

Gene Disruption and tagging

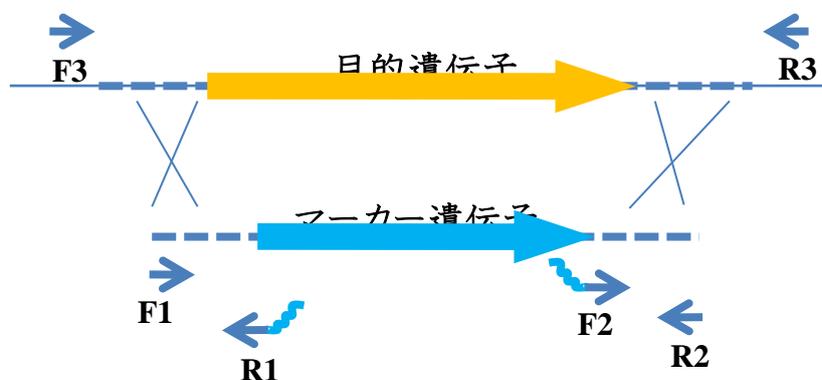
okamasa

遺伝子破壊株およびタグを付加した株は、その目的遺伝子の上流・下流の相同領域と目的遺伝子をマーカー遺伝子でおきかえたり、タグを付与した配列を含む断片を作成し、その断片を形質転換して相同組み換えをおこなうことにより取得できる。

断片作製の方法としては、クローニングによる方法とPCRベースによる方法があるが、PCRベースによる方法の方が簡便によく使用されているので、ここではPCRベースによる方法を紹介する。

1) primer の設計(2step PCR)

例 : gene disruption



上図のように primer を設計する。

F1,R1: 相同組み換え部位(目的遺伝子の上流部分)の増幅用

F2,R2: 相同組み換え部位(目的遺伝子の下流部分)の増幅用

F3,R3: 組み換えチェック用(sequence チェック用)

◆ primer の位置の目安 ◆

F1: 目的遺伝子の上流 250bp ほどの位置、20mer ぐらい。

R1: マーカー遺伝子配列 + 目的遺伝子のすぐ上流 RV、44mer 程度。

(invitrogen だと 44mer 以下 16 時までのオーダーで翌日納品)

F2: マーカー遺伝子配列 + 目的遺伝子のすぐ下流 FW、44mer 程度。

R2: 目的遺伝子の約 250bp ほど下流 RV、20mer 程度。

F3,R3: F1,R2 それぞれの 100bp ほど外側、共に 20mer 程度。

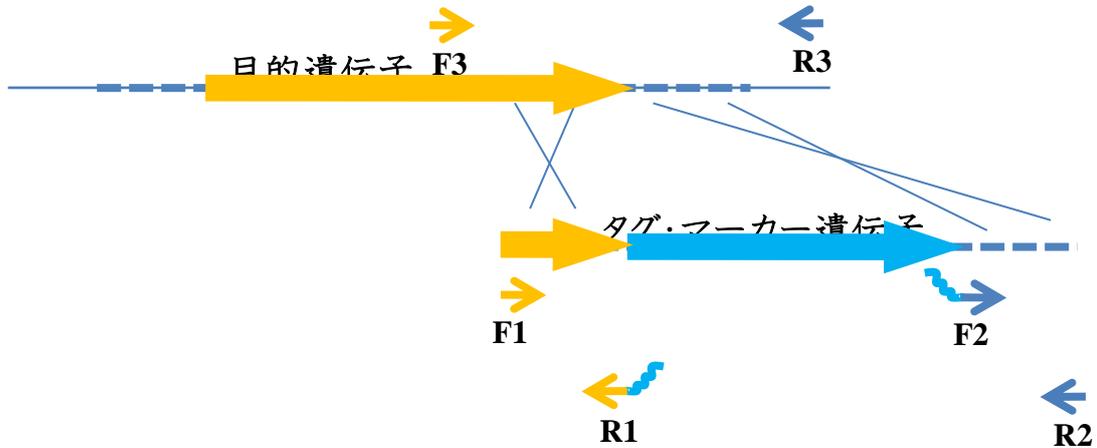
◆よく利用されるマーカーの共通配列◆

R1:5'-(vector sequence)-(gene-specific sequence)-3'

