なくできる
- メチル化感受性を確認しておく
- 1 µg 以上の DNA を切断する場合、反応全体をスケールアップする。高濃度反応は効率低下を招くリスクがあるため推奨しない
- 環状 DNA をダブルダイジェストする場合、それらの認識配列が十分離れている (切断末端間が 6 塩基以上) ことを確認する。距離が短い場合、新・制限酵素の基礎知識 (弊社ウェブサイト申し込み可能) の 68 ページを参照する
- ネガティブコントロールを使用して、電気泳動でのバンドシフトを確認する

環状 DNA の切断に必要な酵素ユニット数

あくまでも参考であるが、以下に標準的な反応条件下における環状 DNA (pBR322、pUC19 および pLITMUS) を完全に切断するために必要な酵素量を示す。各 DNA ベクターの切断部位を 1 つずつ試験しているが、複数のデータがあった場合には平均値を示している。またコントロールとして直鎖状 DNA である Lambda DNA を用いた (ほとんどの酵素が 1 unit で切断できる)。

酵素	プラスミド切断に必要なユニット数
AatII	3
AflIII	1
AhdI	1
AccI	4
Acc65I	1
AfiII	2
AgeI	1
AlwNI	2
Apal	1
ApoI	1
AseI	0.3
AvaI	10
AvrII	1
BaeI	3
BamHI	3
BanII	1
BglII	8
BpmI	1
BsaI	2
BsaAI	20
BsaXI	2
BsiWI	3
BsgI	1
BsmI	1
BspDI	1
BspEI	1
BspMI	**
BspQI	3
BsrFI	2
BsrGI	1

酵素	プラスミド切断に必要なユニット数
BssHI	4
BtgI	5
ClaI	5
EagI	10
EcoO109I	8
EcoNI	3
EcoRI	3
EcoRV	1
HincII	4
HindIII	5
KasI	4
KpnI	2
MluI	2
NarI	10
NcoI	1
NdeI	3
NgoMIV	2
NheI	5
NruI	1
NsiI	1
PciI	3
PsiI	3
PstI	1
PvuI	2
PvuII	2
SacI	5
Sall	10
SapI	1
Scal	20
SmaI	1

酵素	プラスミド切断に必要なユニット数
SnaBI	1
SpeI	1
SphI	3
SspI	4
StuI	3
StyI	4
TliI	2
TspMI	1
Tth111I	2
XbaI	2
XhoI	10
XmnI	5

** 切断のためには 2 か所の認識配列が必要



メチル化感受性

制限酵素の多くはメチル化感受性を有する。ゲノム DNA や大腸菌で調製したプラスミド／ベクター DNA にはホストのメチル化パターンが DNA に反映されるため、制限酵素で切断するには十分確認をする。以下に確認方法を記す。

- 1) 制限酵素のアイコンや説明書などでメチル化感受性を確認する。感受性がないものはサンプルを問わず切断できる。
- 2) 感受性があった場合、その内容に応じて確認をする。PCR 産物はメチル化を反映しないため、問題なく切断できる。

制限酵素	真核生物ゲノム	バクテリアゲノム	大腸菌ミニプレッププラスミド／ベクター	PCR 産物
CpG メチル化感受性	切断できない	切断できる	切断できる	切断できる
Dam メチル化感受性	切断できる	切断できない	切断できない	切断できる
Dcm メチル化感受性				

3) 上記表にて切断できないに該当する場合、以下を検討する。

- イソシゾマーでメチル化感受性がないものを探す
- 大腸菌ミニプレッププラスミド／ベクターの場合、Dam/Dcm 欠損株でプラスミドを調製する (NEB #C2925) など
- PCR で増幅してから切断する
- 他のサイトを検討する

メチル化感受性の詳細確認方法

下記表は NEB 制限酵素のメチル化感受性について要約したものである。メチル化部位が認識配列とオーバーラップした場合の Dam メチル化、Dcm メチル化、または CpG メチル化による切断の可否や影響を示してある。詳細な情報や具体的事例、または目的 DNA の切断確認に関しては、以下を参照する。



REBASE (制限酵素データベース) : rebase.neb.com/rebase/
各酵素のメチル化感受性の詳細な情報が掲載 (実際の切断効率など)



NEBcutter (オンラインツール) : nc3.neb.com/NEBcutter/
DNA 配列を入力、制限マップと各酵素のメチル化感受性を表示



POINT!

- メチル化感受性の詳細は新・制限酵素の基礎知識を参照
- 詳細は REBASE を参照するとよい

記号の説明

- 感受性なし
- ブロックされる
- ol オーバーラップするメチル化配列によってブロックされる
- scol オーバーラップするメチル化配列の組み合わせによってはブロックされる
- ◆ 影響を受ける
- ◇ ol オーバーラップするメチル化配列によって影響を受ける
- ◇ scol オーバーラップするメチル化配列の組み合わせによっては影響を受ける

制限酵素のメチル化感受性リスト

(一例、完全な表はウェブサイトもしくは新・制限酵素の基礎知識を参照)

酵素	配列	Dam	Dcm	CpG
AatII	GACGT/C	●	●	■
AbaSI	^m C(11/9)	●	●	●
AccI	GT/MKAC	●	●	□ ol
Acc65I	G/GTACC	●	□ scol	□ scol
Acil	CCGC(-3/-1)	●	●	■
AcII	AA/CGTT	●	●	■
Acl	CTGAAG(16/14)	●	●	●
AfeI	AGC/GCT	●	●	■
AflII	C/TTAAG	●	●	●
AflIII	A/CRYGT	●	●	●
AgeI	A/CCGGT	●	●	■
AgeI-HF	A/CCGGT	●	●	■
AhdI	GACNNN/NNGTC	●	●	◇ scol
AleI-v2	CACNN/NNGTG	●	●	◇ scol
AluI	AG/CT	●	●	●
AlwI	GGATC(4/5)	■	●	●
AlwNI	CAGNNN/CTG	●	□ ol	●
Apal	GGGCC/C	●	□ ol	□ ol
ApaLI	G/TGCAC	●	●	□ ol
ApeKI	G/CWGC	●	●	□ ol
ApoI	R/AATTY	●	●	●
ApoI-HF	R/AATTY	●	●	●

塩基表記: R = A or G
Y = C or T
M = A or C
K = G or T
S = C or G
W = A or T
H = A or C or T (not G)
B = C or G or T (not A)
V = A or C or G (not T)
D = A or G or T (not C)
N = A or C or G or T



rCutSmart Buffer 中での修飾酵素の活性

制限酵素と他の DNA 修飾酵素を利用したワークフローを作成する際、反応間で DNA クリーンアップを行うことなく、同一溶液中で反応を行うことが求められることが多い。以下表に制限酵素バッファの 1 つである rCutSmart Buffer 中における DNA 修飾酵素の活性を示す。

修飾酵素	rCutSmart バッファ中の活性	必須因子
Antarctic Phosphatase	+++	Requires Zn ²⁺
<i>Bst</i> DNA Polymerase	+++	
CpG Methyltransferase (M. Sssl)	+++	
DNA Polymerase I	+++	
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	+++	
DNA Polymerase Klenow Exo ⁻	+++	
DNase I (RNase free)	+++	Requires Ca ²⁺
<i>E. coli</i> DNA Ligase	+++	Requires NAD
Endonuclease III (Nth)	+++	
Endonuclease VIII	+++	
Exonuclease I	+++	
Exonuclease III	+++	
Exonuclease VII	+++	
Exonuclease V (Rec BCD)	+++	Requires ATP
GpC Methyltransferase (M. CviPI)	+	Requires DTT
Hi-T4 DNA Ligase	+++	Requires ATP
Lambda Exonuclease	++	
McrBC	+++	
Micrococcal Nuclease	+++	Requires Ca ²⁺
Nuclease Bal-31	+++	
phi29 DNA Polymerase	+++	Requires DTT
Quick CIP	+++	
RecJ ₁	+++	
Salt-T4 [®] DNA Ligase	+	Requires ATP
Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP)	+++	
T3 DNA Ligase	+++	Requires ATP + PEG
T4 DNA Ligase	+++	Requires ATP
T4 DNA Polymerase	+++	
T4 Phage β-glucosyltransferase (T4-BGT)	+++	
T4 Polynucleotide Kinase	+++	Requires ATP + DTT
T4 PNK (3' phosphatase minus)	+++	Requires ATP + DTT
T5 Exonuclease	+++	
T7 DNA Ligase	+++	Requires ATP + PEG
T7 DNA Polymerase (unmodified)	+++	
T7 Exonuclease	+++	
Thermolabile ExoI	+++	
USER Enzyme, recombinant	+++	

+++ full functional activity ++ 50–100% functional activity + 0–50% functional activity



DNA 末端修飾

Traditional Cloning において、インサート DNA とベクターの制限酵素切断が完了したらライゲーション可能である。ライゲーションには 5' モノリン酸基と 3' 水酸基が必要であるが、制限酵素で切断した DNA は既にこの形状になっているためである。しかしながら 5' モノリン酸を持たない場合にはリン酸化、あるいはベクターのセルフアニーリングを予防する際には脱リン酸化、またはインサート DNA とベクターの末端形状が異なる場合には平滑化といったように DNA の末端修飾が必要である。

リン酸化

制限処理をしたベクターとインサート DNA は末端修飾の必要がないが、PCR 産物をそのまま使う場合（平滑末端ライゲーションなど）、5' リン酸化が必要である。これは一般的には PCR プライマーは 5' リン酸化されていないためである。この場合、T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK, NEB #M0201) で簡単にリン酸化できる。あるいはプライマー注文時にオプションで 5' リン酸化をすればよい。

5' リン酸化プロトコール

	標準プロトコール
DNA	1 ~ 2 µg
10X Polynucleotide Kinase Buffer	5 µl
10 mM Adenosine 5'-Triphosphate (ATP)	5 µl (1 mM final concentration)
T4 Polynucleotide Kinase (PNK)	1 µl (10 units)
ヌクレアーゼフリー水	全量が 50 µl になるように
インキュベーション	37°C、30 分間

脱リン酸化

脱リン酸化は、ベクターを 1 種類の制限酵素だけで切断した場合に起こりうるセルフライゲーションを防止するための修飾である。この処理によりバックグラウンドが減少してポジティブクローンが得られやすくなる。ベクターを脱リン酸化した場合には、インサートの 5' リン酸化が必須であることに注意する。なお、ライゲーション後は片方の鎖にニックが入っている状態になるが、これは形質転換後に大腸菌内で修復されて完全な 2 本鎖プラスミドになって複製される。

ホスファターゼ選択チャート

	Recombinant Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP) (NEB #M0371)	Antarctic Phosphatase (AP) (NEB #M0289)	Quick CIP (NEB #M0525)
特徴			
熱失活条件	5 分間 / 65°C	2 分間 / 80°C	2 分間 / 80°C
活性	●		●
安定性	●		●
NEBuffer 中での活性	●	●	●
補因子		● (Zn ²⁺)	
クイックプロトコール			●

脱リン酸化プロトコール (Quick CIP)

	標準プロトコール
DNA	1 pmol of ends (末端のモル数)
10X rCutSmart Buffer	2 µl
Quick CIP	1 µl
ヌクレアーゼフリー水	全量が 20 µl になるように
インキュベーション	37°C、10 分間
熱失活	80°C、2 分間

5' リン酸化の推奨酵素

T4 Polynucleotide Kinase (NEB #M0201)

5' リン酸化のヒント

酵素

- T4 PNK (NEB #M0201) と T4 DNA Ligase (NEB #M0202) は同一バッファー中で使用できる。T4 DNA Ligase Buffer でリン酸化を行い、そのままベクターとリガーゼを添加するとよい。
- T4 PNK は以下で阻害される：150 mM NaCl (50% 阻害)、7 mM リン酸 (50% 阻害)、7 mM 硫酸アンモニウム (75% 阻害)
- 5' 陥没末端のリン酸化を行う場合、DNA 溶液を 70°C で 10 分間インキュベーション、氷上で急冷してからバッファーと酵素を入れるとよい。

添加物

- PEG8000 (終濃度 5% 以下) をいれると脱リン酸化効率が向上する。

脱リン酸化の推奨酵素

Quick CIP (NEB #M0525)

脱リン酸化のヒント

酵素

- ベクターを制限酵素で切断した後、熱失活をしてからホスファターゼを追添加して脱リン酸化をする。熱失活できない制限酵素を使用した場合、NEB #T1030 で精製してから脱リン酸化する。
- 表中の 3 種類のホスファターゼを使用する場合、脱リン酸化後は熱失活をする。DNA 精製の必要はなく、そのままライゲーションに使用できる。

添加物

- AP は Zn²⁺ が必須である。それ以外は NEBuffer 中に添加するだけでよい。



POINT!

- 末端のどちらかに 5' リン酸があればよい
- ベクターの脱リン酸化でセルフライゲーションを防止できる

脱リン酸化の説明





平滑化&末端修復

基本的には突出末端ライゲーションがよいが、丁度よい末端がない場合、平滑末端ライゲーションを行うことが多い。もし制限処理後の末端が突出末端であれば、5' 突出の埋め込み（アンチセンス鎖の伸長）と 3' 突出の削り込みにより平滑化を行う。この反応は下表にあるように DNA Polymerase I Klenow Fragment か T4 DNA Polymerase、Quick Blunting Kit で行うことができる。あるいは 5' 突出を除去したい場合、Mung Bean Nuclease を使用する。いずれにせよ、フレームシフトや制限部位の消失と新たな制限部位の産生が起こることに留意する。

平滑化酵素&キット選択チャート

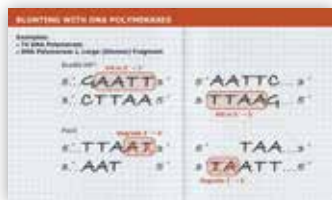
	T4 DNA Polymerase* (NEB #M0203)	DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (NEB #M0210)	Quick Blunting Kit (NEB #E1201)	Mung Bean Nuclease (NEB #M0250)
アプリケーション				
5' 突出の埋め込み	●	●	●	
3' 突出の除去	●	●	●	●
5' 突出の除去				●

* T4 DNA Polymerase は強い 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する

DNA 平滑化プロトコール (Quick Blunting Kit)

	標準プロトコール
DNA	up to 5 µg
10X Blunting Buffer	2.5 µl
1 mM dNTP Mix	2.5 µl
Blunt Enzyme Mix	1 µl
ヌクレアーゼフリー水	to 25 µl
インキュベーション	- 制限反応産物の場合：室温、15 分間 - 断片化 DNA/PCR 産物：室温、30 分間 *
熱失活	70°C、10 分間

* PCR 産物を平滑化する場合、精製をしたものを使用する（カラム精製：NEB #T1030、ゲル精製：NEB #T1020、またはフェノール/クロロホルム抽出など）



DNA 平滑化のチュートリアル動画を公開中

www.nebj.jp/re/traditional-cloning

平滑化の推奨酵素

Quick Blunting Kit (NEB #E1201)

平滑化のヒント

酵素

- DNA 末端の平滑には適切な酵素を選択する。
左表：平滑化酵素&キットを参考にする。
- T4 DNA Polymerase および DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment は全ての NEBuffer 中で使用できる。この場合、dNTPs を添加して使用する。

精製

- 制限反応後に平滑化を行う場合、制限酵素が熱失活できるのであれば精製なく平滑化できる。制限酵素が熱で不活性化できない場合、平滑化前に DNA 精製を行うことを推奨する。
- PCR 産物を平滑化する場合、ヌクレオチドとポリメラーゼを除去するために DNA 精製してから平滑化を行う。
- 平滑化後に脱リン酸化を行う場合、DNA 精製を行う。

温度

- Mung Bean Nuclease で平滑化を行う場合、室温での反応を推奨する。37°Cなどで反応を行った場合、DNA 末端がさらに削られて突出末端となることがある。酵素量とインキュベーション時間を最適化するとよい。

熱による不活性化

- Mung Bean Nuclease は熱による不活性化を推奨しない。不活性化自体はできるが、不活性化前に DNA 末端がさらに削られて突出末端となったり、非特異的な分解が起こることがあるためである。フェノール/クロロホルム精製もしくはエタノール精製、スピンカラム精製を推奨する。



DNA ライゲーション

ベクターと DNA の連結

DNA のライゲーションは Traditional Cloning の鍵ステップであることに加えて、非クローニング用途の最新の分子生物学ワークフローにも多く使用されている。この反応は DNA Ligase によって触媒され、主として 2 本鎖 DNA の末端の連結および 2 本鎖 DNA 上のニックの連結が行われる。連結は DNA の 5' リン酸末端 (5' P) と 3' 水酸末端 (3' OH) のホスホジエステル結合の形成によって成されるが、細かく見ると以下の 3 ステップからなる。

- 1) 溶液中のフリーの ATP によりリガーゼ自身がアデニル化する。
- 2) リガーゼ内のアデニル基をドナー DNA の 5' P 末端に転移する。
- 3) アデニル化されたドナー DNA の 5' 末端とアクセプター DNA の 3' OH 末端でホスホジエステル結合を形成する。この時 AMP が遊離する。

またあらゆる生物において、DNA 複製と DNA 修復に DNA リガーゼは必須である。

分子クローニングは組換え DNA を単離・増幅する方法であることは先に述べたとおりであるが、具体的には目的 DNA (インサート DNA) とベクターをライゲーションして環状 DNA を作成、これを微生物ホスト (多くは大腸菌) 内でホストゲノムとは別に自律的に増幅する。特にライゲーションにおいてはインサート DNA とベクターの末端形状をそろえる必要があり、5' P 末端を有する突出末端もしくは平滑末端が使用できる。インサート DNA とベクターのそれぞれの末端がライゲーションされてホスホジエステル結合 (共有結合) が形成され、環状 DNA が作成される。この環状 DNA がホストバクテリアに形質転換して複製できる形状なのである。こうして作成された組換え DNA を持つベクターは「組換えプラスミド (リコンビナントプラスミド)」としてホスト内で保存される。またそこから精製したリコンビナントプラスミドはシーケンスやタンパク質発現、遺伝子発現、機能解析など様々な実験の起点材料となる。

古くから使用されている DNA リガーゼであるが、近年、NEB はその正確性に着目して研究を実施、連結部分の配列によって正確性に差が生じることを明らかにした。特に Golden Gate 法などの DNA Assembly において重要であり、また DNA リガーゼを使用した新規アプリケーション開発にも重要な情報となりうるため、ウェブサイト参照されたい (www.neb.com/GoldenGate)。

