植物防疫基礎講座：

昆虫類やダニ類の DNA クローニング法

近畿中国四国農業研究センター　三浦一芸（みうらかずき）

は じ め に

2010 年の植物防疫 9 月号および 11 月号（三浦，2010 a；2010 b）に引き続き，今回は PCR で得られた DNA 産物をクローニングしてシーケンスする簡単な方法を紹介する。

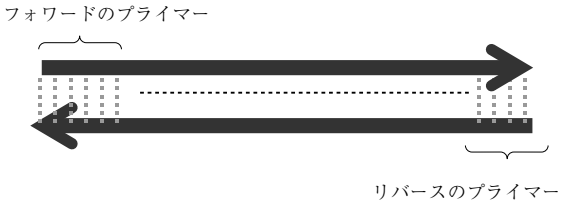
I　なぜクローニングしなければいけないのか？

植物防疫 2010 年 11 月号（三浦，2010 b）に PCR 産物をダイレクトシーケンスする方法を紹介した。この方法では図−1 のようなイメージで増幅された PCR 産物を直接 DNA シーケンスすることになる。しかし，この方法ではいくつか問題が出てくる。プライマーは特定の領域を増幅するように設計されている。しかし，フォワードとリバースのプライマー同士に挟まれた領域の DNA 配列や長さが異なる場合がある。例えば，核 DNA や同一個体で複数のバクテリア系統に感染している場合のバクテリアの DNA シーケンスである。両性生殖の場合，ミトコンドリア DNA（例えば，COI（cytochrome c oxidase subunit I）など）は普通母親由来である。一方，核 DNA は母親側と父親側双方から由来している（図−2）。そのため，PCR を行うと，図−3 のようにフォワードとリバースプライマーで挟まれた領域の DNA シーケンスが異なる場合が存在する。そのような特性を使って SSCP（Single-Strand Conformation Polymorphism）分析，DGGE（Denaturing Gradient Gel Electrophoresis）や Heteroduplex Analysis 等がある。しかし，このような場合，ダイレクトシーケンスをした結果，図−4 のような波形が得られてきちんと解析できない。

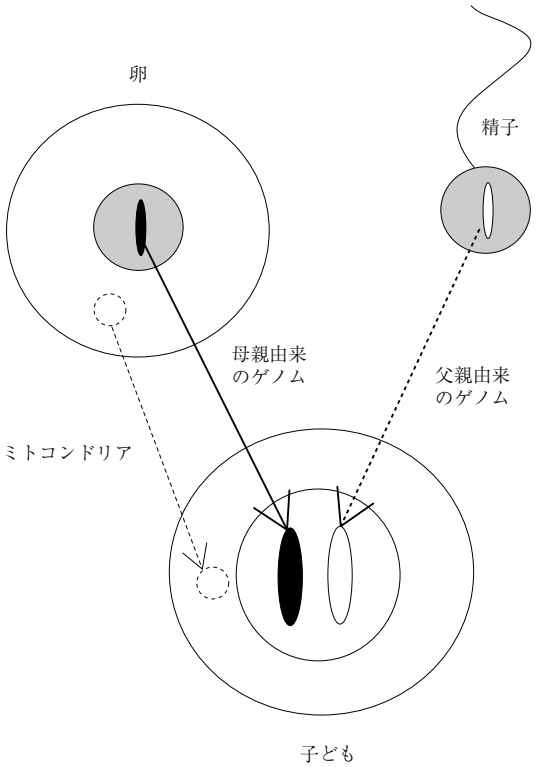
さて，それではどうしたらよいのか？そこで登場するのがクローニングベクターである。このベクターには一つの PCR 産物しか入らない。そのため，図−3 のどちらかの配列しか入らない。核 DNA だったら母親側由来の配列だけとか，1 つの系統のバクテリアの配列しか入らない。これで核 DNA や多重感染の問題が解決できる。

II　クローニング（TA クローニング；pGEM®-T Easy Vector Systems II（プロメガ）利用）

ここでは大腸菌を用いた TA クローニングを行う。ベクター（プラスミド）に増幅しようとする DNA 断片（PCR 産物）を DNA リガーゼで結合させる。このプラスミドを大腸菌に導入し，大腸菌の大量培養により組換え DNA を増幅する。実際の手順は，① PCR，②プラス



