

1. PCR-Mediated Site-Directed Mutagenesis

実験の流れ

1. プライマーデザイン
2. PCR
3. DpnI 処理
4. 大腸菌形質転換
5. プラスミド回収
6. シークエンス解析

1.1 プライマーデザイン

長さ 25-45 ベース

Tm 値 78 度以上

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

N はプライマーの長さ

プライマーの中心に変異部位がくるようにする。

GC 含量は最低でも 40%、プライマーの末端は 1 ベース以上の G または C にする。

プライマーの 5' 側はリン酸化修飾する必要はない。

プライマーは、FPLC 精製や PAGE 精製が必要だとされているが、カートリッジ精製(インビトロジェンにプライマーを注文する場合)でも大丈夫。

例 1

SPK1AF-F

5' GGA AAT CCT GGC TTT ATG 'G'CT GAG T'T'T GTC GCA ACT CGT TGG 3'
3' CCT TTA GGA CCG AAA TAC 'C'GA CTC A'A'A CAG CGT TGA GCA ACC 5'

SPK1AF-R

長さ 42 ベース

Tm 値 81.1 度

$$(T_m = 81.5 + 0.41 (50) - 675/42 - 4.8 = 81.1)$$

カートリッジ精製

修飾なし

例 2

SPK1AY-F

5' GGA AAT CCT GGC TTT ATG 'G'CT GAG TAT GTC GCA ACT CG 3'
3' CCT TTA GGA CCG AAA TAC 'C'GA CTC ATA CAG CGT TGA GC 5'

SPK1AY-R

長さ 38 ベース

Tm 値 80.5 度

$$(T_m = 81.5 + 0.41 (50) - 675/38 - 2.6 = 80.5)$$

カートリッジ精製

修飾なし

1.2. PCR

template (5-50 ng)
10 x buffer
primer 1 (125 pmole)
primer 2 (125 pmole)
dNTP mix (25 mM)
high fidelity polymerase (2.5 units)
dH₂O で 50 µl にフィルアップする。

ネガティブコントロールとして酵素やプライマーを加えないものを用意する。
キットでなくても問題なくできる。

反応サイクル
95 度 30 秒

95 度 30 秒
55 度 1 分
68 度 2 分/kb

1 ベース変異 12 サイクル
1 アミノ酸変異 16 サイクル
複数のアミノ酸の欠失、挿入 18 サイクル

電気泳動して増幅できたか確認する。

例

STRATAGENE のキットを使用した場合

template (6kb)	2.8 µl (10 ng)
10 x buffer	5.0 µl
primer 1	1.0 µl (125 pmole)
primer 2	1.0 µl (125 pmole)
dNTP mix	1.0 µl
high fidelity polymerase	1.0 µl (2.5 units)
dH ₂ O	38.2 µl
Total	50.0 µl

95 度 30 秒

95 度 30 秒
55 度 1 分

68 度 12 分 x 16 サイクル

(鋳型プラスミドが 6kb なので 6 x 2 = 12 分、1 アミノ酸変異なので 16 サイクル)

1.3. DpnI 処理

PCR 産物に混じっているメチル化された鋳型プラスミドを消化する。DpnI を 1 から 10 ユニット加え、37 度 1、2 時間反応させる。反応後、DpnI を不活化する時は 65 度 10 分(必須ではない)。

1.4. 大腸菌形質転換

適量が大腸菌に導入する。キットでは、XLI-Blue Supercompetent cells (Stratagene)を使うが、DH5alpha で問題ない。

1.5. プラスミド回収

鋳型プラスミドがコンタミしていなければ、ほとんどが目的のプラスミドのはず。念のため 3、4 クローンからプラスミドを回収して 1、2 クローンシーケンスする。

1.6. シーケンス解析

まず、目的の部位に変異が導入されているか確認する。確認できたら、PCR によって望まない変異が入っていないことを確認する。

参考資料

QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit
Instruction Manual (STRATAGENE)