また耐塩性が高いものやユニークな特異性をもつリガーゼも提供、下記チャートに示す。

クローニング用リガーゼ選択チャート

アプリケーション	Instant Sticky-end Ligase Master Mix (NEB #M0370)	Blunt/TA Ligase Master Mix (NEB #M0367)	ElectroLigase (NEB #M0369)	T4 DNA Ligase (NEB #M0202)	Quick Ligation Kit (NEB #M2200)	T3 DNA Ligase (NEB #M0317)	T7 DNA Ligase (NEB #M0318)	HiFi Tag DNA Ligase (NEB #M0647)	Salt-T4 DNA Ligase (NEB #M0467)	Hi-T4 DNA Ligase (NEB #M2622)
突出末端のライゲーション	●●●	●●	●●	●●	●●●	●●	●●	●	●●	●●
平滑末端のライゲーション	●	●●●	●●	●●	●●●	●●	●●	●	●●	●●
T/A ライゲーション	●	●●●	●●	●●	●●	●	●	●	●●	●●
エレクトロポレーション			●●●	●●						●●
突出末端だけをライゲーション							●●●			
2 本鎖 DNA 上のニック修復	●●	●●	●●	●●●	●●	●●	●●	●●	●●●	●●●
クローンライブラリーの作成	●●	●●	●●	●●●	●●					
特性										
耐塩性 (T4 DNA Ligase の 2 倍以上)						✓			✓	
15 分間以下のライゲーション	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
マスターミックス仕様	✓	✓								
熱安定性								✓		
耐熱性										✓
リコンビナント酵素	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

ライゲーションを始める前に

Traditional Cloning におけるライゲーションにおいて、その効率を最大限にするためには、反応溶液中のインサート DNA とベクターの量比が極めて重要である。一般的にはインサート：ベクター = 3：1 のモル比がよい。ここでは質量比 (ng) ではなく、モル比 (mol) であることに注意が必要である。オンラインツールを使用すれば簡単にモル比が計算できる。

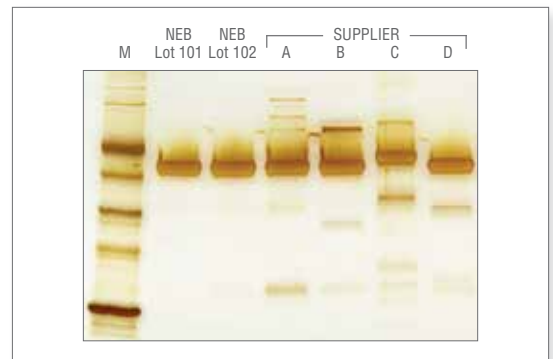
NEBioCalculator.neb.com

技術情報

NEBStickTogether.com

- NEB のリガーゼ製品リスト
- FAQs
- 動画 (ライゲーションの原理と反応セットアップ)

最高純度の NEB T4 DNA Ligase で確実にライゲーション



各メーカーの T4 DNA Ligase を SDS-PAGE に供して銀染色を行った結果、NEB のリガーゼには夾雑バンドがなく、最も純度が高いことが示された。夾雑成分はヌクレアーゼであることが多く、インサート DNA やベクターの末端を分解、ライゲーション効率の低下やミスを引き起こすことがある。

ライゲーションの推奨酵素

- 突出末端 (> 2 bp) :**
Instant Sticky-end Ligase Master Mix (NEB #M0370)
- 平滑末端 & 1 塩基突出末端 :**
Blunt/TA Ligase Master Mix (NEB #M0367)
- 汎用 :**
Quick Ligation Kit (NEB #M2200)
- エレクトロポレーション用 :**
ElectroLigase (NEB #M0369)

KEY

- 最適、そのアプリケーションに推奨されるリガーゼ
- そのアプリケーションで良好に使用可能
- そのアプリケーションに使用できるが、推奨せず



ライゲーションプロトコール

	Quick Ligation Kit (NEB #M2200)	T4 DNA Ligase (NEB #M0202)	Instant Sticky-end Master Mix (NEB #M0370)	Blunt/TA Master Mix (NEB #M0367)
仕様	Kit	Enzyme	Master Mix	Master Mix
ベクター (3 kb)	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
インサート DNA (1 kb)	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
バッファー	2X Quick Ligation Buffer	T4 DNA Ligase Reaction Buffer	5 µl (Master Mix)	5 µl (Master Mix)
リガーゼ	1 µl	1 µl	N/A	N/A
ヌクレアーゼフリー水	to 20 µl	to 20 µl	to 10 µl	to 10 µl
インキュベーション	25°C、5 分間	25°C、2 時間 (または 16°C、オーバーナイト)*	インキュベーションの 必要なし	25°C、15 分間

* 突出末端の場合 (> 2 bp)、反応時間を 25°C、10 分間に短縮可能



ライゲーションのメカニズム、反応のヒントはウェブサイトを参照：
NEBStickTogether.com

ライゲーションのヒント

反応バッファー

- T4 DNA Ligase Buffer (NEB #B0202) は氷上または掌で融解する。37°C で融解しない (ATP が壊れるため)。
- 融解度は速やかに氷上で保存する。
- T4 DNA Ligase は 4 種類の制限酵素バッファー (NEBuffer) および T4 PNK バッファー中で活性を示す。この際、終濃度 1 mM ATP を添加する。
- NEB のライゲーションバッファーには ATP が含まれているが、別途必要な場合は ATP (NEB #P0756) を使用する。dATP はライゲーションを阻害するため使用しない。

DNA

- 脱リン酸化をした際は必ず失活または精製しておく。
- 反応溶液中のトータル DNA 濃度は 5 ~ 10 ng/µl がよい。
- ベクター：インサート = 3 : 1 のモル比を基準とし、インサートサイズに応じて 1 : 1 から 1 : 10 までで最適化する。インサートサイズが小さいほどモル比を大きくする。

- 複数のインサートを一度にライゲーションする場合、Traditional Cloning では効率を得られにくいため、DNA Assembly : NEBuilder (NEB #E2621) を使用するとよい。
- もし DNA 濃度が不明な場合、いくつかの量を試す。

リガーゼ

- 突出末端をライゲーションする場合、T4 DNA Ligase か Instant Sticky end Ligase Master Mix、Quick Ligation Kit のいずれかがよい。
- 平滑末端および 1 塩基突出末端の場合、Blunt/TA Ligase Master Mix がよい。
- エレクトロポレーションで形質転換をする場合、ElectroLigase がよい。
- T4 DNA Ligase (NEB #M0202) は 65°C、20 分間で熱失活できる。
- Quick Ligation Kit とマスターミックスは熱失活できない。した場合には形質転換効率が低下する。

形質転換

- 1 ~ 5 µl のライゲーション溶液を使用する。
- PEG はライゲーション効率を向上できるが、形質転換効率を下げるため、使用する場合は適切な濃度を探す。
- 大きなサイズの場合 (> 10 kb)、エレクトロポレーションが効果的であることが多い。ElectroLigase を使用するか、他の場合は精製してから行う。



POINT!

- 末端形状によってライゲーションの効率が異なる
- 平滑末端と 1 塩基突出末端はややライゲーションが困難



ライゲーションの概要



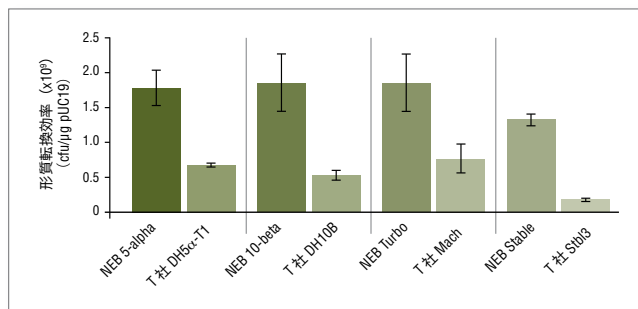
形質転換

形質転換とは、クローニングにおいてはバクテリアホスト（主に大腸菌）へライゲーションした環状プラスミドを入れて増幅する操作を指すが、生物学的にはある生物が外来 DNA を獲得することを指し、自然あるいは人為的に起こりうる。自然形質転換は環境中の細胞外 DNA の取り込みによってなされる。遺伝子の水平伝播が代表例である。対して人為形質転換は、その名のとおりに人為的に外来 DNA を細胞に取り込ませる方法である。一般的なクローニングでは大腸菌がホストとして使用され、大腸菌の膜透過性を低下させることがポイントであり、大腸菌コンピテントセルと呼ばれる。これには以下2つがある。

- 二価カチオン (Ca^{2+} など) で処理して作成されたケミカルコンピテントセル
- 電気刺激で穴をあけて DNA を導入するためのエレクトロコンピテントセル

こうしたコンピテントセルを使用することで、プラスミド DNA を大腸菌内の細胞質まで入れることができる。その後、専用の Outgrowth 培地で前培養を行って細胞膜を修復、プレートに植菌して薬剤マーカーで選択培養をすることで（薬剤耐性遺伝子はホストは持たず、プラスミド上に存在）、目的のプラスミド DNA を保有する大腸菌クローンを得ることができる。

高い形質転換を示す NEB のコンピテントセル



各株について、NEB と同等品の形質転換効率を測定した。

コンピテントセル選択チャート

	NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (NEB #C2987)	NEB Turbo Competent <i>E. coli</i> (NEB #C2984)	NEB 5-alpha F' Competent <i>E. coli</i> (NEB #C2992)	NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i> (NEB #C3019)	<i>dam</i> ⁻ / <i>dcm</i> ⁻ Competent <i>E. coli</i> (NEB #C2925)	NEB Stable Competent <i>E. coli</i> (NEB #C3040)
特徴						
汎用性	●					●
早い成長 (< 8 時間)		●				
毒性遺伝子のクローニング			●			●
大きなサイズのクローニング				●		
<i>Dam</i> / <i>Dcm</i> フリーのプラスミド調製					●	
レトロ/レンチウイルスベクターのクローニング						●
<i>recA</i> ⁻	●		●	●		●
仕様						
ケミカルコンピテントセル	●	●	●	●	●	●
エレクトロコンピテントセル				●		
サブクローニング	●					
96 穴ウェル	●			●		
384 穴ウェル	●					
12x8 チューブストリップ	●					

推奨製品

汎用：
NEB 5-alpha Competent *E. coli* (NEB #C2987)

大きなサイズ：
NEB 10-beta Competent *E. coli* (NEB #C3019)

形質転換のヒント

コンピテントセルの融解

- 氷上で融解する。
- 溶液が 0°C 以上になると効率が低下するため、室温や掌での融解は推奨しない。
- 融解後は速やかに DNA を加える。

DNA

- 通常は DNA 溶液（ライゲーション溶液）を 1～2 μl 加える。
- 最大 10 μl を加えてもよいが、形質転換効率自体は半分程度になる。

インキュベーション&ヒートショック

- DNA を加えた後、軽くタッピングなどでよく混ぜ、氷上で 30 分間インキュベーションする。
- インキュベーション時間を 10 分短くする毎に形質転換効率が半分になる。
- ヒートショックは通常 42°C で 30 秒、ただし厳密にはセルの容量とバイアルチューブの種類によって異なる。
- BL21 (NEB #C2530) は例外的に 42°C で 10 秒がよい。

予備培養 (Outgrowth)

- 37°C で 1 時間がよい。
- 15 分間短くする毎に形質転換効率は半分になる。

植菌 (プレーティング)

- プレートは暖かくても冷たくても、また湿っていても乾いていても、形質転換効率には影響しない。
- ただしコロニー形成速度に影響するため、暖かく乾いたプレートを使うのがよい。

注意すべき DNA コンタミネーション

夾雑物	除去方法
界面活性剤	エタノール沈殿
フェノール	クロロホルム抽出とエタノール沈殿
エタノール、イソプロパノール	エタノール沈殿中の乾燥時間の延長
PEG	カラム精製 (NEB #T1020) またはフェノール/クロロホルム抽出



動画：形質転換の原理とヒント

www.nebj.jp/re/traditional-cloning



形質転換プロトコル (NEB 5-alpha Competent *E.coli*)

- 1) コンピテントセルを -80°C の冷凍庫から取り出し、氷上で融解する (約 10 分間)。氷の粒が完全になくなることを確認する。
- 2) 小分けにする場合、ゆっくりとピペッティングして別チューブに移す。
- 3) $1 \sim 5 \mu\text{l}$ のライゲーション溶液を加える (通常 $1 \text{ pg} \sim 100 \text{ ng}$ のプラスミド DNA を含む)。この時、形質転換確認用のコントロール DNA (一般的には pUC19、製品に付属) も使用してポジティブコントロールも行う。
- 4) $4 \sim 5$ 回タッピングして混ぜる。ボルテックスはしないこと。
- 5) 氷上で 30 分間静置。
- 6) 42°C 、30 秒間ヒートショックをする。
- 7) 氷上で 5 分間静置。
- 8) $950 \mu\text{l}$ の SOC 培地を添加する。SOC 培地はあらかじめ室温にしておく。
- 9) 37°C 、60 分間振とう培養をする (250 rpm)。
- 10) 37°C に温めておいたプレートに、 $50 \sim 100 \mu\text{l}$ を植菌する。
- 11) 37°C でオーバーナイト培養する。あるいは 30°C で 24 $\sim$ 36 時間、 25°C で 48 時間でもよい。

5 分間クイック形質転換プロトコル (NEB 5-alpha Competent *E.coli*)

- 1) 時間短縮ができるが、形質転換効率は 10% に低下することに留意する。
- 2) 上記 1 $\sim$ 4 と同じ。
- 3) 氷上で 2 分間静置。
- 4) 42°C 、30 秒間ヒートショックをする。
- 5) 氷上で 2 分間静置。
- 6) $950 \mu\text{l}$ の SOC 培地を添加、よく混ぜた後、プレートに $50 \sim 100 \mu\text{l}$ を植菌する。
- 7) 37°C でオーバーナイト培養する。あるいは 30°C で 24 $\sim$ 36 時間、 25°C で 48 時間でもよい。



確認：コロニー PCR

形質転換後にプレート上にコロニーが確認されたら、それらのいくつかを確認して目的 DNA を有するポジティブクローンを選別・取得する。最も簡便かつ広く採用されている方法としては、コロニー PCR である。目的 DNA の増幅に使用したプライマーペアを使用すればインサート DNA の有無を確認できる。あるいはベクター中の配列（インサートの外側）のプライマーペアを使用すれば、その増幅サイズからインサート DNA を有するか否かが判別できる。または一方をインサート特異的、もう一方をベクター配列のプライマーにすれば、サイズに加えてインサートの方向性も確認できる。いずれにせよ簡単かつローコストでできる PCR 酵素を使うのがよい。あるいはサイズに加えて配列を確認する場合、正確性が高い PCR 酵素を使用して、その産物をダイレクトシーケンスする。

コロニー PCR 酵素 (OneTaq) 選択チャート

PCR 酵素	特長
OneTaq DNA Polymerase (NEB #M0480)	- コロニー PCR でのサイズ確認に最適 <6 kb を増幅、30 ~ 80% GC 領域の増幅が可能 - 正確性は Taq の 2 倍 - リーズナブルな価格 (約 20 円/50 µl 反応)
OneTaq DNA Polymerase (NEB #M0481)	- M0480 のホットスタート仕様 - 室温でセットアップ可能
OneTaq Quick-Load 2x Master Mix with Standard Buffer (NEB #M0486)	- M0480 のマスターミックス仕様 - プライマーと水を入れるだけで簡単にセットアップ - 電気泳動用色素も入っているため、PCR はすぐにゲルにアプライ可能

コロニー PCR プロトコール

1) PCR 溶液を調製してチューブに分注する。

OneTaq (M0480/M0481)

	25 µl REACTION	50 µl REACTION	終濃度
OneTaq Standard 5X Reaction Buffer	5 µl	10 µl	1X
10 mM dNTPs	0.5 µl	1 µl	200 µM
10 µM primers (forward and reverse)	0.5 µl	1 µl	0.2 µM
ヌクレアーゼフリー水	to 25 µl	to 50 µl	
OneTaq DNA Polymerase	0.125 µl	0.25 µl	1.25 units/50 µl rxn

OneTaq MM (M0486)

	25 µl REACTION	50 µl REACTION	終濃度
OneTaq Master Mix	12.5 µl	25 µl	1X
10 µM primers (forward and reverse)	0.5 µl	1 µl	0.2 µM
ヌクレアーゼフリー水	12 µl	24 µl	

2) 滅菌した爪楊枝やチップなどでコロニーをピックアップ、コロニーに附番しておく。

3) オプションとして別のプレートにストリーク（レプリカ作成）、そのまま PCR チューブに差し込む。溶液が少し濁ったら爪楊枝もしくはチップを取り出す。これを 3 ~ 5 ml の LB 培地においてミニプレップの準備をしておく。

4) 以下のサイクル条件で PCR を開始する。

	サイクル数	温度	時間
初期熱変性	1	94°C	30 秒間
変性	30	94°C	15 ~ 30 秒間
アニーリング		45 ~ 68°C *	15 ~ 60 秒間
伸長		68°C	1 kb あたり 1 分間
最終伸長	1	68°C	5 分間
ホールド	1	4 ~ 10°C	

* Tm 値およびアニーリング温度はオンラインツール：TmCalculator.neb.com で計算

推奨製品

OneTaq Quick-Load 2x Master Mix (NEB #M0486)