F2: 5'-(vector sequence)-(gene-specific sequence)-3'

| makar | template plasmid(2nd PCR) | | 5'->3' |
|-------|---------------------------|----|-----------------------------------|
| ura | pCSU3(SalI/BamHI) | R1 | 5' CCCC GTCAAGCTCTAAATCGGGGGCT 3' |
| leu | pYC34(BamHI/SalI) | F2 | 5' CGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAG 3' |
| ade | pYC9 | | |
| hyg | pAG32(pFA6a-hphMX48) | R1 | 5' CGTCGACCTGCAGCGTACGA 3' |
| | | F2 | 5' CGAGCTCGAATTCATCGATG 3' |
| kan | pARC782(pFA6a-kanMX4) | R1 | 5' CGTCGACCTGCAGCGTACGA 3' |
| | | F2 | 5' GTTTAAACGAGCTCGAATTC 3 |
| nat | pCR2.1-nat | R1 | 5' TTAATTAACCCGGGGATCCG 3' |
| | | F2 | 5' CGAGCTCGAATTCATCGATG 3' |

例:C末 tagging



上図のように primer を設計する。

◆primer の位置の目安◆

F1:tag 付加位置の上流 250bp ほどの位置、20mer ぐらい。

R1: マーカー遺伝子配列 + tag 付加位置のすぐ上流 RV(stop codon けずる)、44mer 程度。
(invitrogen だと 44mer 以下 16 時までのオーダーで翌日納品)

F2:マーカー遺伝子配列 + tag 付加位置の下流 FW、44mer 程度。

R2:tag 付加位置の約 250bp ほど下流 RV、20mer 程度。

F3,R3:F1,R2 それぞれの 100bp ほど外側、共に 20mer 程度。

◆よく利用されるタグの共通配列◆

R1:5'-(vector sequence)-(gene-specific sequence)-3'

F2: 5'-(vector sequence)-(gene-specific sequence)-3'

| makar | template plasmid(2nd PCR) | | 5'->3' |
|---------|---------------------------|----|----------------------------|
| GFP-kan | pARC783(pFA6a-GFP-kanMX6) | R1 | 5' CGTCGACCTGCAGCGTACGA 3' |
| mCh-hyg | pFA6a-mCherry-Hyg | F2 | 5' GTTTAAACGAGCTCGAATTC 3 |

2)1st PCR

genomic DNA を template とし組換え相同領域の PCR を行う。
(各遺伝子につき、上流部位 F1,R1・下流部位 F2,R2 の 2set 行う)

◆PCR 条件◆

| | | |
|------------|--|-----------|
| template | :genomic DNA(CRL X76 genomic DNA) | 100ng/ul |
| primer | :F1・R1 | 10pmol/ul |
| | :F2・R2 | 10pmol/ul |
| polymerase | :PrimeSTAR [®] Max DNA Polymerase | 25ul |

| | | | |
|-------------------|-----------|------------|-----------------|
| template | 1.0 | 98C | 10sec |
| primer | 1.0,1.0 | 55C | 5sec × 35 |
| D.W. | 22 | <u>72C</u> | <u>5sec/1kb</u> |
| <u>prime star</u> | <u>25</u> | ↓ | |
| total | 50ul | QIAquick | 50ul Elute |

3)2nd PCR

1st PCR product を電気泳動で確認した後、目的に応じた plasmid を template として 2nd PCR を行う。

◆PCR 条件◆

| | | |
|-------------|--|-------------|
| template | :目的に応じた plasmid | 10~100ng/ul |
| primer | :F1・R2 | 10pmol/ul |
| PCR product | :(F1・R1),(F2・R2) | 1.0ul,1.0ul |
| polymerase | :PrimeSTAR [®] Max DNA Polymerase | 25ul |

| | | | |
|-------------------|-------------|------------|--------------|
| template | 1.0 | <u>94C</u> | <u>1min</u> |
| primer | 0.5,0.5 | 98C | 10sec |
| PCR product | 1.0,1.0 | 40C | 15sec × 5 |
| D.W. | 21 | <u>72C</u> | <u>30sec</u> |
| <u>prime star</u> | <u>25</u> | 98C | 10sec |
| total | 50ul × 2set | 55C | 15sec × 30 |
| | | <u>72C</u> | <u>30sec</u> |
| | | ↓ | |
| | | QIAquick | 50ul Elute |

4)transformation

ラボマニュアル [3.3 Transformation](#) 参照

5) transformant sequence check

ラボマニュアル [3.4 Colony PCR](#) を参照し F3,R3 primer を用いて PCR を行いその断片を sequence して目的の位置に目的断片が挿入されたことを確認する。

Colony PCR

↓

QIAquick 30ul Elute

↓

sequence 反応に template として 1ul 使用