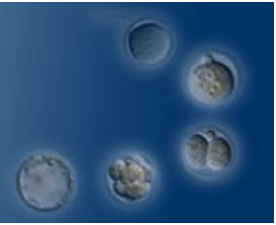


LARGE

Laboratory for
Animal Resources and
Genetic Engineering
RIKEN, Center for Developmental Biology



02. Targeting VectorとControl Vectorの作成

Homology Armsの獲得方法

当方ではHomology ArmsはB6由来のBAC DNAを用いて作製している。(ファージライブラリーはスクリーニングが必要であるなどの理由から、現在ではBAC DNAを用いている。) BACの種類は、使用するES細胞(由来のマウス)のゲノムと同じものを使う必要がある。TT2 ES細胞の場合はCBAとB6のハイブリッドであるのでB6由来のBACを用いる。

1. BAC DNAの取得

1) BAC IDを調べる

まずは標的遺伝子領域を含むBACのIDを調べる必要がある。BACのIDを調べる方法は幾つかあるが当方では下記のWebサイトを利用している。

cDNA配列をBlast Searchする方法

<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>

遺伝子名から調べる方法

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/clone/clonefinder/CloneFinder.html>

可能な限り標的遺伝子の領域が中央にあるBACを選択する。遺伝子が数Mbにおよぶ巨大なものである場合は標的とするExonが中央にあるBACを選択する。(BACの末端は正確でないものも多く存在するため中央にあるものを選ぶ方がよい。) またBAC IDが間違っていることや目的の領域が含まれていないことなどが頻繁にあるのでBAC IDは2つ以上取得した方がよい。

2) 購入先

当方ではBACPAC <http://bacpac.chori.org/>から購入している。オンラインで購入でき注文から一週間程度で届く。

またInvitrogen <http://clones.invitrogen.com/cloneinfo.php?clone=bacpac>などからも購入することが可能である。

2. BACの取り扱い

BAC DNAはクロラムフェニコール耐性の大腸菌に導入された状態(LB Stab)で送られてくる。届いたらまずはプレート(クロラムフェニコール)にストリークする。先にも述べたように頻繁にBAC IDが間違っているので、コロニーからダイレクトPCRを行い、正しいBACを含むコロニーを調べる必要がある。PCRは標的遺伝子領域を500bpから1 kbp増幅する条件で行っている。また必ずグリセロールストックを作製しておくこと。Homology Armsを獲得する方法にもよるがlong PCRで獲得する場合はBAC DNAを精製する必要がある。当方ではNucleoBond Xtra Midで精製を行っている。

3. BAC DNAからArmsを獲得する方法

1) Long PCR法

PCRで増幅することはPrimerにlinkerを付けることもでき、非常に簡便であるが、変異が入ることは避けることはできない。変異は相同組換え効率を著しく低下させるため、可能な限り避けなくてはならない。そのため当方ではエラーの頻度を下げするために、精製したBAC DNA 1～3 ugを鋳型とし、サイクル数を10サイクルまでとしている。Taqは増幅効率のよいLA Taqを用いているが、LA-Taqは変異の入る頻度が高い。10サイクル以上サイクルを増やさないとよりエラーの入りにくいTaq(KOD plusなど)を選択することを考慮する必要がある (LA-Taqの反応条件は<http://www.cdb.riken.jp/arg/protocol.htm>の03.PCRによるHomology Arm増幅を参照)。

作成法についてはMurata, T., Furushima, K., Hirano, M., Kiyonari, H., Nakamura, M., Suda, Y. and Aizawa, S. (2004) ang is a novel gene expressed in early neuroectoderm, but its null mutant exhibits no obvious phenotype. *Gene Expression Patterns* 5, 171-178.を参照。

2) Recombinaseを利用したSubcloning法

GeneBrige社のBAC Subcloning Kitを用いてBACより目的の領域を獲得する方法で、フナコシ社から購入することができるhttp://www.funakoshi.co.jp/h_news/0412/041206_GBR3i.php。この方法はPCRと異なり変異は入らないのでConditional KOに関してはこの方法で行う。原理などは省略させて頂くが、一週間もあればArmsを獲得することができる。