コロニー PCR のヒント

コロニーのピックアップ

- 直径 1 ~ 2 mm の早くに出現したコロニーを選ぶ。
- サテライト（大きなコロニーの周りにある小さいコロニー）をピックアップしない。

PCR

- 爪楊枝を長時間漬けず、短時間にする。
- 爪楊枝を空のチューブに入れて取り出した後、PCR 溶液を入れる方法もある。

コロニーの保存

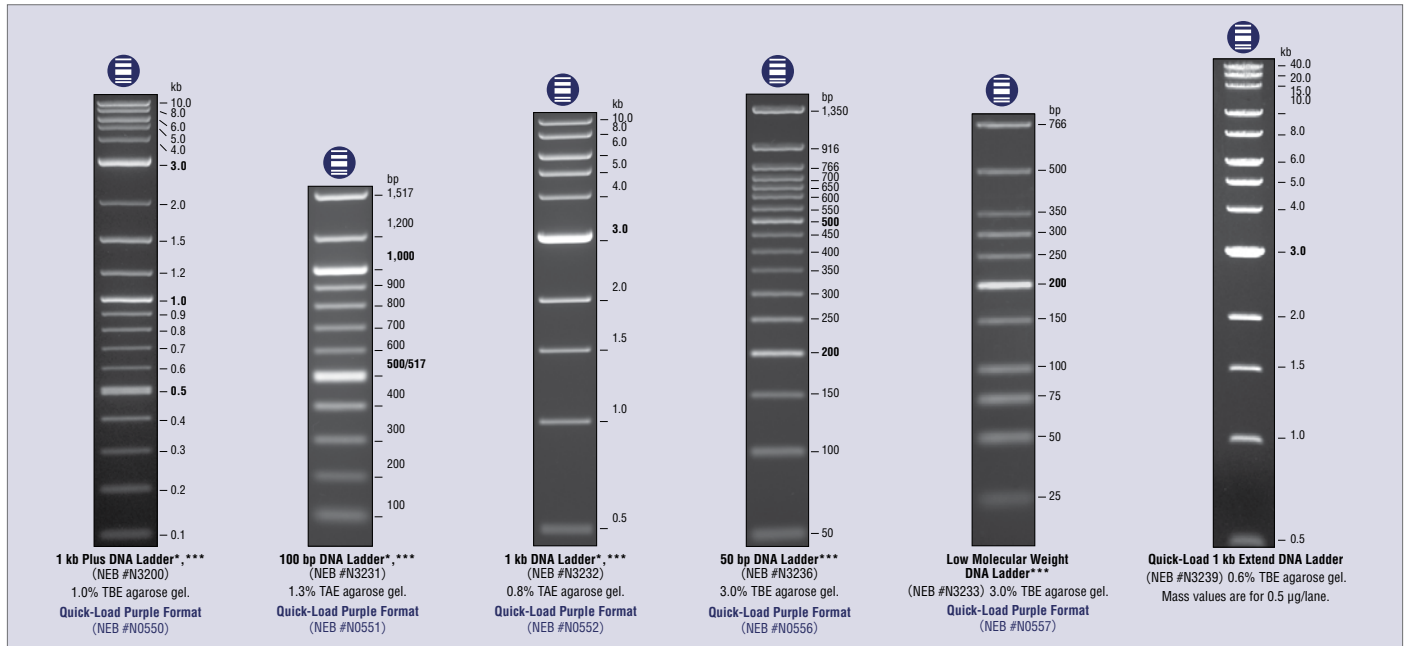
- プレートをそのまま 4°C で保存してもよい。



確認：電気泳動

コロニー PCR や一番初めの目的 DNA の PCR 増幅において、アガロースゲル電気泳動で PCR 産物の確認を行う。この時、目的サイズに応じたマーカーを選択する。また、UV 観察時の影による視認低下を防ぐため、目的サイズに重複しない分子量のダイを選択することもポイントであるが、NEB の DNA マーカー／ラダー（Purple）には影を生じないダイが使われているので、この点は気にする必要はない。アガロース電気泳動においては、泳動後染色と泳動中染色、泳動前染色があるが、後者 2 つは泳動と UV 観察を阻害しない染色剤を使うのがよい。また PCR 産物は、DNA マーカー／ラダー製品に付属している NEB Purple Dye (6X) を使用する。コロニー PCR ではほぼ必要がないが、バンド強度からある程度の DNA 量を推測できる。各製品のウェブサイトに各バンドの質量が記載されている。

Quick-Load Purple DNA Ladders

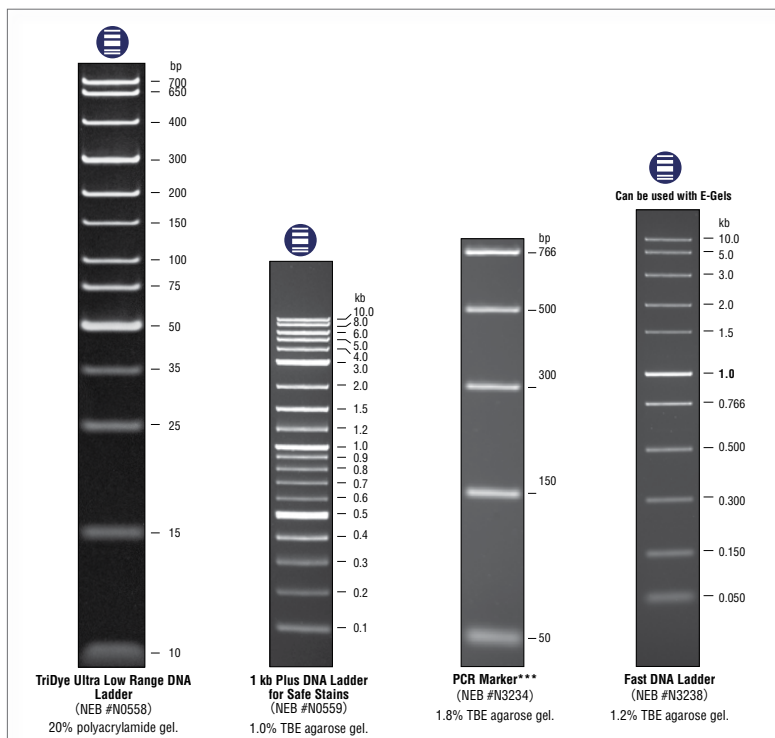


* 他の仕様もあり

プレミックス

*** サンプル用ローディングダイが付属

Additional DNA Ladders from NEB



注目製品

Gel Loading Dye, Purple (6X) (NEB #B7024)

一部の制限酵素は DNA 切断後も強く結合して複合体を形成、電気泳動が正しく行われないことがある。そのため、泳動前には制限酵素と DNA をしっかりと乖離しておく必要がある。本製品は制限反応に適したローディングダイである。もちろん一般的な DNA 電気泳動にも使用できる。

- SDS が入っているため、酵素-DNA を乖離、正確に DNA を泳動
- EDTA が入っているため、多くの酵素反応を停止
- 特殊なダイは UV で影を生じないのでクリアな観察が可能
- Ficoll によりバンドがシャープ
- アガロースゲルと非変性ポリアクリルアミドゲルに使用可能
- SDS が含まれていないダイも別途販売 (NEB #B7025)



ダイフロントの様子



DNA アッセンブリ

DNA アッセンブリとは色々な種類と数の DNA をつなぎ合わせることであり、近年では合成生物学の根幹をなす技術である。クローニングにおいては、制限酵素と T4 DNA Ligase を鍵酵素として使用する Traditional Cloning とは異なり、制限酵素部位に依存することなく自由に組換えプラスミド DNA を構築でき、短時間かつ高効率でクローニングができるため、次世代型クローニングともいえる。さらに連結部分も自由に設定できるため、Seamless Cloning（シームレス・クローニング）とも呼ばれる。DNA Assembly（Seamless Cloning）にはいくつかの方法があるが、共通する特長は以下になる。

- 制限酵素部位に依存することなく、自由にインサート DNA をベクターに挿入できる（自由に組換えプラスミドが作成できる）
- 複数断片でも同時にクローニングできる
- インサート DNA を PCR で増幅した際、その産物を制限酵素で切断しておく必要がない
- 1 本鎖 DNA でもクローニングできる（NEBuilder の場合）
- クローニング時間が短い

DNA Assembly（Seamless Cloning）の開発の歴史を見ると、Type IIS 制限酵素を用いる方法が初めに開発された。これを発展したものが NEB Golden Gate Assembly である。また T5 エクソヌクレアーゼと高熱性ポリメラーゼ、*Taq* DNA Ligase を組み合わせた Gibson Assembly（これを発展させたものが NEBuilder）や、強い 3'→5' エクソヌクレアーゼ活性を持つ DNA ポリメラーゼを用いた In-Fusion 法、大腸菌の粗抽出液を使用するだけの SlICE 法など、現在では様々な方法がある。本誌では NEBuilder と Golden Gate Assembly 法に焦点を当てて紹介する。

NEBuilder HiFi DNA Assembly

3 種類の酵素、すなわち 5'→3' exonuclease、DNA Polymerase、*Taq* DNA Ligase を使用するアッセンブリ法である。DNA 末端にもう一方の DNA との相同配列を付加しておく（右図、茶色と水色部分）。通常は 15 bp、PCR プライマーに付加しておけばよい。50°C の反応中、以下のように反応が進行する：

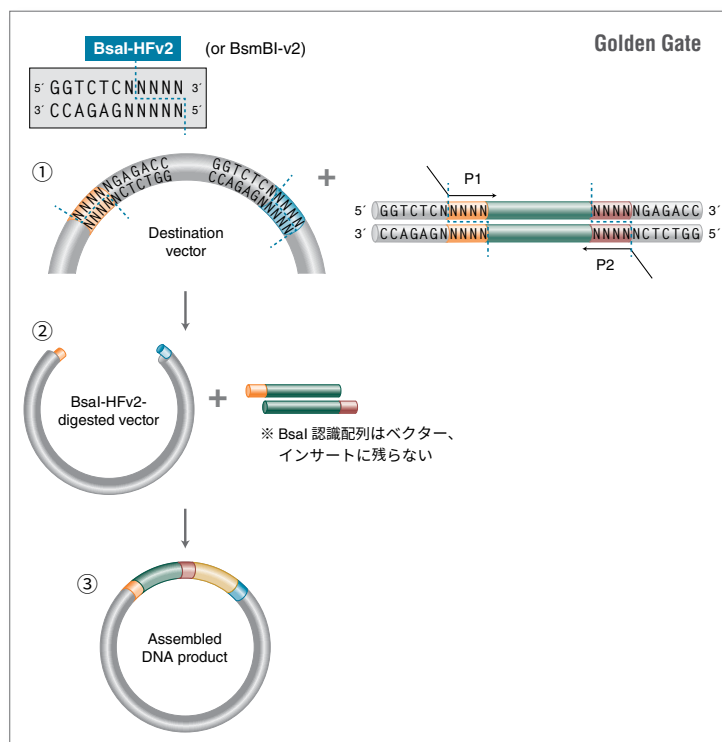
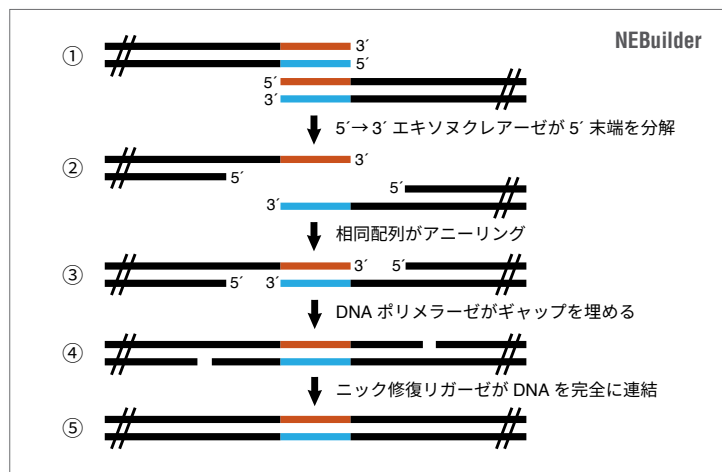
- ① 5'→3' exonuclease が DNA 末端から 5'→3' 方向に分解する
- ② 40～80 bases の 3' 突出末端が産生される
- ③ 突出末端中の相同配列がアニーリングする
- ④ DNA ポリメラーゼがギャップを埋める
- ⑤ *Taq* DNA リガーゼがニックを埋めて DNA を連結する

結果として 1 反応でギャップやニックがない、完全な 2 本鎖 DNA が産生される。なお制限酵素で切断して直鎖状にしたベクター末端は速やかに 5'→3' exonuclease で分解されるため、再環状化はほとんど起こらない。また *Taq* DNA Ligase は T4 DNA Ligase と異なり、2 分子の DNA をライゲーションしない。

NEB Golden Gate Assembly Kit

Type IIS 制限酵素と T4 DNA Ligase を利用するアッセンブリ法である。Type IIS 制限酵素は認識配列の外側に距離に依存して切断するため、DNA 切断後に産出される 1 本鎖突出末端の配列を自由に設計できる（右図では BsaI-HF v2 を示す）。さらに認識配列をベクターの切断部位の内側（不要な方）、それとインサート DNA の外側に配置することで、制限酵素切断後は制限部位が残らず、シームレスなプラスミドが作製できる。シンプルなクローニングにおいては、37°C で以下の反応が進行する：

- ① Type IIS 制限酵素がベクターおよびインサート DNA を切断する
- ② 設計した 1 本鎖突出が産生される
- ③ ベクターとインサートの 1 本鎖突出がアニーリング、その部分を T4 DNA Ligase が連結する





NEB の DNA アッセンブリキット

NEB からは大きく 4 種類のアッセンブリキットを提供している。以下選択チャートを参考にしてクローニングに用いるキットを選択する。基本的にはクローニングには NEBuilder HiFi DNA Assembly をお勧めする。

DNA Assembly 選択チャート

	NEBuilder HiFi DNA Assembly (NEB #E2621) (NEB #E5520) (NEB #E2623)	Gibson Assembly (NEB #E5510) (NEB #E2611)	NEB Golden Gate Assembly Kit (BsaI-HFv2, BsmBI-v2) (NEB #E1601) (NEB #E1602)	USER Enzyme (NEB #M5505) Thermolabile USER II Enzyme (NEB #M5508)
特長				
5' および 3' 末端のミスマッチ除去	***	★	N/A	N/A
連結部分の正確性	***	★★	***	***
連結部分にリピート配列がある場合	★	★	***	***
完全連結（ニックがない）	***	***	***	NR
1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA の連結	***	★★	NR	NR
微量 DNA のアッセンブリ	***	★★	★★	★★
オーバーラップ配列の柔軟性	***	***	★	★★
アプリケーション				
2 断片のアッセンブル（インサート DNA とベクター）	***	***	***	***
3～6 断片のアッセンブル	***	***	***	***
7～11 断片のアッセンブル	***	★★	***	***
12～35 断片のアッセンブル ⁽¹⁾	★	★	***	NR
<i>In vitro</i> 翻訳のテンプレート調製	***	***	***	***
全ゲノムの人工構築	***	★	★	★
部位特異的変異導入（複数）	***	★★	★★	★★
クローンライブラリーの調製	***	***	***	★★
代謝経路のエンジニア	***	★★	***	***
TALENs	★★	★★	***	★★
短鎖ヘアピン RNA のクローニング（shRNA）	***	★★	★	★
ゲノム RNA のクローンライブラリー調製	***	★★	★	★
大きなサイズの DNA のクローニング（> 10 kb）	***	***	***	★★
小さいサイズの DNA のクローニング（< 100 bp）	***	★	***	***
制限部位の消失	***	★	NR	★

KEY

*** 最適、そのアプリケーションに推奨

★★ そのアプリケーションで良好に使用可能

★ そのアプリケーションに使用できるが、推奨せず

(1) ウェブサイト：www.neb.com/GoldenGate を参照

N/A 使用できない

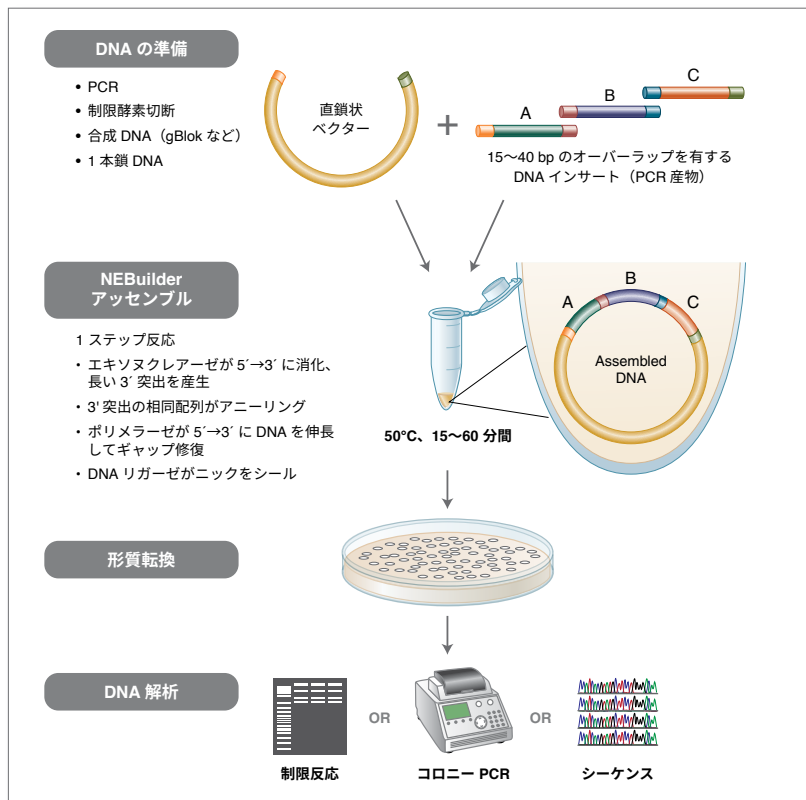
NR 推奨しない



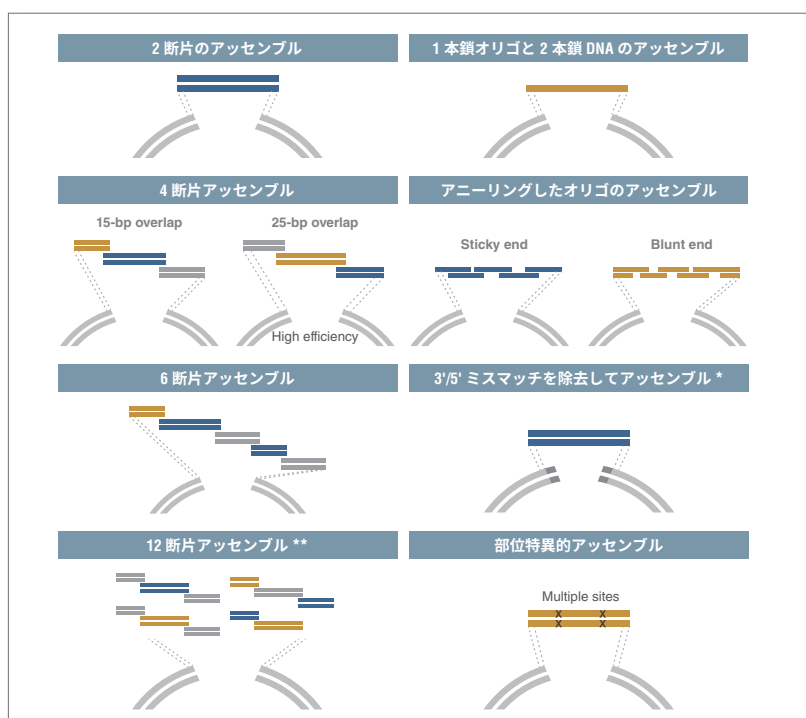
NEBuilder HiFi DNA Assembly

3種類の酵素、すなわち 5' → 3' exonuclease、DNA Polymerase、*Taq* DNA Ligase を使用するアッセンブル法である。DNA 末端にもう一方の DNA との相同配列を付加しておく。通常は 15 bp、PCR プライマーに付加しておけばよい。50°C、15 分間で DNA のアッセンブルが完了する。