図−1　PCR での増幅



図−2　子どものゲノム由来

Introduction of Methods of DNA Cloning for Insects and Mites. By Kazuki Miura

（キーワード：DNA，クローニング，シーケンス，マイクロサテライト探索）

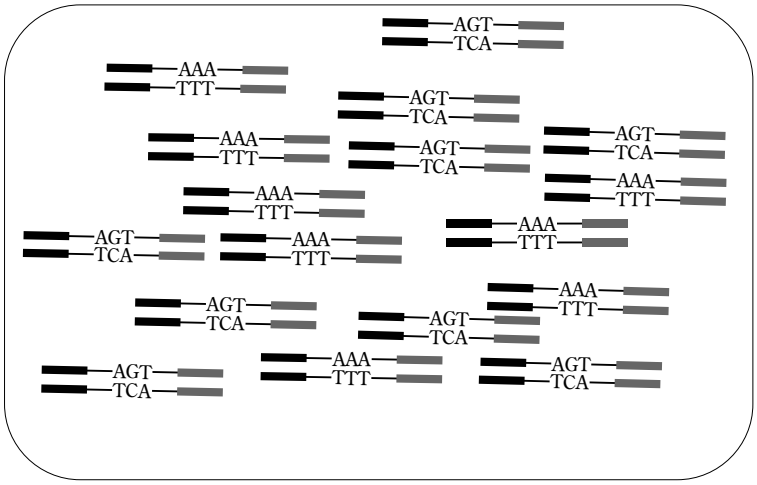


図-3　PCR産物
太い線はプライマーを表す．細い線は塩基配列を表す．プライマーが同じでも挟まれた塩基が一部異なり増える．

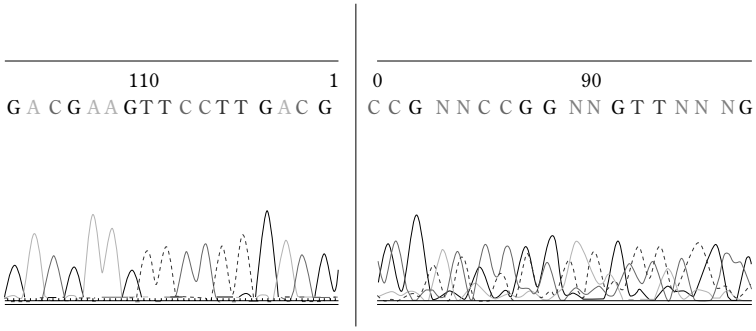


図-4　シーケンス結果
左：通常，右：波形の重複．

ミドへのライゲーション，③大腸菌への遺伝子導入，④インサートチェック，⑤シーケンスとなる。

本報ではマイクロサテライト領域を探索するという目的でクローニングを行うこととする。マイクロサテライト（microsatellite）とは，核DNAやオルガネラのゲノム上に存在する反復配列である。ゲノム中に広く散在しており，普通は中立で共優性を示す。通常両性生殖では一つの形質に対して母親側由来と父親側由来の二つの遺伝子が存在するが，一方の優性遺伝子の形質のみが現れる。一方，共優性の場合，二つが異なるときでも，両方の性質が表れる。そのため，遺伝マーカーとして利用される。

1　PCR

ここではFisher et al.（1996）のプライマー（例えば，KKVRVRV$(CT)_6$：K，VおよびRは混合塩基。KはGとT，RはAとG，そしてVはA，CおよびG）を利用してPCRを行う。詳細はFisher et al.（1996）を読んでいただきたい。PCRの手順は植物防疫2010年9月号（三浦，2010 a）に沿って行う。PCRの結果，図−5のような電気泳動結果を得た。各レーンともスメアになっている。これはいろいろなサイズの反復配列が存在する可能性を示している。

2　プラスミドへのライゲーション

（1）　pGEM®-T Easy Vector Systems IIの試薬，および1節のPCR産物（もし，冷凍保存している場合）をクラッシュアイスの中で解凍する。また，滅菌水も用意する。

（2）　0.2 m*l*のPCR用チューブに表−1の分量の試薬を入れる。よくピペティングする。1〜1.5時間室温に置く。ただし，大量の産物がほしい場合は，一晩冷蔵庫