作成法については<http://www.cdb.riken.jp/arg/protocol.html> 2)Targeting Vector Construction /01. Vector construction protocolを参照。

4. Targeting vectorの作成

1) Vector

使用するVectorは<http://www.cdb.riken.jp/arg/cassette.html>を参照。

Targeting Vector

DT-A-pA(-)

09. DT-A/loxP/PGK-Neo-pA/loxP

11. DT-A/Conditional FW

12. DT-A/Conditional REV

13. DT-A/lox71/LacZ-pA/frt/PGK-Neo/frt/loxP/pA

15. DT-A/AFP-pA/PGK-Neo-pA

DT-A-pA(pAがある方が濃縮効果は高い)

16. DT-A-pA/loxP/PGK-Neo-pA/loxP

17. DT-A-pA/lox71/LacZ-pA/frt/PGK-Neo/frt/loxP/pA

18. DT-A-pA/AFP/PGK-Neo-pA

19. DT-A-pA/Conditional KO FW

Control Vector

10. loxP/PGK-Neo-pA/loxP for Control Vector

14. lox71/LacZ-pA/frt/PGK-Neo/frt/loxP/pA for Control Vector

2) Ligation

当方のVectorのMCSは5'側がAscl,AflII,Sall,NotIで、3'側がSwal,NheI,XhoIである。

5'側のMCSはSallとNotIの組み合わせが最もLigation効率がよく、Ascl,AflIIはLigationが難しいので、それらが使えない場合は、工夫が必要である。例えばSallとXhoI(arm)でLigationしたり、新たにPacIやMluIなどの制限酵素サイトをもうける。Ascl,AflIIはリニアライズに用いる程度しか利用できないと考えた方が無難である。

3'側はarmが短いため、比較的容易で、NheIとXhoIで入れるのがよい。NheIはSpeI(arm)やXbaI(arm)でもLigationできるので、便利である。

制限酵素処理は制限酵素(NEBかTOYOBOを使用している)を各2ul(10~20U) 加え、200ulの反応系でOvernight反応させ、カラム(Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System)で精製し、必要な場合はゲルから切り出して、Ligation(TAKARA ligation Solution Ver.2)を行う。PlasmidのBAP処理は必ず行い、切り出しも行う。BAP(TAKARAを使用している)反応は50ulの系にBAPを5ul入れ、37°C 15min、55°C 15min行い、そのままBAPを2ulさらに加えて、55°C 30min反応させ、フェノクロして、カラムで精製する。

Ligationは1~2hr程度で、それ以上はあまり効果がない。Vectorは100ngぐらいで、armは1~4倍ぐらいの比率で、あまり厳密でなくても問題ない。

Competent CellはTransformation効率が $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ のものがよく、当方はInvitrogenのMacha1を使用している。

特にCG richな配列は挿入が難しいものもあるので、そういうものは2回にわけてLigationするか、思い切ってHomology arm短くしてしまう。

3) Gatewayシステムによる作成

従来のLigationではなくInvitrogenのGatewayシステムを用いる方法もあり、Vectorは同様に<http://www.cdb.riken.jp/arg/cassette.html>から分与可能である。若干の違いはあるが、

Ikeya M, Kawada M, Nakazawa Y, Sakuragi M, Sasai N, Ueno M, Kiyonari H, Nakao K, Sasai Y.(2005) Gene disruption/knock-in analysis of mONT3: vector construction by employing both in vivo and in vitro recombinations. *Int J Dev Biol.* 49(7),807-823を参照。

詳細はmutant@cdb.riken.jpへご連絡頂きたい。

作成は手間が少なく、時間も短縮でき、大量に作成する際はGatewayがおすすめである。

5. Control Vectorの作製

当方ではControl VectorはLong PCR法で作製しており、これまで特に問題は起きていない。およそ一週間程度で作製可能である。Control VectorのarmのLong PCRの増幅が難しい配列は、スクリーニングのPCRも難しいことが予測されるので、そういった場合は、始めからarmを3kbぐらいにするか、思い切って領域を変えることが望ましい場合もある。