NEBuilder HiFi DNA アッセンブリーのワークフロー



NEBuilder Assembly はシンプルなクローニング (2 断片のアッセンブル) だけではなく、様々なクローニングに応用ができる。



* ベクター末端に不要な配列がある場合、これを除去したアッセンブルが可能 (< 10 bp)

** ベクター + 11 インサート

製品

NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB #E5520)

NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB #E2621)

NEBuilder HiFi DNA Assembly Bundle for Large Fragments (NEB #E2623)

特長

- 15 ~ 60 分間でアッセンブル
- 平滑末端、5' / 3' 突出末端 DNA をアッセンブル
- 末端が揃っていないくともシームレス (余分な配列を残さず) にクローニング
- 6 本以上の複数 DNA 断片の一括アッセンブル
- 1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA をアッセンブル

技術情報

www.neb.jp/re/Assembly

- オンラインチュートリアル (アッセンブル & プライマーデザイン)
- アプリケーションノート (sgRNA コンストラクトの作成など)
- オンラインツール: NEBuilder Assembly tool

2 断片のアッセンブル: 最もシンプルなアッセンブルである。インサート DNA の両末端に 15 bp のベクターとの相同配列を入れておく。120 bp 以上のインサート長が必要である。

4 断片アッセンブル: 複数断片 (4 断片) をアッセンブルできる。それぞれの相同配列を付加しておく。

6 断片アッセンブル: 複数断片 (6 断片) をアッセンブルできる。それぞれの相同配列を付加しておく。

12 断片アッセンブル: 複数断片 (12 断片) をアッセンブルできる。それぞれの相同配列を付加しておく。

1 本鎖オリゴと 2 本鎖 DNA のアッセンブル: ベクターに 1 本鎖 DNA をアッセンブルできる。この際、相同配列は 30 bp 以上と長くする。

アニーリングしたオリゴのアッセンブル: 複数の合成オリゴと 2 本鎖ベクターをアッセンブルできる。オリゴはそれぞれがオーバーラップするように設計する。

3' / 5' ミスマッチを除去してアッセンブル: ベクター末端に余分な倍列があった場合、これを除去してアッセンブルできる (< 10 bp)。インサート DNA に付加する相同配列を設計するときに、余分な配列をスキップしておく。

部位特異的アッセンブル: インサート DNA を PCR 増幅する際、プライマーの特異的配列部分に変異を入れておけば、それを反映した組換え DNA が作出できる。



NEBuilder HiFi DNA Assembly プロトコール

1. プライマーの設計と PCR

ベクターとの相同配列 (15 ~ 30 bp) を付加したプライマーを設計する。この際、オンラインツール：NEBuilder Assembly Tool ([NEBuilder.neb.com](https://nebuilder.neb.com)) を使う。この時、設計されたプライマー配列に加えて、Tm 値および PCR アニーリング温度も表示される。17 ページのプロトコールに従って、Q5 DNA Polymerase で PCR を行う。PCR 産物中に非特異的増幅がみられない場合、クリーンアップの必要なくアッセンブルができるが、効率向上のためにクリーンアップを推奨する。もし非特異的増幅があれば、アガロースゲル電気泳動のゲル抽出で目的 DNA を精製する (15 ページ)。

2. ベクターの切断 (直鎖状化)

ベクターを制限酵素で切断する。NEBuilder では原理的にセルフアニーリングは起こらないため、ダブルダイジェストをする必要はない。切断産物はアガロースゲル電気泳動のゲル抽出で精製しておく。または、制限酵素で切断せず、インバース PCR でベクター骨格の必要部分を増幅してもよい。

3. アッセンブル

以下に注意して反応をセットアップ、50°C で 15 分間インキュベーションする。インサートサイズが長い場合や複数断片の場合には 60 分間にする。アッセンブル後は -20°C で保存ができる。製品付属のコントロール DNA を使用してポジティブコントロール反応も行う。

	反応に使用する DNA 比と量		
	2-3 Fragment Assembly	4-6 Fragment Assembly	NEBuilder Positive Control
DNA モル比	vector:insert = 1:2	vector:insert = 1:1	
DNA 量 (トータル)	0.03-0.2 pmol X µl	0.2-0.5 pmol X µl	10 µl
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	10 µl	10 µl	10 µl
ヌクレアーゼフリー水	10-X µl	10-X µl	0
全反応容量	20 µl	20 µl	20 µl

4. 形質転換

アッセンブル反応後、2 µl の溶液をそのままコンピテントセル (NEB #C2987 または NEB #C3019) に形質転換する。自作もしくは他社のコンピテントセルを使用する場合、5 µl のアッセンブル溶液に 15 µl の純水を加えて 4 倍希釈をしたものを 2 µl 使用する。

	標準プロトコール *
DNA	2 µl
コンピテントセル	50 µl
インキュベーション	氷上、30 分間
ヒートショック	42°C、30 秒間
インキュベーション (Outgrowth)	(1) 氷上、5 分間 (2) 室温に戻しておいた SOC 培地を 950 µl 加える (3) 37°C、60 分間

* 使用するコンピテントセルの推奨プロトコールに従う

5. 確認

コロニー PCR などで確認をする。32 ~ 33 ページを参照する。複雑なアッセンブルの場合、シーケンスも確認しておくといよい。

NEBuilder アッセンブリのヒント

アッセンブル反応

- マニュアルに記載のインサート DNA：ベクターのモル比および反応系中の DNA の総モル数に従う。
- インサート DNA の両末端にベクターとの相同配列 (15 ~ 30 bp) を付加しておく。
- PCR 産物は非特異的増幅がみられなければクリーンアップの必要はないが、持ち込み量は 20% 以下とする。ただしクリーンアップをした方が効率は高い。
- キット付属のコントロール DNA を用いる。

プライマー設計

- オンラインツール：NEBuilder Assembly Tool ([NEBuilder.neb.com](https://nebuilder.neb.com)) を使うといよい。設計したプライマー内にオーバーラップが含まれること、最終産物が目的に合致していることを確認する。
- オーバーラップの長さが適切であることを確認する。アッセンブルする断片数が多いほど、オーバーラップの長さを長くするとよい。

形質転換

- できる限り形質転換効率が高いコンピテントセルを使用する。NEB 5-alpha High Efficiency Competent *E. coli* (NEB #C2987) または NEB 10-beta High Efficiency Competent *E. coli* (NEB #C3019) を推奨。
- 他社もしくは自作のセルを使用する場合にはアッセンブル反応溶液を希釈したものを用いる。



POINT!

- [NEBuilder.neb.com](https://nebuilder.neb.com) でプライマーをデザイン
- 反応中の DNA 量とモル比が重要
- 日本語マニュアル完備





Golden Gate Assembly

Golden Gate Assembly は Type IIS 制限酵素と T4 DNA Ligase を利用したアッセンブル方法である (1、2)。ベクターにインサート DNA を入れるシンプルなクローニングはもちろん、複数の DNA のクローニングができる。特にインサート DNA を保有するプラスミドストックから好きなものを選択して色々な組み合わせのクローンを作成することに向いている。反応は一定温度（制限酵素による）か、一定温度と 16°C の繰り返しサイクルで行う (3、4)。

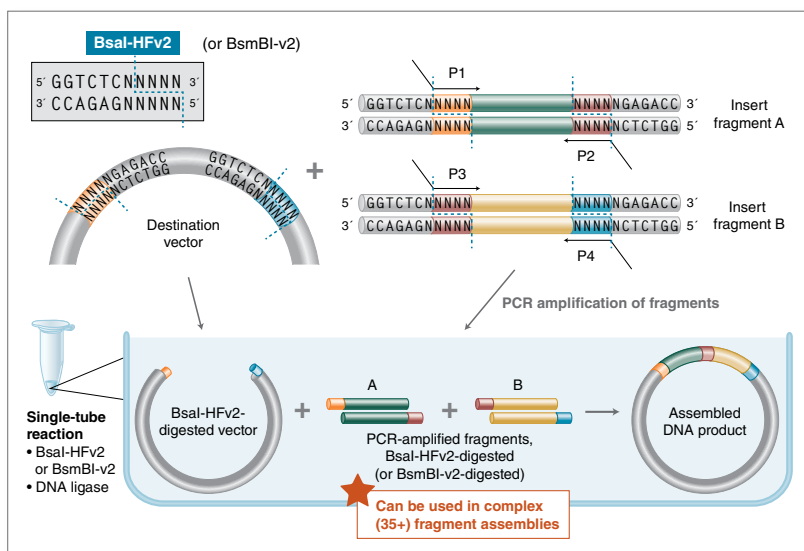
リガーゼの正確性

PCR 酵素の正確性はよく知られているが、リガーゼの正確性についてはあまり知られていない。NEB はリガーゼ毎に正確性の違いがあること、それに連結部分の突出末端配列も正確性に影響を及ぼすことを発見した (5)。このデータに基づいて連結部分の配列を設計することにより、正確なアッセンブルが可能となり、また同時にアッセンブルできる断片数も 50 以上となった。

Golden Gate に使用できる Type IIS 制限酵素

NEB は様々な Type IIS 制限酵素（認識配列の外側を切断）を提供しているが、多くは Golden Gate Assembly に使用できる。特にお勧めなものを右に記載する。

Golden Gate Assembly のワークフロー



最も単純な Golden Gate アッセンブリーの場合、dsDNA 断片の両端に Type IIS 制限酵素の認識部位（この例では BsaI (GGTCTC)）を付加しておく必要がある。制限酵素での切断後、これらの部位は残り、各断片にはアッセンブリーを方向付ける 4 塩基の突出末端が生じる。

References:

- Engler, C. et al. (2008) *PLoS ONE*, 3; e3647.
- Engler, C. et al. (2009) *PLoS ONE*, 4; e5553.
- Lee, J.H. et al. (1996) *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 13; 139-145.
- Padgett, K.A. and Sorge, J.A. (1996) *Gene*, 168, 31-35.
- Potapov, V. et. al. (2018) *ACS Synth. Biol.* DOI: 10.1021/acssynbio.8b00333.

推奨製品と特長

NEB Golden Gate Assembly Kit (BsaI-HF v2) (NEB #E1601)

NEB Golden Gate Assembly Kit (BsmBI-v2) (NEB #E1602)

- 余分な配列を付加しないシームレスなクローニング
- ベクター（Destination Plasmid）付属
- 複数断片を一度にアッセンブル (2 - 35+)
- GC リッチ配列やリピート配列のアッセンブル
- 様々なサイズの DNA をアッセンブル (> 15 kb, < 100 bp)
- オンラインツール (Goldengate.neb.com) で簡単にプライマーをデザイン
- Ligation Fidelity Tools でアッセンブルデザインをアシスト

NEBridge Ligase Master Mix (NEB #M1100)

- 任意の Type IIS 制限酵素と組み合わせた Golden Gate

Golden Gate Assembly 用制限酵素

- | | |
|--------------------------|----------------------|
| - BsaI (NEB #R0539) | - BtgZI (NEB #R0703) |
| - BsaI-HF (NEB #R3539) | - Esp3I (NEB #R0734) |
| - BsaI-HFv2 (NEB #R3733) | - PaqCI (NEB #R0745) |
| - BsmBI-v2 (NEB #R0739) | - SapI (NEB #R0569) |
| - BspQI (NEB #R0712) | |

技術情報 & ツール

www.neb.com/GoldenGate

- Golden Gate Assembly 法とリガーゼの正確性に関する文献とプロトコル
- 各断片数のアッセンブルデータ
- オンラインツール: NEB Golden Gate Assembly Tool を公開
- オンラインツール: Ligase Fidelity Tools を公開、突出末端の正確性をシミュレーション可能
- 概要やリガーゼ正確性、Type IIS 制限酵素などの動画
- MoClo のガイドライン



Golden Gate Assembly の原理



Golden Gate Assembly プロトコール

ここではインサート DNA を PCR で調製する方法を記す。詳細はウェブサイトもしくは製品プロトコールを参照する。

1. Type IIS 制限酵素の選択

目的 DNA（インサート DNA）およびベクター骨格中に制限部位がない Type IIS 制限酵素を選択する。オンラインツール：NEBcutter が便利である。仮に制限部位があったとしても、1 部位であれば、かつシンプルなクローニング（シングルインサート DNA とベクターのアッセンブル）であれば、問題になることはほとんどないので、そのまま選択・使用してもよい。ただし複数断片のアッセンブルの場合は控えること。もし内部に制限部位があった場合、チュートリアル動画を参考にして解決方法を選ぶ。

2. プライマーの設計と PCR

Type IIS 制限酵素の認識配列が目的 DNA の内側を向くように設計する。アッセンブル面は正確性を考慮するとよい。オンラインツール：NEB Golden Gate Assembly Tool (goldengate.neb.com) を使えば、これらの点が考慮されたプライマーが設計できる。設計されたプライマー配列に加えて、Tm 値および PCR アニリング温度も表示される。17 ページのプロトコールに従って、Q5 DNA Polymerase で PCR を行う。PCR 産物中に非特異的増幅もしくはプライマーダイマーがみられない場合、クリーンアップの必要なくアッセンブルができるが、効率向上のためにクリーンアップを推奨する。もし非特異的増幅があれば、アガロースゲル電気泳動のゲル抽出で目的 DNA を精製する（15 ページ）。特にプライマーダイマーは持ち込まないようにする。

3. ベクターの選択

ベクターには 2 か所の Type IIS 制限酵素部位が必要である。キット：NEB #1601 などにはすぐに使用できる pGGAselect Destination Plasmid が付属しているため、これを使用するとよい。BsaI、BsmBI、BbsI を使用したアッセンブルに対応している。ミニプレップしたベクター／プラスミドを使用する場合、RNA 除去をしておく。

4. アッセンブルのセットアップ

以下に注意して反応をセットアップする。

	アッセンブル反応	ネガティブコントロール
pGGAselect Destination Plasmid*, 75 ng/μl	1 μl	1 μl
インサート DNA :	75 ng each plasmid	–
– プラスミド (precloned)**	2:1 molar ratio	
– PCR 産物 ***	(insert : vector; pGGAselect = 2155 bp; 75 ng = 0.05 pmol)	
T4 DNA Ligase Buffer (10X)	2 μl	2 μl
NEB Golden Gate Assembly Mix	1 - 2 μl	1 - 2 μl****
ヌクレアーゼフリー水	to 20 μl	to 20 μl

各注釈の詳細はマニュアルを参照

5. アッセンブル反応

インサートの数	アッセンブル反応
For 1 Insert	37° C, 5 min (cloning) or 37° , 1 hr (library preparation) → 60° C, 5 min
For 2-4 Inserts	37° C, 1 hr → 60° C, 5 min
For 5-10 Inserts	(37° C, 1 min → 16° C, 1 min) x 30 → 60° C, 5 min
For 11 - 20+ inserts	(37° C, 5 min → 16° C, 5 min) x 30 → 60° C, 5 min

6. 形質転換

アッセンブル反応後、2 μl の溶液をそのままコンピテントセル（NEB #C3019 を推奨）に形質転換する。10 倍希釈した内の 50 μl をクロラムフェニコール選択プレートに植菌する。

	標準プロトコール
DNA	2 μl
コンピテントセル	50 μl
インキュベーション	氷上、30 分間
ヒートショック	42°C、30 秒間
インキュベーション (Outgrowth)	(1) 氷上、5 分間 (2) 室温に戻しておいた SOC 培地を 950 μl 加える (3) 37°C、60 分間



POINT!