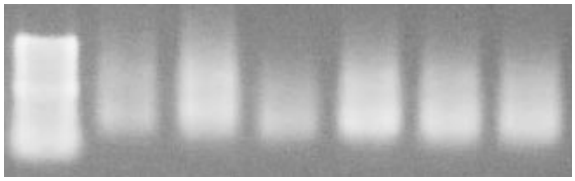


図-5　PCR結果
左からマーカー，次の6レーンはスメア．

表-1　ベクターへのライゲーション試薬1本分量（pGEM®-T Easy Vector Systems Ⅱ：プロメガ　カタログ番号A1380）

試薬名	分量
2 × Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase（灰色の蓋）	5 μl
pGEM-T Easy Vector（50 ng）（黄色の蓋）	1 μl
T4DNA Ligase （3 Weiss units/μl）（緑の蓋）	1 μl
PCR産物	2 μl
滅菌水	1 μl

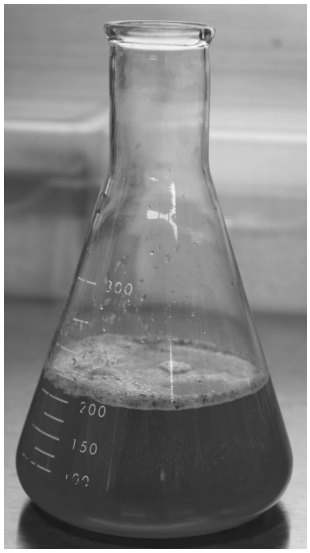


図-6　imMedia™ Amp Blueに200 mlの滅菌水を入れる

（4℃）に置く。

3　大腸菌への遺伝子導入（形質転換）

（1）　imMedia™ Amp Blue1袋（LB培地）を500 mlぐらいの三角フラスコに入れる。その中に200 mlの滅菌水を入れる（図-6）。電子レンジ（500 ～ 600 Wぐらい）にかける。中の様子を見て沸騰する手前で止める。外に出して三角フラスコ全体を回して混ぜる。また，電子レンジに入れ様子を見ながら沸騰する手前で止める。そして外に出して三角フラスコ全体を回して混ぜる。それを繰り返し，三角フラスコ中のimMedia™ Amp Blueが透明になったら作業を終える。三角フラスコはかなり熱くなるので厚手のゴムが付いていない軍手などを着用して作業を行う。

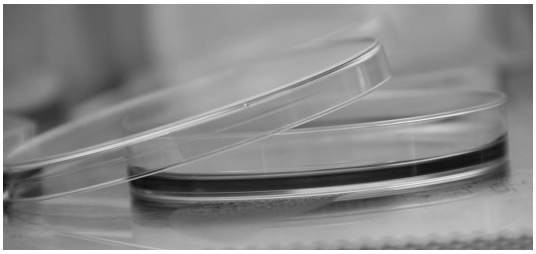


図-7　LB培地を入れた状態

（2）　クリーンベンチに滅菌済みシャーレを用意する。三角フラスコの中身を直接シャーレの線まで注ぐ（シャーレ全体に培地が行き渡ればそれでよい）。

（3）　シャーレの蓋を半分かぶせる。冷めて固まるまで放置する（図-7）。

（4）　固まったら，シャーレの蓋を閉める。逆さに置く。すぐに使わない場合は，逆さまのままサランラップなどで包む。4℃ぐらいの冷蔵庫に置けば2週間ぐらいは保存可能である。

（5）　ウォーターバスを2台用意する。その中に水を入れ37℃と42℃に設定する。

（6）　－80℃からコンピテントセルJM109を取り出し，クラッシュアイスの中で溶解させる。

（7）　1.5 mlチューブをサンプル数分用意する。その中に溶解したコンピテントセルをそれぞれ50 μlずつ入れる。

（8）　さらに，その中に軽くチビタンで遠心した2節のライゲーション産物を2 μl入れる。

（9）　クラッシュアイスの中で20分間置く。

（10）　大きめのチューブ（1サンプル当たり1.2 ml × サンプル数以上の容積）にS.O.C.Medium（SOC培地）を1 ml ×サンプル数分と1 M　$MgCl_2$（$MgCl_2$ ・ $6H_2O$ 10.2 gと滅菌水約45 mlをビーカーに入れスターラーで撹拌しながら$MgCl_2$を完全に溶かす。最後に滅菌水で50 mlにメスアップする。そして，オートクレーブで滅菌する）を10 μl ×サンプル数分および1 M　$MgSO_4$（$MgSO_4$・$7H_2O$ 12.3 gと滅菌水約45 mlをビーカーに入れスターラーで撹拌しながら$MgSO_4$を完全に溶かす。最後に滅菌水で50 mlにメスアップする。そして，オートクレーブで滅菌する）を10 μl ×サンプル数分入れる。軽く混ぜる。

（11）　（9）を42℃のウォーターバスに45秒入れる

（振動はさせない）。

（12） 直ちにクラッシュアイスに入れる。2分間置く。

（13） （10）で作った溶液を（12）のチューブに950 μl ずつ入れる。

（14） 37℃のウォーターバスで2時間以上振動する。全体に不透明になったら終わる。

（15） ウォーターバスとは別に37℃の恒温器を用意する。

（16） （14）の産物を一つのシャーレにつき200 μl 分注する。

（17） コーンラージ棒で塗り広げる（最初にLB培地の真ん中に広げながら塗り，その後シャーレを回しながら塗る）（図−8）。産物がなるべく乾くまで塗り広げる。

（18） 塗り広げ終わったシャーレは逆さまにして37℃の恒温器に入れる。16 ～ 24時間培養する。

4　インサートチェック

（1） シャーレ内にブルーコロニーやホワイトコロニーができているか確認する（図−9）。ホワイトコロニーは目的のDNAが組み込まれている可能性が高い。ブルーコロニーは目的のDNAが組み込まれている可能性は非常に低い。

（2） 確認したいホワイトコロニーの数に応じてPCR試薬の準備をする（試薬の量は表−2）。プライマーはM13 primer M4（5′-GTTTTCCCAGTCACGAC-3′）とM13 primer RV（5′-CAGGAAACAGCTATGAC-3′）を使う。試薬はPCR用のチューブに分注する。

（3） クリーンベンチ内にディスポループの新しいものと使い終わった後に廃棄するためのビニール袋を用意する。

（4） ディスポループの先端でコロニーの一部を採取し，（2）で用意したPCR試薬が入ったチューブに入れる。使い終わったディスポループを廃棄用のビニール袋に入れる。

（5） もし，しばらくそのコロニーを利用したい場合はPCR用のチューブ番号と併せてシャーレの底側からマジックなどで位置や番号を記入する。

（6） PCRを行う。時間は98℃ 10分の後，98℃ 5秒，55℃ 5秒そして72℃ 1分30秒のサイクルを25回，最後に72℃を7分し，4℃で維持する。

（7） 用意した電気泳動用のゲルの穴にPCR産物を注入する。泳動を開始する。ここ以下は2010年の植物防疫9月号（三浦，2010 a）を参照。

（8） ゲルの3分の2ぐらいまでマーカーがきたら止める。

（9） エチジウムブロマイド（エチブロ）が入っている容器に泳動が終わったゲルを入れる。

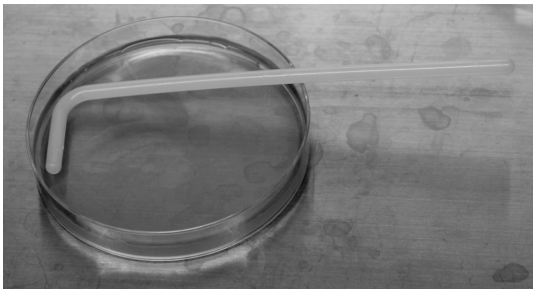
（10） 20分以上染色する（シェークした方が良い）。

（11） トランスイルミメータの上に少量の水をのせラップを敷く。

（12） 染色したゲルをトランスイルミメータにのせる。

（13） トランスイルミメータの電源を入れデジタルカメラなどで撮影する。

（14） バンドがあればその産物はベクターにインサートされている（図−10）。



図−8　コーンラージ棒で塗布する

図−9　コロニーの様子
ホワイトコロニーは目的DNAが挿入成功したと考えられるもの．青いコロニーは挿入が不完全だと考えられるもの．

表−2　インサートチェック用PCR試薬分量

サンプル数	1	2	4	8	12
AmpliTaq Gold 360 Master Mix	16.5	33	66	132	198
M13M4	1.3	2.6	5.2	10.4	15.6
M13RV	1.3	2.6	5.2	10.4	15.6
滅菌水	13.9	27.8	55.6	111.2	166.8