• goldengate.neb.com でプライマーと反応をデザイン

7. 確認

コロニー PCRなどで確認をする。32～33 ページを参照する。複雑なアッセンブルの場合、シーケンスも確認しておくといよい。



トラブルシューティングガイド (Traditional Cloning)

クローニング時にトラブルがあった場合を想定して、以下のコントロール反応を行うことを推奨する。このコントロール反応により、どのステップに問題があったかを特定でき、それに基づいた改善ができる。

- 100 pg ~ 1 ng の未切断ベクターを形質転換し、コンピテントセルの状態やベクター状の薬剤耐性能を確認する。
- 切断した直鎖状ベクターを形質転換し、その中の未切断ベクターに由来するバックグラウンドの割合を確認する。この反応では未切断ベクターの形質転換時のコロニー数に比べて（コントロール 1）、1%以下となることが好ましい。
- ベクターだけをライゲーションしたもの（インサートなし）を形質転換する。切断面の異なる 2 種類の制限酵素で切断している場合、あるいは脱リン酸化を行っている場合には原理的にセルフライゲーションされないはずである。この場合、コントロール 2 と同様、1% 以下のコロニー出現頻度となる。
- ベクターを 1 種類の制限酵素で切断、ライゲーションしたものを形質転換する。未切断ベクターを形質転換したコントロール 1 と同様のコロニー数が得られることを確認する。

クローニングにおいては、DNA を正しく定量することも重要であるため、できる限り各工程で DNA 定量を行うことを推奨する（43 ページ参照）。

問題	原因	改善方法
形質転換体がほとんど得られない、または全く得られない	大腸菌が死滅	pUC19 などの未切断ベクターを形質転換し、効率を確認する。もし形質転換効率が 10^4 以下の場合、コンピテントセルを再調製もしくは購入しなおす
	抗生物質の種類または濃度が不適切	- 実験に合った抗生物質の種類と濃度を確認する - 抗生物質を調製しなおす
	インサート DNA による細胞毒性	- やや低温で培養する（25 ~ 30°C） - 発現制御できる（ベクター発現を抑制できる）コンピテントセルを使用する（NEB 5-alpha F' /^q Competent <i>E. coli</i>, NEB #C2992 など）
	ヒートショック時の温度が高い	使用するコンピテントセルのマニュアルを確認する。ヒートショック時の温度が推奨よりも高い場合、細胞の死滅を引き起こす
	エレクトロポレーション時に PEG が混入	- 形質転換前に DNA を精製する - 精製不要な ElectroLigase (NEB #M0369) を使用する
	エレクトロポレーション時のアーキングもしくは電圧不足	- ライゲーション前に DNA を精製する - キューベットに泡が入らないようにする - 使用機器のマニュアルに従う
	プラスミドサイズが大きい	10 kb 以上のプラスミドを形質転換する場合、NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i> (NEB #C3019) を使用する - エレクトロポレーションで形質転換を行う
	プラスミドが大腸菌内で組換えられた	NEB 5-alpha (NEB #C2987) や NEB 10-beta (NEB #C3019) などの <i>RecA</i>⁻ 株を使用する
	哺乳類もしくは植物ゲノム由来の DNA を直接クローニングした	- 哺乳類もしくは植物ゲノム DNA はメチル化シトシンが含まれており、多くの大腸菌内で切断される - NEB 10-beta (NEB #C3019) のようなメチル化欠損株 (McrA, McrBC, Mrr 欠損) を使用する
	形質転換でライゲーション産物を多く使いすぎた	形質転換には 5 µl 以下のライゲーション産物を使用する
	ライゲーションが不十分	- ライゲーションに使用した DNA の 5' 末端がリン酸化されていることを確認する - ベクター：インサートのモル比を 1：1 から 1：10 の間で最適化する - DNA を精製してライゲーション反応を行う（NaCl や EDTA などの夾雑物が効率を低下させる） - バッファー中の ATP が凍結融解による分解されることがあるため、新しいバッファーを用いる - ライゲーション前に脱リン酸化を行っている場合、熱による不活性化が精製を行う 1 塩基突出末端のライゲーションには、Blunt/TA Ligase Master Mix (NEB #M0367) か、Quick Ligation Kit (NEB #M2200)、高濃度 Ligase (NEB #M0202T) を使用する - Lambda-HindIII digested DNA (NEB #N3012) を使用してリガーゼ活性を確認する
	リン酸化が不十分	- リン酸化の前に DNA を精製する - DNA が平滑末端あるいは 5' 陥没末端の場合、DNA とバッファーを混ぜたものを 70°C で 10 分間インキュベートする。その後速やかに氷上に移し、ATP と酵素を加えてリン酸化反応を行う - ATP が含まれていない T4 Polynucleotide Kinase (NEB #M0201) を使用する場合など、ATP を添加する 1X T4 PNK バッファーの代わりに T4 DNA Ligase バッファーを使用する。本バッファーには ATP が予め含まれている
	平滑化が不十分	- 平滑化の前に制限酵素を不活性化あるいは除去する - 平滑化の前に PCR 産物を精製する - ゲノム DNA を超音波で断片化した場合、多くは突出末端となるため、最低 30 分間の平滑化を行う - 使用する酵素は最大 1 unit/µg DNA とする 15 分以上インキュベートしない - T4 DNA Polymerase (NEB #M0203) の場合は 12°C 以下、Klenow (NEB #M0210) の場合は 24°C 以下でインキュベートする - 十分な dNTP が含まれていることを確認する。Klenow (NEB #M0210) の場合は 33 µM、T4 DNA Polymerase (NEB #M0203) の場合は 100 µM を推奨する - Mung Bean Nuclease (NEB #M0250) を使用する場合、室温で 30 分間以下の反応を行う。1 unit/µg DNA 以上の酵素を使用しない



問題	原因	改善方法
形質転換体がほとんど得られない、または全く得られない	3' A 付加が不十分	A 付加を行う前に PCR 産物を精製する。高正確性 DNA ポリメラーゼは 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するため、十分精製を行う
	制限酵素による切断が不十分	- 制限酵素のメチル化感受性およびベクター配列を確認する - 酵素付属の最適バッファーを用いる - 制限反応前に DNA を十分に精製する - 少なくとも 6 個のヌクレオチドを制限酵素部位の上流に付加したプライマーを再設計する
形質転換体に空ベクターしか含まれていない (インサートが挿入されていない)	抗生物質の濃度が低い	- 抗生物質の濃度を高くする (推奨濃度を用いる) - 抗生物質を新たに調製する
	サテライトコロニーをピックアップした	大きく、早くに出現したコロニーを選択する
形質転換体に目的以外のプラスミドが含まれている	大腸菌内でプラスミドが組換えられた	NEB 5-alpha (NEB #C2987) や NEB10-beta (NEB #C3019) などの <i>RecA</i>⁻ 株を使用する
	非特異的な PCR 産物が夾雑	- PCR 条件を最適化する - PCR 産物をゲル精製する (モナーク・ゲル抽出キット、NEB #T1020)
	制限部位が内部に存在	クローニングに使用した制限部位が内部に存在するかを確認する
	目的 DNA がホストに毒性を示した	- やや低温で培養する (25 ~ 30°C) - 発現制御できるコンピテントセルを使用する (NEB 5-alpha F' I^s Competent <i>E. coli</i>, NEB #C2992)
	変異導入	- 高正確性 DNA ポリメラーゼを使用する Q5 DNA Polymerase (NEB #M0491) の使用を推奨する - シーケンスで配列を再確認する
バックグラウンドが多い	脱リン酸化が不十分	脱リン酸化前に制限酵素を失活または除去する
	キナーゼが残存	キナーゼの失活が不十分な場合、脱リン酸化ベクターが再リン酸化される
	未切断ベクターが多い (制限酵素の切断が不十分)	- 制限酵素のメチル化感受性およびベクター配列を確認する - 酵素付属の最適バッファーを用いる - 制限反応前に DNA を十分に精製する
	抗生物質の濃度が低い	抗生物質の濃度を高くする (推奨濃度を用いる)
ライゲーション産物を電気泳動してもバンドが観察されない	ライゲーションが不十分	- ライゲーションに使用した DNA の 5' 末端がリン酸化されていることを確認する - ベクター：インサートのモル比を 1：1 から 1：10 の間で最適化する - DNA を精製してライゲーション反応を行う (NEB #T1030) - 新しいバッファーを用いる (ATP の劣化に注意する) - ライゲーション前に脱リン酸化を行っている場合、熱による不活性化が精製を行う 1 塩基突出末端のライゲーションには、Blunt/TA Ligase Master Mix (NEB #M0367) か、Quick Ligation Kit (NEB #M2200)、高濃度 Ligase (NEB #M0202T) を使用する
ライゲーション産物が電気泳動上でスメアになる	リガーゼが DNA に結合	電気泳動前に Proteinase K (NEB #P8107) で処理する
制限酵素消化産物が電気泳動上でスメアになる	制限酵素が DNA に結合	- 酵素量を減らす - 制限産物に終濃度 0.1 ~ 0.5% の SDS を加えてから電気泳動に供する
	ヌクレアーゼの混入	- 新しい泳動バッファーを使用する - 新しいゲルを使用する - DNA を精製する (NEB #T1030)
制限酵素切断が不十分	メチル化による切断のブロック	- 大腸菌で調製したプラスミドが Dam/Dcm メチル化されている - 哺乳類ゲノム由来の DNA が CpG メチル化されている - 使用する制限酵素のメチル化感受性とベクター配列を確認する - 制限酵素が Dam/Dcm メチル化でブロックされる場合、<i>dam-/dcm-</i> 株 (NEB #C2925) を使用してプラスミドを調製する
	塩による阻害	- NEBuffer r3.1 で低い活性を示す制限酵素は特に塩で阻害されやすいため、DNA を十分に精製する - スピニングカラムで DNA 精製を行った場合、塩が残留しやすいため、全反応溶液量の 25%未満の DNA を使用する
	PCR 溶液成分による阻害	制限反応前に PCR 産物を精製する (NEB #T1030)
	不適切なバッファー	製品付属の最適バッファーを使用する
	酵素量が少ない	酵素量を増やす (1 µg DNA あたり 5 ~ 10 units)
	反応時間が短い	反応時間を長くする
	スーパーコイル DNA を切断	酵素量を増やす (1 µg DNA あたり 10 ~ 20 units)
	サイトプレファランス	酵素によっては特定の配列に対する切断効率が低いため、反応時間を長くする。
	2 箇所認識部位が必要	一部の制限酵素は DNA 中に 2 箇所の制限部位を必要とする。酵素情報を再確認する
	サンプル DNA 中に阻害剤が混入	- コントロール DNA とサンプル DNA を混ぜて切断する。もし阻害剤が混入していればコントロール DNA が切断されない。ミニプレップ DNA には阻害剤が混入しやすい - スピニングカラムなどで DNA を精製する - 全反応容量を増やして阻害剤を低濃度にする



トラブルシューティングガイド (Traditional Cloning) (続き)

問題	原因	改善方法
ゲル上で非特異的バンドが観察される	高分子バンドが観察される場合、酵素と DNA が結合	- 酵素量を減らす - 制限産物に終濃度 0.1 ~ 0.5% の SDS を加えてから電気泳動に供する - Gel Loading Dye, Purple (NEB #B7024) を使用して泳動する
	スター活性	- 酵素付属の最適バッファーを使用する - 酵素量を減らす - 反応に使用する制限酵素は全容量の 10% 以下とし、スター活性を防ぐためにグリセロール濃度が 5% 以下となるようにする - 反応時間を短くする - HF 制限酵素を使用する
	制限反応が不十分	- NEBuffer r3.1 で低い活性を示す制限酵素は特に塩で阻害されやすいため、DNA を十分に精製する - スピンカラムで DNA 精製を行った場合、塩が残留しやすいそのため、全反応溶液量の 25% 未満の DNA を使用する - 制限反応前に PCR 産物を精製する - 製品付属の最適バッファーを使用する 1 µg DNA あたり 3 ~ 5 units の酵素を使用する 1 ~ 2 時間反応する
PCR 産物が検出されない	プライマーが不適切	プライマー配列を再確認する
	アニーリング温度が不適切	Tm Calculator (TmCalculator.neb.com) を使用して正しいアニーリング温度を設定する
	伸長反応が不適切	ポリメラーゼによって伸長温度と速度が異なるため、説明書に従う
	ポリメラーゼの量が少ない	反応系に適切な酵素量を用いる
	プライマー濃度が不適切	ポリメラーゼによって最適プライマー濃度が異なるため、マニュアルを確認する
	Mg ²⁺ 濃度が不適切	Mg²⁺ 濃度を最適化する
PCR 産物がゲル上でスメアになる	テンプレートが複雑	異なるポリメラーゼやバッファーを用いる。Q5 DNA Polymerase (NEB #M0491) をお勧めする
	高分子側にスメアなバンドが観察された場合、酵素と DNA が結合	- 制限産物に終濃度 0.1 ~ 0.5% の SDS を加えてから電気泳動に供する - Gel Loading Dye, Purple (NEB #B7024) を使用して泳動する
PCR 産物中に非特異的バンドがある	アニーリング温度が低い	Tm Calculator (TmCalculator.neb.com) を使用して正しいアニーリング温度を設定する
	Mg ²⁺ 濃度が不適切	Mg²⁺ 濃度を最適化する
	プライミングサイトが他に存在	プライマーおよびテンプレート配列を確認する
	プライマーダイマー	プライマー配列を再設計する
	ポリメラーゼが不適切	異なるポリメラーゼやバッファーを用いる

DNA Assembly (NEBuilder & Golden Gate) のトラブルシューティングガイドはウェブサイト参照：www.nebj.jp/re/Assembly



微量分光光度計による核酸濃度・純度分析

はじめに

微量分光光度計 (MSV) は核酸サンプルの分析に一般的に使用されている。この種の分光光度計は、必要なサンプル量が少なく (0.5 ~ 2.0 µl)、経済的で使用しやすく、広く市販されている。通常、1 ng/µl の低濃度の核酸を測定でき、あらゆる種類の核酸とタンパク質を測定することができる。微量分光光度計で測定される濃度および純度の値は多くの場合に信頼性が高いが、より深く理解することにより、サンプルの品質および下流実験への適合性について有意義な知見を得ることができる。

本項では、微量分光光度計の測定値をどのように解釈し、使用するかについて詳細な説明とガイダンスを示す。シリカスピンカラムを用いて精製した核酸サンプルに焦点を当てた上で、以下のトピックスについて説明をする。

1. 濃度および純度の測定に最適な核酸濃度範囲
2. タンパク質の夾雑
3. バッファの夾雑
4. その他の夾雑
5. DNA サンプルの RNA の夾雑
6. 水または緩衝液中における核酸の測定

特記しない限り、微量分光光度計は Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific) を使用した。本機の仕様は、検出下限が 2 ng/µl、再現性は 2 ~ 100 ng/µl の濃度範囲において 2 ng/µl、または > 100 ng/µl の濃度で 2% である。

背景

濃度・純度測定の標準実施法は、分光光度計による紫外線吸光度測定である。核酸濃度は紫外線吸光度を測定して求める。ランベルト・ベールの法則に従うと、260 nm において吸収される光の量が溶液中の核酸の濃度に比例する。dsDNA、RNA、ssDNA の吸光係数が経路長 10 mm を使用して算出されており、標準曲線がない場合、吸光係数から変換係数を求めることができる。このような変換係数は次の通りである。

- dsDNA については 50 µg/ml
- RNA については 40 µg/ml
- ssDNA については 33 µg/ml

たとえば、 $A_{260} = 1$ の dsDNA サンプルの濃度は 50 µg/ml である。

また、サンプル純度の指標として、260 nm における吸光度と 280 nm における吸光度の比 (A_{260}/A_{280}) および 260 nm における吸光度と 230 nm における吸光度の比 (A_{260}/A_{230}) を求めることができる。

A_{260}/A_{280} 比

A_{260}/A_{280} 比は存在する核酸の種類 (dsDNA または RNA) に関する情報となるほか、純度の目安となる。一般に、タンパク質混入はこの比の低下で検出できる。RNA 混入はこの比の増大で検出できる。緩衝した溶液中では、純粋な dsDNA の A_{260}/A_{280} 比は 1.85 ~ 1.88 であり、純粋な RNA の A_{260}/A_{280} 比は約 2.1 である。

A_{260}/A_{230} 比

A_{260}/A_{230} 比は、230 nm で吸収される混入物質の感度の高い指標である。このような混入物質は 280 nm で吸収される混入物質よりもはるかに多く、グアニジンチオシアン酸塩 (GTC) やグアニジン塩酸塩 (GuHCl) などのカオトロピック塩、EDTA、Triton™ X-100 や Tween 20 などの非イオン性界面活性剤、タンパク質、およびフェノールが含まれる。ポリサッカライドなどの物質やシリカ繊維などの浮遊性固形粒子がこの波長で吸収されるが、影響は比較的弱い。

緩衝した溶液中では、純粋な dsDNA の A_{260}/A_{230} 比は RNA よりもわずかに高く、一般に報告されている値は dsDNA で 2.3 ~ 2.4、RNA で 2.1 ~ 2.3 である。 A_{260}/A_{230} 比の標準偏差は A_{260}/A_{280} 比よりも一般に大きいので、慎重に解釈する必要がある。

通常の試験室業務では、 A_{260}/A_{280} 比および A_{260}/A_{230} 比が 1.8 を超える DNA サンプルおよび RNA サンプルは「クリーン」とみなされ、大半のダウンストリームアプリケーションへの使用に適している。

1 濃度および純度比の測定に最適な核酸濃度範囲

MVS 装置のサプライヤーは検出限界を 0.5 ~ 2 ng/µl に規定しているが、20 ng/µl 未満では純度比の信頼性が損なわれると警告している。低濃度の場合には、蛍光ベースの方法 (「Qubit」など) がより適した代替法になるかという点が議論されることが多い。このような問題に取り組むために、TE 緩衝液で調製した 150 ng/µl から 1 ng/µl までの希釈系列について分析を行った (表 1A ~ C)。測定を 3 回繰り返して実施し、濃度および純度比のデータを収集した。比較のために、同じ DNA 希釈系列を Qubit で 3 回測定し、その平均値をデータに含めた。

濃度測定値

表 1A に示した濃度データは、5 ng/µl 以下の濃度 (黄) ではデータに大きな広がりがあることを示しており、これは相対標準偏差に現れている。しかし、繰り返し測定を行うことで、比較的正確な結果を得ることができる。5 ng/µl 以下では、Qubit の測定値は偏差は大きくないものの、精度は全体としてわずかに劣る。MVS に比べ蛍光測定法は時間とコストがかかることから、純度が十分に高い (核酸種を十分分離できる高品質シリカキットで精製したものなど) 1 ng/µl 以上のサンプルの濃度を評価する場合には MVS が推奨ツールとなる。

純度比の測定

3 回の測定値のばらつきからわかるように、20 ng/µl 未満の濃度 (青) では A_{260}/A_{280} 比は不安定である (表 1B)。特記すべきは、20 ~ 50 ng/µl の範囲 (黄) でもばらつきが比較的大きいことであり、平均値が高くなりすぎる傾向がある。これよりも高い濃度 (緑) の測定を行う場合にのみ、一貫した信頼性ある値を得られる。

A_{260}/A_{230} 比についても同様の傾向が見られる (表 1C)。20 ng/µl 未満の濃度 (青) ではこの比は不安定であり、20 ~ 50 ng/µl (黄) における値は慎重に使用する必要がある。この濃度範囲では A_{260}/A_{230} 比が高くなりすぎ、ばらつきが大きい。50 ng/µl を超えると値の信頼性が高くなる (緑)。全体として、 A_{260}/A_{230} 比の標準偏差は A_{260}/A_{280} 比よりも大きい。RNA についても同様の傾向が認められる (表 5B)。

要約:

純度が極めて高い核酸溶液を扱う場合には、以下のことが言える。

- MVS は 1 ng/µl を下限とする濃度範囲において有効に使用できる。
- 5 ng/µl 以下の濃度範囲で正確に定量するには、測定を数回繰り返すことが必要である。
- 全体として、蛍光法による測定値は精度および再現性の面で優れているとは言えないが、低濃度のサンプルについては再現性が比較的高い結果が得られる。
- A_{260}/A_{230} 比は A_{260}/A_{280} 比よりもばらつきが大きい。
- 20 ng/µl 未満の濃度ではこの 2 つの純度比はともに不安定であり、50 ng/µl まではばらつきが比較的大きい (高くなりすぎる傾向がある)。数回繰り返し測定することが推奨される。



2 タンパク質混入

核酸サンプルにタンパク質が多く混入している場合、タンパク質／DNA 混合物と同等の紫外線吸収スペクトルを示す。一般に、 A_{260}/A_{230} 比に対する影響が強く、 A_{260}/A_{280} 比に対する影響は小さい。タンパク質の紫外線吸収は核酸に比べて低いことから、 A_{260}/A_{280} 比がタンパク質混入の兆候を示しているのであれば、比較的少量のタンパク質が存在することになる。また、核酸濃度が低い場合、タンパク質混入は純度比に大きく影響するが、核酸濃度が高い場合にはタンパク質混入は検出されにくいことがある。

図 1 に、純粋 DNA (赤) または純粋タンパク質 (青) を含むサンプル、または規定の濃度の混合物 (紫) から得た紫外線 - 可視光線スペクトルを示す。タンパク質の典型的な紫外線吸収スペクトルは 220 ~ 230 nm の範囲で強いピークを示し、280 nm 付近に高さおよそ 1/10 のショルダーが見られる (図 1)。純度比に対するタンパク質混入の影響は 200 ng/μl の DNA サンプルに比べ 25 ng/μl のサンプルで大幅に大きい。したがって、純度比は混入の相対的指標とみなすべきであり、常に測定する核酸濃度範囲に照らして考える必要がある。

表 2 に、TE 緩衝液で調製した様々な濃度の BSA タンパク質を添加したとき、4 レベルの DNA 希釈液の純度比に対してどのような影響が生じるかを示す。DNA 濃度 100 ng/μl および 50 ng/μl ではタンパク質混入は A_{260}/A_{280} 比にほとんど影響しないが (緑)、DNA 濃度 25 ng/μl では同じタンパク質濃度で純度比に対する強い影響が見られ、大幅な混入が示唆される (黄)。また、DNA 濃度が低い場合にはタンパク質の存在が DNA 濃度測定値に影響するが (青)、DNA 濃度が高いと相対的影響ははるかに小さくなる。Nanodrop One など一部のシステムには、 A_{260} 値に対するタンパク質の影響を補正できるソフトウェアツールがある。

血液由来の核酸サンプルには 410 nm 付近で吸光するヘモグロビンが微量含まれていることがある。また、上記の影響が純度比に現れる。バックグラウンド吸光値の上昇も認められることがある。

要約：

- タンパク質混入は A_{260}/A_{280} よりも A_{260}/A_{230} に強く影響することから、タンパク質混入の評価には A_{260}/A_{230} の方が適している。
- 純度比に対するタンパク質混入の影響は核酸濃度に依存する：
 - 低濃度の核酸溶液のタンパク質混入は、濃度および純度の測定に強く影響する。
 - より高濃度の DNA サンプルでは、タンパク質混入の影響は過小評価される傾向がある。



表 1：MVS による DNA の濃度と純度の評価

TE 緩衝液で調製した NIH3T3 gDNA 原液を TE 緩衝液で希釈して表に示す DNA 希釈液を得た。濃度値 (OD_{260}) (A) および純度比 A_{260}/A_{280} (B)、 A_{260}/A_{230} (C) は、Nanodrop One で 3 回測定した。MVS 濃度値を、同じ希釈液について Qubit BR DNA キットを用いて蛍光法で 3 回測定した値と比較した。

サンプル濃度 (ng/μl)	微量分光光度計 (MVS)					蛍光法 (Qubit)	
	濃度測定値 (ng/μl)			平均濃度 (ng/μl)	相対標準 偏差 (%)	Qubit で測定した 平均濃度 (ng/μl)	Qubit 相対 標準偏差 (%)
	1	2	3				
1	0.3	1.2	1.6	1.0	66.9	0.7	3.8
2.5	1.9	2.9	2.8	2.6	21.3	2.0	4.2
5	4.9	5.2	5.2	5.1	3.5	4.6	4.1
10	9.1	9.9	9.9	9.6	4.5	9.1	1.7
15	13.8	15.2	14.2	14.4	5.0	13.7	1.9
20	19.7	19.5	19.6	19.6	0.5	19.0	2.1
25	25.0	24.9	25.0	25.0	0.3	23.8	0.3
30	29.0	29.5	29.2	29.2	0.9	28.4	1.9
40	38.4	39.8	39.8	39.3	2.1	37.3	1.2
50	48.1	48.4	49.3	48.6	1.3	47.5	1.0
75	71.8	72.3	74.5	72.9	2.0	72.7	3.2
100	93.0	98.4	97.8	96.4	3.1	99.4	1.5
150	147.4	149.2	147.9	148.2	0.6	151.2	0.7

サンプル濃度 (ng/μl)	$A_{260}/280$				相対標準偏差 (%)
	1	2	3	平均値	
1	5.91	1.11	2.83	3.28	74.2
2.5	3.80	1.89	1.60	2.43	49.1
5	1.93	1.85	1.70	1.82	6.5
10	1.95	1.85	1.78	1.86	4.7
15	1.80	1.86	2.04	1.90	6.6
20	1.86	1.77	1.93	1.85	4.4
25	1.86	1.86	1.92	1.88	1.7
30	1.85	1.87	1.92	1.88	1.9
40	1.91	1.85	1.88	1.88	1.5
50	1.86	1.84	1.90	1.87	1.6
75	1.86	1.84	1.86	1.86	0.8
100	1.86	1.86	1.86	1.86	0.3
150	1.87	1.86	1.86	1.86	0.2

サンプル濃度 (ng/μl)	$A_{260}/230$				相対標準偏差 (%)
	1	2	3	平均値	
1	-0.52	137883.58	2.13	12628.4	173.2
2.5	-2.60	6.03	8.84	4.09	145.8
5	12.97	3.28	4.40	6.88	77.0
10	5.94	3.28	2.99	4.07	39.9
15	3.62	2.90	3.08	3.20	11.6
20	3.17	3.02	3.09	3.09	2.5
25	3.10	2.91	3.09	3.04	3.5
30	2.94	2.37	2.89	2.73	11.5
40	3.02	2.85	2.94	2.94	3.0
50	3.02	2.79	2.75	2.85	5.0
75	2.95	2.77	2.81	2.84	3.3
100	2.80	2.74	2.80	2.78	1.3
150	2.83	2.77	2.76	2.79	1.4



3 核酸調製物中の緩衝液混入物質

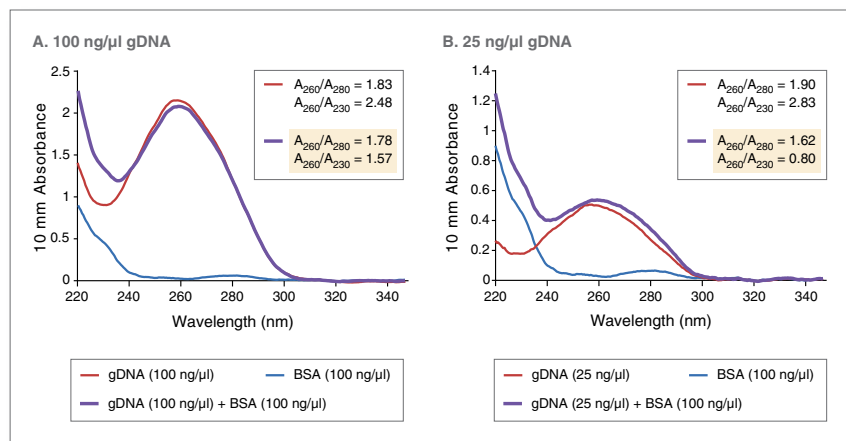
核酸精製キットの緩衝液に使用されている物質も、調製中に完全に除去されなければ、精製サンプルの紫外線吸収スペクトルに影響することがある。グアニジンチオシアン酸塩 (GTC)、グアニジン塩酸塩 (GuHCl) などのカオトロピック塩が結合緩衝液に使用されることが多い。溶解緩衝液中には Triton X-100、Tween 20 などの非イオン性界面活性剤が含まれることが多い。DNA 溶出緩衝液に多く使用される EDTA も吸収スペクトルに影響する。また、RNA 精製キットにはフェノール、TRIzol や同等の試薬が頻繁に使用され、紫外線 - 可視光線吸収の測定値に影響する可能性がある。なお、TRIzol にはフェノールと GTC の両者が含まれている。洗浄緩衝液に一般に使用されているエタノールも吸光度値にある程度影響することから、この分析に含めている。

前述の混入物質のそれぞれについて検出限界を求め、スペクトルを比較できるように、 $OD_{230} = 1$ に達するために必要な濃度も求めた (表 3)。後者の値を求めることで、混入物質スペクトルの相互比較を行える (図 2)。10 ~ 50 μM という少量の GTC および EDTA を検出できる。GuHCl などの他の物質の場合、50 mM を超える量が存在しなければ精製した核酸の純度比に影響を及ぼさない。シリカカラムからの溶出液中に 50 mM から 1 M の濃度で GuHCl が存在することは考えにくいことから、GuHCl による混入は紫外線 - 可視光線分光法では通常は検出されない。調査した



図 1：純度比に対するタンパク質混入の影響は DNA 濃度に依存する

TE 緩衝液で調製した NIH3T3 gDNA 原液をウシ血清アルブミン (BSA) タンパク質溶液 (NEB #B9000) と混合して表に示す濃度とした。このとき、EDTA 濃度は 1 mM に維持した。濃度値 (A_{260}) および純度比 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} を Nanodrop One で 3 回測定した。各サンプルから得た個々のスペクトルおよび純度比を示す。DNA 濃度が低い方が、タンパク質混入を純度比で検出しやすい。



濃度範囲では大半の混入物質は A_{260}/A_{230} のみ影響を及ぼすが、Triton X-100 は両方の純度比に影響する。

図 2 に、各物質のスペクトルとともに、その物質を含む 100 ng/ μl の gDNA 溶液のスペクトルを示す。混合物のスペクトルは全て、gDNA と混入物質の両者が寄与することを示している。唯一の例外はエタノールで、そのスペクトルはシグナルが均一に増加することを示している。

グアニジン塩／界面活性剤

以前に報告されたデータ (1) とは異なり、GTC の吸光度極大値は 240 ~ 260 nm ではなく 220 ~ 230 nm の範囲で見られる。GTC の吸光度極大値が 240 ~ 260 nm の範囲に割り付けられたのは、220 ~ 230 nm の範囲のシグナルを一部カットオフする Nanodrop システムソフトウェアのアーチファクトであると考え (2)。

GTC や非イオン性界面活性剤のような物質は紫外線吸収スペクトルに大きく影響すると思われるが、ダウンストリームのアプリケーションに対するその影響は無視できることが多い。Von Alflen および Schlumpberger は、相当量のカオトロピック塩が qPCR アッセイにキャリアオーバーされるが、これは qPCR 反応効率に影響しないことを明らかにした (2)。

フェノール

RNA 精製プロトコルに多く使用されるフェノールは、紫外線 - 可視光線範囲で光を強く吸収する。水相のフェノールを約 10,000 倍希釈しても、そのスペクトルを視認できる。TRIzol 試薬のスペクトルはフェノールのシグナルと極めて近似しているが、220 ~ 230 nm でも吸光が認められる。これは GTC の典型的な吸光である。図 3 に、既知量のフェノールまたは TRIzol と混合した RNA サンプルを、混入された RNA の典型例として示す。フェノールが高濃度で存在する場合には、スペクトルの 260 nm のピークが 270 nm に向かって明確にシフトすることを観察でき、両方の純度比がわずかに低下する。TRIzol は 260 nm のピークに対して同等の影響を及ぼすが、GTC が存在するため 220 ~ 230 nm で強い吸光が生じ、その結果として A_{260}/A_{230} が大きく低下する。



表 2：純度比に対するタンパク質混入の影響は DNA 濃度に依存する

TE 緩衝液で調製した NIH3T3 gDNA 原液を BSA タンパク質溶液 (NEB #B9000) と混合して表に示す濃度とした。このとき、EDTA 濃度は 1 mM に維持した。濃度値 (OD_{260}) および純度比 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} を Nanodrop One で 3 回測定した。

インプットした gDNA 濃度 (ng/ μl)	BSA 濃度 (mg/ml)	検出された核酸濃度 (ng/ μl)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
100	0	103.7	1.83	2.48
	200	105.3	1.73	1.13
	100	103.3	1.78	1.57
	50	100.7	1.82	2.04
	25	100.8	1.85	2.33
50	0	53.2	1.84	2.44
	200	55.3	1.60	0.76
	100	51.1	1.71	1.19
	50	50.8	1.78	1.66
	25	49.8	1.79	2.07
25	0	25.5	1.81	2.66
	200	29.4	1.45	0.48
	100	26.5	1.59	0.83
	50	25.0	1.67	1.21
	25	24.8	1.72	1.69
12.5	0	12.7	1.80	2.86
	200	16.3	1.21	0.29
	100	13.5	1.42	0.49
	50	12.2	1.55	0.77
	25	11.9	1.67	1.34



EDTA

DNA を分析する際には、ヌクレアーゼ活性を低下させるために EDTA が一般に使用される。EDTA は Mg^{2+} 、 Ca^{2+} などの二価陽イオンをキレート化する。しかし、EDTA が Mg^{2+} や Ca^{2+} と複合体を形成すると、この EDTA-陽イオン複合体の紫外線吸収は遊離 EDTA よりも低くなる。したがって、DNA 溶液に Mg^{2+} および Ca^{2+} イオンが含まれている場合には、このイオンが関心核酸の対イオンとして作用することから、230 nm の吸光度はブランクよりも低くなる。このため、クリーンな DNA の A_{260}/A_{230} は EDTA が存在しなければ一般に 2.4 を超えないが、EDTA およびキレート化した Mg^{2+} などの二価陽イオンを含む溶液中では 3.0 を超えることがある。日常的な分析では、TE 緩衝液中の純粋な gDNA の A_{260}/A_{230} 比が 2.6 ~ 3.0 となることが多いが、10 mM Tris (pH 8.5) 中で測定すると、この比が 2.3 ~ 2.4 となる。DNA 濃度が高いと、 A_{260}/A_{230} に対する EDTA の影響が小さくなる。

エタノール

水で希釈したエタノールは、230 ~ 240 nm で紫外線吸収のピークを示す。しかし、DNA 溶液中に存在すると紫外線吸収スペクトルに対する影響が低減し、 A_{260}/A_{230} が低下するほかは見た目では識別することはできない。イソプロパノールについても同様の影響が認められる（データは示さない）。

要約：

- GTC、EDTA、フェノールおよび Triton X-100 は紫外線吸収スペクトルに影響するとともに、特に A_{260}/A_{230} に大きく影響する。
- 他の混入物質、たとえば GuHCl や Tween 20 は、高濃度で存在する場合にのみ検出でき、シリカカラムで精製した核酸調製物から検出されることは考えにくい。
- タンパク質混入とは異なり、シリカカラムに使用した緩衝液の成分による混入がダウンストリームのアプリケーションに及ぼす影響は過大評価されることが多い。
- 低濃度の DNA 溶出液中とブランク中の遊離 EDTA 濃度のわずかな違いが、 A_{260}/A_{230} に強く影響する。TE 緩衝液ではこの比が 3.0 を超えることも珍しくない。
- エタノールは核酸吸光度スペクトルで明確に識別することはできないが、MVS を用いて単独または水に希釈して測定すると検出可能である。

4 その他の混入物質

ポリサッカライド（植物物質、アガロースなど）およびポリサッカライド（細菌、酵母など）が核酸調製物中に存在することがあり、バックグラウンド吸収を引き起こす。一部の MVS 機器（Trinean® Drosense 16、Unchained Labs Lunatic など）は、このバックグラウンドシグナルをフィルターを通して除去し、別個に表示できる（図 4）。しかし、全ての MVS システムでこのデコンボリューションを行えるわけではない。したがって、ポリサッカライドで混入されたサンプルでは A_{260}/A_{230} 比が低下し、 A_{260}/A_{280} 比がわずかに上昇することがあり、測定値のばらつきが大きくなる。

植物サンプル

純度が十分に高くない植物サンプル由来の核酸抽出物は、ポリフェノールが残留するため強いフェノール様のシグナルを示すか、ポリサッカライドによる弱いシグナルを示す。

このような不純物は主として A_{260}/A_{230} に影響し、バックグラウンド散乱を引き起こす。抽出中に特定の溶解ケミストリーを用いることで、ポリフェノールおよびポリサッカライドを除去できる（図 4）。



表 3：一般的な混入物質の検出限界

水に残留する緩衝液成分の検出可能な濃度には大きな幅がある。検出されるために必要な量が、シリカカラムからの溶出液について通常予測される量を上回ることもある（GuHCl などの場合）。

混入物質	検出限界	$OD_{230} = 1$
GuHCl	50 mM	2.5 M
GTC	10 μ M	0.6 mM
EDTA	20 μ M	1.25 mM
Triton X-100	0.0002%	0.012%
Tween 20	0.02%	1.50%
エタノール	2%	NA（20%使用）



図 2：一般的な混入物質の単独での紫外線吸収スペクトルおよび DNA と混合したときの紫外線吸収スペクトル

混入物質は $A_{230} = 1$ となるように TE 緩衝液で希釈し、その後単独で、また NIH3T3 細胞から得た gDNA 100 ng/ μ l と混合して測定を行った。全ての混合物のスペクトル（エタノール混合物を除く）は、DNA と混入物質の両者の吸光を反映している。混入物質は主として A_{260}/A_{230} に影響し、 A_{260}/A_{280} はほぼ不変のままであった。