表-3　クローニングでの主な物品リスト（PCR試薬やDNAシーケンス用試薬等は除く）

品名	販売メーカー名	品番	単位	価格（円）
pGEM®-T Easy Vector Systems Ⅱ	プロメガ	A1380	20回分	32,000
imMedia™ AMp Blue（LB培地）	インビトロジェン	Q602-20	20パウチ	47,500
S.O.C. Medium（SOC培地）	インビトロジェン	15544-034	10 × 10 m*l*	15,400
ディスポループ（ニードル型）	アズワン	6-488-03	500本	8,000
コーンラージ棒	アズワン	1-9411-01	1,000本	25,000
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	ワコー	131-15275	500 g	3,200
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	ワコー	135-15055	500 g	4,000
滅菌シャーレ（ϕ90 × 15）	アズワン	6-8626-01	500枚	10,800
ウオーターバス（本体）	アズワン	1-5085-01	1台	193,000
ウオーターバス（振盪ラック）	アズワン	1-5085-02	1台	22,000

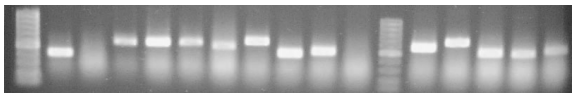


図-10　ホワイトコロニーの目的DNAのインサートチェック
左からマーカー，10レーン（2レーン目と10レーン目はインサートされていない），マーカー，5レーン．

5　DNAシーケンス

（1）　インサートチェクでバンドが出たPCR産物を利用してシーケンスを行う。

（2）　プライマーはPCRで使用したM13 primer M4とM13 primer RVをDNAシーケンス用の濃度にしたものを利用する（植物防疫2010年11月号参照）。

（3）　この場合，DNAシーケンスはダイレクトシーケンスとなる。

6　その他

ここではマイクロサテライト探索を目的としてる。DNAシーケンスの結果，反復配列が見つかった場合，primer 3（http://frodo.wi.mit.edu/primer3/）などでプライマーを設計し，同一遺伝子座で変異があるか調べる。もしあれば，蛍光プライマーを作成しDNAシーケンサーのフラグメント解析などで目的にあった解析を行う。同様な方法でマイクロサテライトを探索して論文化したものに，Hagimori et al.（2008）やWatanabe et al.（2011）などがある。

Ⅲ　問　題　点

2004年2月にカルタヘナ法（遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律：カルタヘナ議定書とは異なる）が施行された。これは遺伝子組換え生物などの不適切な使用などについて罰則を附したものである。ここで紹介したクローニングはP1レベルの遺伝子組換え実験に相当する。PCR産物がベクターとともに導入された大腸菌は，組換え体として適切な封じ込めがされなければならない。クローニング実験を開始するにあたり，それぞれの機関において適切な承認などがあるはずである。それらを理解したうえで行わなければならない。ほとんどの場合，承認書類は難しいものではない。

また，今回LB培地（3節　形質転換の（1））の作成はimMedia™ Amp Blueを使った。これはLB培地を作るときにpH調整に水酸化ナトリウムを使う場合があるからである。水酸化ナトリウムは劇物に指定されているため取り扱いが難しいからであった。

お　わ　り　に

PCR，DNAのダイレクトシーケンスおよびクローニングと簡単な方法を紹介した。これらの方法は簡単ではあるが高価なキットや一つ一つ試薬を調整する方法より値段的に高い試薬調整済みのものを選んだ。これはなるべくミスを防ぐためである。例えば，PCRの試薬はTaq，dNTP，マグネシウム，バッファ等を混ぜたうえでプライマー，テンプレートおよび滅菌水を入れる方法がたぶん一番安くできると考える。しかし，これらの試薬等を混ぜる際にミスが起こりやすい。ミスによるロスを考えるならば，最初から試薬がほとんど入っているプレミックスタイプを使う方がよい。そのような考え方で紹介したつもりである。少しでも皆様のお役に立てれば幸いである。わからないことがあればmiurak@affrc.go.jp宛にメールを送っていただきたい。

引　用　文　献

1）Adachi-Hagimori, T. et al.（2008）: Proc. Roy. Soc. **B275**: 2667 ～ 2673.
2）Fisher, P. J. et al.（1996）: Nucleic. Acids Res. **24**: 4369 ～ 4371.
3）三浦一芸（2010 a）: 植物防疫 **64**: 620 ～ 625.
4）————（2010 b）: 同上 **64**: 766 ～ 773.
5）Watanabe, E. et al.（2011）: Ann. Entomol. Soc. Am.（in press）