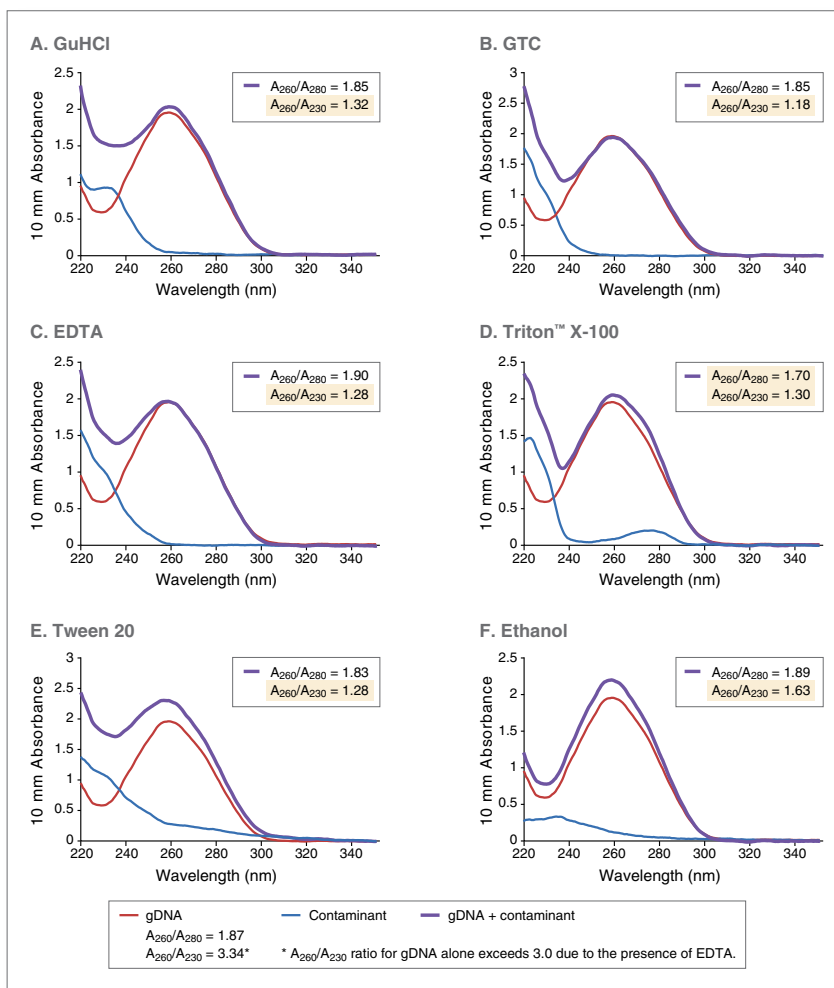
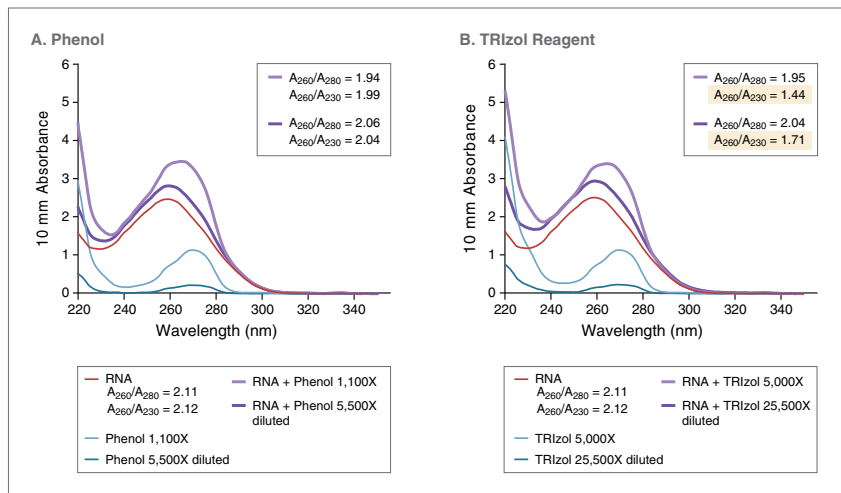




図3：RNA と混合したフェノールおよび TRIzol の紫外線吸収スペクトル

フェノールを水と混合し、上相の水を取り、これを希釈に用いた。TRIzol およびフェノールの水相を A_{270} がおよそ 1 になるまで希釈した。希釈率が 5 倍高い液も調製、両方の希釈液をラット肝由来の RNA 100 ng/μl と混合した。フェノールは両方の純度比に対し中程度の影響を及ぼした。TRIzol は GTC を含むため、 A_{260}/A_{230} に対してより強く影響した。



シリカ繊維

核酸サンプルにシリカ繊維が含まれている場合、同様のバックグラウンドシグナルが検出される。このような繊維は、溶出ステップでシリカメンブレンから遊離されることがあり、多量に存在すると溶出液中に白い濁りとして見られる。

シリカ繊維は遠心分離で溶液から除去できる。紫外線吸収スペクトルに対するシリカ繊維の影響は、ポリサッカライドの影響と同等である。図 5B に、シリカ繊維を含む QIAGEN® DNeasy® Blood & Tissue Kit を用いて分離した gDNA 溶出液を示す。Monarch ゲノム DNA 精製キット (NEB #T3010) カラムには、このような繊維を除去する固有のメンブレン層が使用されているため、よりクリーンな gDNA 溶出液が得られる (図 5A)。

吸光しない物質

核酸精製用の多くのシリカキットに使用されている最終洗浄緩衝液には一般にエタノールが含まれており、しばしば Tris も含まれている。このような緩衝液に NaCl も含まれていることもある。最終洗浄ステップ後にシリカメンブレンを遠心脱水しても、溶出液中に洗浄緩衝液の各成分が微量に存在することがある。これを説明する事実として、シリカカラムから溶出した RNA は水に溶出されるものの、 A_{260}/A_{280} 比は依然として緩衝した溶液に典型的な 2.1 前後の値である (表 5B)。

Tris および NaCl のほか、様々な緩衝液および緩衝液成分、食塩、種々の界面活性剤 (SDS など)、抗酸化剤 (β-メルカプトエタノールなど) といった物質が様々なステップで核酸調製物に使用される。このような物質の有無は分光光度計では検出できない。

要約：

- ポリサッカライドを含むサンプルは A_{260}/A_{230} に影響するバックグラウンド吸収を示し、そのためシグナルのばらつきが大きくなる。
- ポリサッカライドおよびリボポリサッカライドは OD 値にほとんど影響しないため、通常は検出されない。
- 他の可溶性または不溶性の物質、たとえばシリカ繊維が同じように吸光度測定値に影響することがある。

表 4：DNA 溶液に添加する RNA 量の増大により生じる A_{260}/A_{280} 比の上昇はわずかである

表に示すように、TE 緩衝液で調製した 100 ng/μl の NIH3T3 gDNA と混合する RNA の量を増加させていった。RNA の量は総核酸量に対する % 値で示す。DNA 濃度 (A_{260}) および純度比の測定を 3 回行った。その平均値を示す。 A_{260}/A_{280} が 1.90 を超えるようになるには、総核酸量の 15% を超える RNA 含量が必要である。

総核酸量に対する RNA の % 値	平均濃度 (ng/μl)	平均 A_{260}/A_{280}	平均 A_{260}/A_{230}
0	101.1	1.86	3.03
1%	99.7	1.87	3.02
2.5%	101.9	1.87	3.02
5%	104.7	1.87	3.00
7.5%	108.1	1.88	2.98
10%	110.9	1.88	2.90
15%	117.5	1.89	2.83
20%	126.4	1.91	2.78
25%	135.3	1.92	2.69
30%	147.7	1.93	2.62
40%	175.6	1.95	2.48
50%	215.6	1.99	2.40

5 DNA サンプルの RNA 混入

gDNA 溶液の純度比に対する RNA 混入の影響

gDNA 溶液に添加する RNA の量を増大させると定量値および純度比に対してどのような影響が生じるかを観察するために、gDNA と RNA の混合物を調製した。RNA の範囲は総核酸含量の 0 ~ 50% とし、gDNA については 100 ng/μl の一定濃度を使用した。EDTA 濃度は 1 mM とした (表 4)。

表 4 の結果は、総核酸濃度の測定値は予測よりも高いことを示している。これは、MVS ソフトウェアでは dsDNA については変換係数 50 が使用されているのに対し、添加した RNA には変換係数 40 が使用されているためである。 A_{260}/A_{280} は通常はどの核酸が存在するかを分析するために使用されるが、最初は gDNA のみが存在するためその値は 1.86 である。少量の RNA を添加するとこの比はわずかに増大するが、 A_{260}/A_{280} 比が 1.90 を超えるのは RNA が総核酸量の 20% に達してからである (黄)。したがって、混入物質としての RNA が少量の場合には、MVS はその検出には適していない。RNA 混入のために A_{260}/A_{280} が 1.90 にまで上昇した場合、総核酸量の少なくとも 15 ~ 20% が RNA であるという意味になる。

RNA 量の増加に伴って A_{260}/A_{280} は上昇するが、TE 緩衝液中では A_{260}/A_{230} は 3.0 から 2.4 に低下する。これは、緩衝溶液中では純粋な RNA の A_{260}/A_{230} は純粋な gDNA よりも低いという所見と一致する (表 5B)。

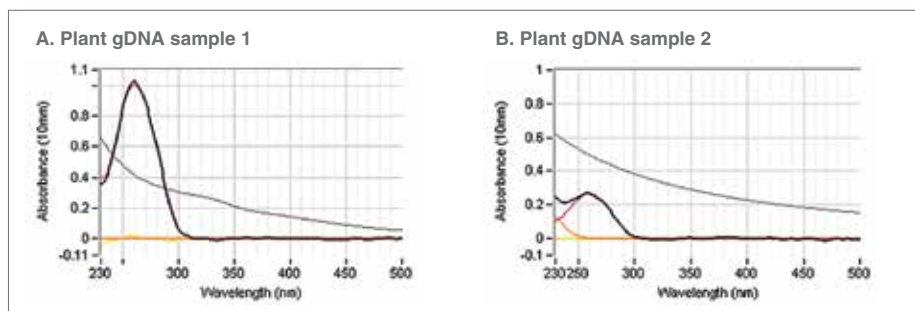
要約：

- 15% 未満の RNA 混入では A_{260}/A_{280} は 1.90 を超えて上昇せず、日常的な核酸分析で特定することは困難である。
- RNA の A_{260}/A_{230} 比は DNA よりも低い gDNA 溶液中の RNA 量が増加すると、 A_{260}/A_{230} 比が低下する。



図4：部分的に精製したトマト葉由来 gDNA サンプルの Trinean Dropsense 16 による紫外線 - 可視光線吸収スペクトル

グレーの線はポリサッカライドによるバックグラウンドシグナルを示す。このシグナルの一部は 230 ～ 280 nm の範囲にわたる吸光値の増大によるものであり、吸光曲線の異常な形状につながっている。



6 水中または緩衝液中の核酸の測定

純度比は pH に影響される (3)。水中または酸性溶液中の核酸について分光光度測定を行うと、緩衝した弱アルカリ性溶液中の核酸を測定した場合に比べ A_{260}/A_{280} 比が一般に約 0.3 ～ 0.4 単位低くなる (4)。RNA を扱う場合、RNA のアルカリ加水分解を避けるという名目で、水への溶出が一般に行われる。水による RNA の希釈が濃度値および純度比に及ぼす影響を記録するため、Monarch Total RNA Miniprep Kit (NEB #T2010) を使用してラット肝から分離した総 RNA サンプルを水で希釈し、RNA 系列希釈液を調製した。その後測定したサンプル濃度 (表 5 A) から、水中の RNA の測定値は精度が低くばらつきが大きいことがわかる (黄)。実際、20 ng/μl 未満の濃度値は一般に過小評価されるが、20 ng/μl 以上では過

大評価される傾向にある。しかし、同じ希釈系列を 10 mM Tris (pH 8.0) で調製すると、濃度値の精度および再現性が大幅に向上し、代替法として蛍光測定を行う必要がなくなる。

A_{260}/A_{280} 比は 1.75 ～ 1.80、 A_{260}/A_{230} 比は 1.95 ～ 2.0 であり、両者ともにばらつきが大きかった (黄)。Tris 緩衝液を使用した場合、濃度が十分高いサンプルでは純度比は両者とも 2.1 前後である (緑) (表 5 B)。

水で希釈した RNA サンプルのうち最も濃度が高いものでは、 A_{260}/A_{280} 比の方が高かった。希釈系列に用いた RNA サンプルの A_{260}/A_{280} 比は 2.1 であった。この所見は、洗浄緩衝液の残留成分によって緩衝された水に溶出した RNA と一致する。溶出液を水で 10 倍に希釈すると、残留緩衝成分はその影響を失う。同様の影響が DNA についても認められる。

要約：

- 水に溶解した RNA サンプルの A_{260}/A_{280} 比は、緩衝した弱アルカリ性のサンプルに比べ 0.3 ～ 0.4 単位低い。
- 水で希釈した RNA および DNA の測定値は精度が低くばらつきが大きい。
- 分光光度分析用 Tris 緩衝液は水の適切な代替物であり、蛍光法による測定の必要性がなくなる。
- シリカカラムから溶出した水は、以前の洗浄ステップから残留する緩衝成分によりわずかに緩衝されている。



図5：ある種のシリカキットで精製した gDNA サンプルにはシリカ繊維が含まれることがある

Monarch キットで精製したゲノム DNA (A) および QIAGEN DNeasy キットで精製したゲノム DNA (B)。DNeasy キットで精製した DNA には、グレーの線で示されるようにシリカ繊維が含まれている。シリカ繊維により A_{230} がわずかに上昇している (黒の線と青の線を比較)。15,000 x g で 1 分間遠心分離すると、DNeasy 精製サンプル中に微小な白いペレットが認められた。データは Trinean Dropsense 16 を使用して収集した。

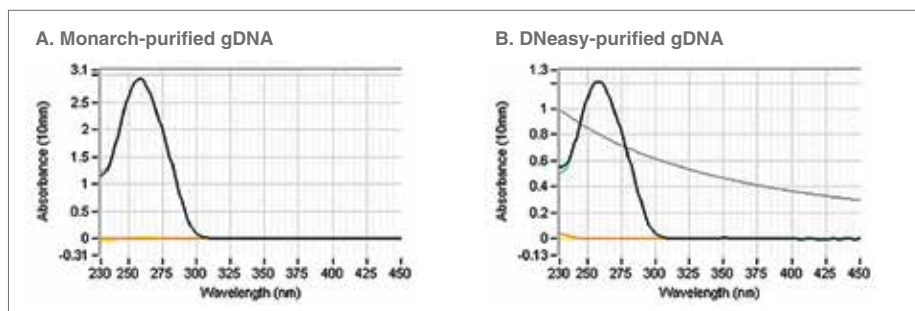


表 5：RNA を水に溶解した場合、 A_{260}/A_{280} 比が低く、濃度値は精度が低くばらつきが大きい

Monarch Total RNA Miniprep キットを用いてラット肝臓から分離した総 RNA を水中に溶出し、水または 10 mM Tris-Cl (pH 8.0) で以下に示す RNA 濃度にまで希釈した。濃度 (A) および純度比 (B) を Nanodrop One MVS で 3 回測定した。各表に平均値を示す。この濃度値を、Qubit BR RNA キットで 3 回測定した濃度値と比較した。

RNA インプット 濃度 (ng/μl)	Nanodrop (溶出：水)			Nanodrop (溶出：Tris)			Qubit		
	濃度 (ng/μl)	偏差 (%)	相対標準 偏差 (%)	濃度 (ng/μl)	偏差 (%)	相対標準 偏差 (%)	濃度 (ng/μl)	偏差 (%)	相対標準 偏差 (%)
1	0.54	-46.12	63.5	1.08	8.32	11.6	0.88	-11.53	7.1
2.5	1.53	-39.00	25.3	2.27	-9.31	1.5	2.17	-13.04	11.1
5	3.71	-25.77	15.3	4.37	-12.60	3.8	4.60	-8.04	6.1
7.5	6.11	-18.55	11.6	6.72	-10.42	2.1	7.14	-4.78	4.7
10	8.53	-14.72	6.0	9.16	-8.42	2.9	9.72	-2.82	5.0
15	14.35	-4.34	9.0	13.65	-8.99	2.9	15.07	0.46	4.5
20	20.32	1.60	6.8	19.34	-3.28	1.1	20.14	0.71	3.3
25	25.22	0.86	3.0	23.71	-5.17	1.2	24.26	-2.96	4.0
30	30.78	2.61	2.3	28.64	-4.52	0.8	29.49	-1.71	3.7
40	45.27	13.17	1.2	39.32	-1.70	0.4	42.48	6.20	1.1
50	53.92	7.83	0.4	51.26	2.51	1.2	49.97	-0.05	0.4
100	10 ⁸ .96	8.96	1.4	105.08	5.08	0.3	105.45	5.45	2.6
200	215.39	7.69	0.1	203.29	1.65	0.1	198.07	-0.96	1.1

RNA 濃度 (ng/μl)	Nanodrop (溶出：水)		Nanodrop (溶出：Tris)		濃度 (ng/μl)	Nanodrop (溶出：水)		Nanodrop (溶出：Tris)	
	$A_{260}/280$	相対標準 偏差 (%)	$A_{260}/280$	相対標準 偏差 (%)		$A_{260}/280$	相対標準 偏差 (%)	$A_{260}/280$	相対標準 偏差 (%)
1	1.40	91.9	4.70	83.4	1	-0.98	-210.6	6.51	85.3
2.5	1.75	25.2	2.45	16.0	2.5	2.83	201.6	2.18	69.9
5	1.86	8.7	2.18	7.2	5	1.85	58.6	2.50	45.0
7.5	1.87	3.9	2.27	5.7	7.5	2.27	38.7	2.23	10.4
10	1.75	10.1	2.09	8.4	10	2.05	19.5	2.14	4.0
15	1.77	10.5	2.16	6.7	15	1.86	24.9	2.17	5.6
20	1.76	13.4	2.12	2.9	20	1.93	22.1	2.07	3.3
25	1.71	8.8	2.12	3.2	25	1.97	17.6	2.00	0.5
30	1.73	3.0	2.11	2.2	30	1.95	12.4	2.05	3.1
40	1.75	3.4	2.09	2.5	40	2.03	9.8	2.04	1.5
50	1.80	4.2	2.09	1.5	50	2.02	7.1	1.94	6.1
100	1.89	1.2	2.09	0.4	100	1.99	3.5	2.06	0.8
200	1.96	0.8	2.10	0.2	200	2.04	1.4	2.08	0.5

結論

微量分光光度計は核酸サンプルを定量しその純度を分析する手段として優れており、簡便である。しかし、上記のように、定量についても純度分析についても考慮すべき限界がある。

- 微量分光光度計は 1 ng/μl までの濃度のサンプルに使用できるが、精度を求めるためには低濃度のサンプルは繰り返し測定する必要がある。
- 20 ng/μl よりも低濃度のサンプルの純度比には信頼性がなく、20 ~ 50 ng/μl のサンプルでも大きなばらつきが見られる。
- 純度比に対するタンパク質混入の影響は、DNA または RNA の濃度によって異なる。低濃度の核酸サンプルは混入度が高く見え、高濃度の核酸サンプルではほぼクリーンに見えることがある。
- タンパク質混入の評価において A_{260}/A_{280} が果たす役割について、一般的認識とは異なり、 A_{260}/A_{230} の方がタンパク質混入の指標として感度が高い。
- GTC、Triton X-100、EDTA、フェノールなどの緩衝成分の存在を評価するために紫外線吸収スペクトルを使用できるが、検出された成分はダウンストリームのアプリケーションに悪影響を及ぼさないことが多い。
- タンパク質およびポリサッカライドが相当量存在する可能性があるが、純度比に対するその影響はおそらく限られている。
- DNA サンプル中の遊離 EDTA 度のわずかなばらつきが、 A_{260}/A_{230} 比を異常に高くすることがある (3.0 以上)。
- A_{260}/A_{280} を DNA 溶液中の RNA 濃度の指標として使用できる。しかし、この比の大幅な変化は RNA 濃度が 15% を超える場合のみ認められる。
- 核酸を水でシリカメンブレンから溶出させた場合にも、以前の洗浄ステップから残留する成分により核酸がわずかに緩衝されることがある。
- 水中の核酸を測定すると、測定値の精度が低くばらつきが大きくなり、 A_{260}/A_{280} 比が大幅に低下する。Tris 緩衝液を測定に用いれば、この問題は解決する。

参考文献：

- (1) N.N., *Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios* (2012) Thermo Fisher T123- Technical Bulletin, Nanodrop Lite.
- (2) von Ahlfen, S. and Schlumpberger, M., (2010) *Qiagen Gene Expression Newsletter*, 15, 7-8.
- (3) Wilfinger, et al. (1997) *BioTechniques*. 22, 474-481.
- (4) Sauer, P., et al, (1998) *Quantitation of DNA. Qiagen News*, 2, 23-26.



PCR 増幅

製品名	製品番号	容量
高正確性 PCR 酵素（インサート増幅）		
推奨 Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	M0491S/L	100/500 units
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	M0493S/L	100/500 units
Q5 High-Fidelity 2X Master Mix	M0492S/L	100/500 reactions
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	M0494S/L/X	100/500/500 reactions
Q5 High-Fidelity PCR Kit	E0555S/L	50/200 reactions
Q5U Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	M0515S/L	100/500 units
Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer	M0531S/L	100/500 reactions
Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer	M0532S/L	100/500 reactions
Phusion Hot Start Flex 2X Master Mix	M0536S/L	100/500 reactions
Phusion High-Fidelity PCR Kit	E0553S/L	50/200 reactions
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	M0530S/L	100/500 units
Phusion Hot Start Flex High-Fidelity DNA Polymerase	M0535S/L	100/500 units
PCR 酵素（汎用 & 確認用）		
OneTaq DNA Polymerase	M0480S/L/X	200/1,000/5,000 units
OneTaq Quick-Load DNA Polymerase	M0509S/L/X	100/500/2,500 units
OneTaq Hot Start DNA Polymerase	M0481S/L/X	200/1,000/5,000 units
OneTaq 2X Master Mix with Standard Buffer	M0482S/L	100/500 reactions
推奨 OneTaq Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer	M0486S/L	100/500 reactions
OneTaq Hot Start 2X Master Mix with Standard Buffer	M0484S/L	100/500 reactions
OneTaq Hot Start 2X Master Mix with GC Buffer	M0485S/L	100/500 reactions
OneTaq Hot Start Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer	M0488S/L	100/500 reactions
OneTaq Hot Start Quick-Load 2X Master Mix with GC Buffer	M0489S/L	100/500 reactions
Taq DNA Polymerase with ThermoPol Buffer	M0267S/L/X/E	400/2,000/4,000/20,000 units
Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer	M0273S/L/X	400/2,000/4,000 units
Taq DNA Polymerase with Standard Taq (Mg-free) Buffer	M0320S/L	400/2,000 units
Taq PCR Kit	E5000S	200 reactions
Quick-Load Taq 2X Master Mix	M0271L	500 reactions
Taq 2X Master Mix	M0270L	500 reactions
Taq 5X Master Mix	M0285L	500 reactions
Multiplex PCR 5X Master Mix	M0284S	100 reactions
Hot Start Taq DNA Polymerase	M0495S/L	200/1,000 units
Hot Start Taq 2X Master Mix	M0496S/L	100/500 reactions
Vent DNA Polymerase	M0254S/L	200/1,000 units
Vent (exo-) DNA Polymerase	M0257S/L	200/1,000 units
Deep Vent DNA Polymerase	M0258S/L	200/1,000 units
Deep Vent (exo-) DNA Polymerase	M0259S/L	200/1,000 units
LongAmp Taq DNA Polymerase	M0323S/L	500/2,500 units
LongAmp Hot Start Taq DNA Polymerase	M0534S/L	500/2,500 units
LongAmp Taq 2X Master Mix	M0287S/L	100/500 reactions
LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix	M0533S/L	100/500 reactions
LongAmp Taq PCR Kit	E5200S	100 reactions
PCR クローニング & 変異導入		
NEB PCR Cloning Kit	E1202S	20 reactions
NEB PCR Cloning Kit (Without Competent Cells)	E1203S	20 reactions
Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit	E0554S	10 reactions
Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (Without Competent Cells)	E0552S	10 reactions
KLD Enzyme Mix	M0554S	25 reactions
Deoxynucleotide (dNTP) Solution Set	N0446S	25 µmol of each
Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix	N0447S/L	8/40 µmol of each

cDNA 合成

製品名	製品番号	容量
LunaScript RT SuperMix Kit	E3010S/L	25/100 reactions
LunaScript RT Master Mix Kit (Primer-free)	E3025S/L	25/100 reactions
M-MuLV Reverse Transcriptase	M0253S/L	10,000/50,000 units
AMV Reverse Transcriptase	M0277S/L	200/1,000 units
推奨 ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit	E6560S/L	30/150 reactions
ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit	E6300S/L	30/150 reactions
Template Switching RT Enzyme Mix	M0466S/L	20/100 reactions
ProtoScript II Reverse Transcriptase	M0368S/L/X	4,000/10,000/40,000 units
WarmStart RTx Reverse Transcriptase	M0380S/L	50/250 reactions

制限酵素（HF 酵素、全リストはウェブサイト参照）

製品名	製品番号	容量
ハイレティティ制限酵素		
AgeI-HF	R3552S/L	300/1,500 units
ApoI-HF	R3566S/L	1,000/5,000 units
BamHI-HF	R3136S/L/T/M	10,000/50,000 units
BbsI-HF	R3539S/L	300/1,500 units
BclI-HF	R3160S/L	3,000/15,000 units
BmiI-HF	R3658S/L	300/1,500 units
BsaI-HFv2	R3733S/L	1,000/5,000 units
BsiWI-HF	R3553S/L	300/1,500 units
BsrGI-HF	R3575S/L	1,000/5,000 units
BstEII-HF	R3162S/L/M	2,000/10,000 units
BstZ171-HF	R3594S/L	1,000/5,000 units
DraIII-HF	R3510S/L	1,000/5,000 units
EagI-HF	R3505S/L/M	500/2,500 units
EcoRI-HF	R3101S/L/T/M	10,000/50,000 units
EcoRV-HF	R3195S/L/T/M	4,000/20,000 units
HindIII-HF	R3104S/L/T/M	10,000/50,000 units
KpnI-HF	R3142S/L/M	4,000/20,000 units
MfeI-HF	R3589S/L	500/2,500 units
MluI-HF	R3198S/L	1,000/5,000 units
NcoI-HF	R3193S/L/M	1,000/5,000 units
NheI-HF	R3131S/L/M	1,000/5,000 units
NotI-HF	R3189S/L/M	500/2,500 units
NruI-HF	R3192S/L	1,000/5,000 units
NsiI-HF	R3127S/L	1,000/5,000 units
PstI-HF	R3140S/L/T/M	10,000/50,000 units
PvuI-HF	R3150S/L	500/2,500 units
PvuII-HF	R3151S/L/M	5,000/25,000 units
SacI-HF	R3156S/L/M	2,000/10,000 units
SalI-HF	R3138S/L/T/M	2,000/10,000 units
SbfI-HF	R3642S/L	500/2,500 units
Scal-HF	R3122S/L/M	1,000/5,000 units
SpeI-HF	R3133S/L/M	500/2,500 units
SphI-HF	R3182S/L/M	500/2,500 units
SspI-HF	R3132S/L/M	1,000/5,000 units
StyI-HF	R3500S/L	3,000/15,000 units
ゲルローディングダイ		
推奨 Gel Loading Dye, Purple (6X)	B7024S	4 ml
Gel Loading Dye, Purple (6X), no SDS	B7025S	4 ml



末端修飾

	製品名	製品番号	容量
推奨	Quick CIP	M0525S/L	1,000/5,000 units
	Shrimp Alkaline Phosphatase (Recombinant)	M0371S/L	500/2,500 units
	Antarctic Phosphatase	M0289S/L	1,000/5,000 units
	T4 DNA Polymerase	M0203S/L	150/750 units
	DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	M0210S/L/M	200/1,000/1,000 units
推奨	Quick Blunting Kit	E1201S/L	20/100 reactions
	Mung Bean Nuclease	M0250S/L	1,000/5,000 units
推奨	T4 Polynucleotide Kinase	M0201S/L	500/2,500 units
	Klenow Fragment (3' → 5' exo ⁻)	M0212S/L/M	200/1,000/1,000 units
	β-Agarase I	M0392S/L	100/500 units

ライゲーション

	製品名	製品番号	容量
推奨	Blunt/TA Ligase Master Mix	M0367S/L	50/250 reactions
推奨	Instant Sticky-End Ligase Master Mix	M0370S/L	50/250 reactions
推奨	ElectroLigase	M0369S	50 reactions
推奨	T4 DNA Ligase	M0202S/L/T/M	20,000/100,000 units
	Salt-T4 DNA Ligase	M0467S/L	20,000/100,000 units
	Hi-T4 DNA Ligase	M2622S/L	20,000/100,000 units
推奨	Quick Ligation Kit	M2200S/L	30/150 reactions
	T3 DNA Ligase	M0317S/L	100,000/750,000 units
	T7 DNA Ligase	M0318S/L	100,000/750,000 units
	Taq DNA Ligase	M0208S/L	2,000/10,000 units

形質転換

	製品名	製品番号	容量
	<i>dam-/dcm-</i> Competent <i>E. coli</i>	C2925H/I	20 x 0.05 ml/tube/ 6 x 0.2 ml ml/tube
推奨	NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	C2987H/I/P/R/U	20 x 0.05 ml/tube/ 6 x 0.2 ml/tube/ 1 x 96 well plate/ 1 x 384 well plate/ 12 x 8 tube strips
	NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (Subcloning Efficiency)	C2988J	6 x 0.4 ml/tube
	NEB 5-alpha F ⁺ Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	C2992H/I	20 x 0.05/6 x 0.2 ml
推奨	NEB 10-beta Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	C3019H/I	20 x 0.05 ml/tube/ 6 x 0.2 ml ml/tube
	NEB 10-beta Electrocompetent <i>E. coli</i>	C3020K	6 x 0.1 ml/tube
	NEB Turbo Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	C2984H/I	20 x 0.05 ml/tube/ 6 x 0.2 ml/tube
	NEB Stable Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	C3040H/I	20 x 0.05 ml/tube/ 6 x 0.2 ml/tube
	NEB Cloning Competent <i>E. coli</i> Sampler	C1010S	8 tubes

DNA 精製

	製品名	製品番号	容量
推奨	Monarch Plasmid Miniprep Kit	T1010S/L	50/250 preps
推奨	Monarch DNA Gel Extraction Kit	T1020S/L	50/250 preps
推奨	Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (5 µg)	T1030S/L	50/250 preps
	Monarch Genomic DNA Purification Kit	T3010S/L	50/150 preps
	Monarch Total RNA Miniprep Kit	T2010S	50 preps
	Monarch RNA Cleanup Kit (10 µg)	T2030S/L	10/100 preps
	Monarch RNA Cleanup Kit (50 µg)	T2040S/L	10/100 preps
	Monarch RNA Cleanup Kit (500 µg)	T2050S/L	10/100 preps

カラムとバッファーは単品販売品もあり

DNA マーカー／ラダー

	製品名	製品番号	容量
	1 kb DNA Ladder	N3232S/L	200/1,000 gel lanes
	TriDye 1 kb DNA Ladder	N3272S	125 gel lanes
	Quick-Load 1 kb DNA Ladder	N0468S/L	125/375 gel lanes
	100 bp DNA Ladder	N3231S/L	100/500 gel lanes
	TriDye 100 bp DNA Ladder	N3271S	125 gel lanes
	Quick-Load 100 bp DNA Ladder	N0467S/L	125/375 gel lanes
	1 kb Plus DNA Ladder	N3200S/L	200/1,000 gel lanes
	1 kb Plus DNA Ladder for Safe Stains	N0559S	50 µg/ml
	TriDye 1 kb Plus DNA Ladder	N3270S	250 gel lanes
	Quick-Load 1 kb Plus DNA Ladder	N0469S	250 gel lanes
推奨	Quick-Load Purple 1 kb Plus DNA Ladder	N0550S/L	250/750 gel lanes
	TriDye Ultra Low Range DNA Ladder	N0558S	100 µg/ml
	50 bp DNA Ladder	N3236S/L	200/1,000 gel lanes
	Quick-Load Purple 50 bp DNA Ladder	N0556S	250 gel lanes
	Quick-Load 1 kb Extend DNA Ladder	N3239S	125 gel lanes
	Quick-Load Purple 1 kb DNA Ladder	N0552S/L	125/375 gel lanes
	Quick-Load Purple 100 bp DNA Ladder	N0551S/L	125/375 gel lanes
	Low Molecular Weight DNA Ladder	N3233S/L	100/500 gel lanes
	Quick-Load Purple Low Molecular Weight DNA Ladder	N0557S	125 gel lanes
	Fast DNA Ladder	N3238S	200 gel lanes
	PCR Marker	N3234S/L	100/500 gel lanes

DNA Assembly

	製品名	製品番号	容量
推奨	NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit	E5520S	10 reactions
	NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	E2621S/L	10/50 reactions
推奨	NEBuilder HiFi DNA Assembly Bundle for Large Fragments	E2623S	20 reactions
	Gibson Assembly Cloning Kit	E5510S	10 reactions
	Gibson Assembly Master Mix	E2611S/L	10/50 reactions
推奨	NEB Golden Gate Assembly Kit (BsaI-HFv2)	E1601S/L	20/100 reactions
推奨	NEB Golden Gate Assembly Kit (BsmBI-v2)	E1602S/L	20/100 reactions
	BioBrick [®] Assembly Kit	E0546S	50 reactions
	BbsI	R0539S/L	300/1,500 units
	BbsI-HF	R3539S/L	300/1,500 units
	BsaI-HFv2	R3733S/L	1,000/5,000 units
	BsmBI-v2	R0739S/L	200/1,000 units
	Esp3I	R0734S/L	300/1,500 units
	PaqCI	R0745S/L	200/1,000 units
	SapI	R0569S/L	250/1,250 units
	BtgZI	R0703S/L	100/500 units
	BspQI	R0712S/L	500/2,500 units
	T4 DNA Polymerase	M0203S/L	150/750 units
	Taq DNA Ligase	M0208S/L	2,000/10,000 units
	T4 DNA Ligase	M0202S/L/T/M	20,000/100,000 units
	T5 Exonuclease	M0363S/L	1,000/5,000 units
	Exonuclease V (RecBCD)	M0345S/L	1,000/5,000 units
	USER Enzyme	M5505S/L	50/250 units
	Thermolabile USER Enzyme II	M5508S/L	50/250 units

相同組換えクローニング

製品名	製品番号	容量
Cre Recombinase	M0298S/L/M	50/250 units

Featured Tools



NEBcloner :

NEBcloner.neb.com

クローニング試薬の選択やプロトコルを簡単に検索



NEBuilder DNA Assembly Tool :

NEBuilder.neb.com

DNA アセンブリのプライマーを簡単にデザイン



NEB AR App

製品資料中のアイコンをスキャンして動画や

実験プロトコル、ヒントなどを視聴 (iPhone、iPad、
Android 対応)

www.nebj.jp



One or more of these products are covered by patents, trademarks and/or copyrights owned or controlled by New England Biolabs, Inc. For more information, please email us at busdev@neb.com. The use of these products may require you to obtain additional third party intellectual property rights for certain applications.

Your purchase, acceptance, and/or payment of and for NEB's products is pursuant to NEB's Terms of Sale at www.neb.com/support/terms-of-sale. NEB does not agree to and is not bound by any other terms or conditions, unless those terms and conditions have been expressly agreed to in writing by a duly authorized officer of NEB.

NEB[®]、NEBuilder[®]、Luna[®]、OneTag[®]、Salt-T4[®]、WarmStart[®] は、New England Biolabs, Inc. の商標または登録商標です。

GIBSON ASSEMBLY[®] is a registered trademark of Synthetic Genomics, Inc. FASTDIGEST[™], SYBR[®], SUPERScript[®], GATEWAY[®] are registered trademarks of ThermoFisher Scientific Inc.

Phusion DNA Polymerase was developed by Finnzymes Oy, now a part of Thermo Fisher Scientific. This product is manufactured by New England Biolabs, Inc. under agreement with, and under the performance specifications of Thermo Fisher Scientific. IN FUSION[®] is a registered trademark of Clontech Laboratories, Inc. NANOSPEC[®] is a registered trademark of Onto Innovation Inc.

BIOBRICK[®] is a trademark of The BioBricks Foundation. AGILENT[®] and BIOANALYZER[®] are registered trademarks of Agilent Technologies, Inc. TRINEAN[®] is a registered trademark of Trinean NV. QIAGEN[®] and DNEASY[®] are registered trademarks of Qiagen GmbH.

IPHONE、IPAD は、米国およびその他の国で登録された Apple Inc. の商標です。

Android は Google LLC の商標です。

© Copyright 2021, New England Biolabs, Inc.; all rights reserved.

CLO_TG – Version 9.0 – 09/21



NEW ENGLAND
BioLabs[®]
Japan Inc.

be INSPIRED
drive DISCOVERY
stay GENUINE

ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株式会社

〒130-0022 東京都墨田区江東橋2-2-3 倉持ビル第2

カスタマーサービス TEL:03-4545-1421 FAX:03-5669-6194

テクニカルサポート TEL:03-4545-1420 Email:tech.jp@neb.com

ウェブサイト:www.nebj.jp