

制限酵素による DNA 消化条件の最適化

横山 智哉子*¹, 依馬 未佳*², 小川 有貴*², 河村 憲*², 小林 汀弥*²,
矢島 知佳*², 林 優香子*², 村上 千佳*², 森 裕美*², 久富 寿*³

Optimization of DNA digestion conditions with restriction enzyme

Chikako YOKOYAMA *¹, Mika EMA *², Yuki OGAWA *², Ken KAWAMURA *², Saya KOBAYASHI *²,
Chika YAJIMA *², Yukako HAYASHI *², Chika MURAKAMI *², Yumi MORI *², Hisashi HISATOMI *³

(Received March 18 2015)

1. 背景

分子生物学の基本操作として制限酵素によるDNA消化が挙げられる。本実験ではDNAの消化率の向上のため、DNA量、制限酵素量、反応溶液量および消化時間における至適消化条件を調査した。本来、制限酵素活性の1Uは、各酵素反応液50 μL中、至適温度で1時間に1 μgのλDNAを完全に分解する酵素量と定義されている¹⁾。一方、市販の制限酵素は10~15 U/μLの濃度であり、それ未満の濃度では酵素の希釈操作が煩雑になる。本実験では酵素希釈を回避するために1 μLの酵素を基準として各反応に用いた。また、制限酵素により消化されたDNAの分解の抑制は以後の実験に必須である。しかし実際には経時的なDNAの分解が知られており、その分解の程度は保存条件により異なる。本実験では残存率向上のため、温度、日数および塩濃度における至適保存条件を調査し、これら至適条件の調査により実験にかかる時間の短縮や試薬の無駄を省く実験の効率化を目標とした。

2. 材料と方法

2. 1 制限酵素量、pUC19 DNA量、反応溶液量および消化時間における至適消化条件の調査

制限酵素は*EcoR* I, *Hind* III, *Kpn* I, *Pst* I, *Xba* I (TAKARA BIO)を用いた。消化対象はpUC19 DNA (TAKARA BIO)とし、pUC19 (100~200 ng)に制限酵素 Buffer (*EcoR* I 15~75 U, 1×H Buffer (50 mM Tris-HCl

(pH7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, 100 mM NaCl); *Hind* III 15~75 U, 1×M Buffer(10 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, 50 mM NaCl); *Kpn* I 10 U, 1×L Buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol); *Pst* I 15 U, 1×H Buffer; *Xba* I 15 U, 1×M Buffer)を添加し、ブロックインキュベーターを用い37°Cで10~60分間インキュベートした。インキュベート後、反応溶液を80°Cで10分間インキュベートし、酵素を不活化した。その後1%あるいは2%アガロースゲルに供し、電気泳動した。インキュベート時間、制限酵素量、pUC19 DNA量あるいは、反応溶液量を変化させ電気泳動によって至適条件を調査した。

また、制限酵素およびpUC19量を変化させ、real-time PCRにより消化率を測定した。制限酵素は*Kpn* I, *Pst* I, *Xba* Iを用いた。消化対象はpUC19 DNAを用いた。

pUC19(100~200 ng), 制限酵素 Buffer (*Kpn* I 10 U 1×L Buffer; *Pst* I 15 U 1×H Buffer; *Xba* I 15 U 1×M Buffer + BSA Buffer)を反応溶液とし、上記と同じ方法でインキュベートし、電気泳動した(Fig.a)。電気泳動によりDNAの消化を確認した後、消化したpUC19 (5 pg), KAPA SYBR FAST qPCR Master Mixおよび10 pM Forward primer, 10 pM Reverse primerを混和し、95°C/25秒, 60°C/25秒, 72°C/30秒を1サイクルとしたreal-time PCR反応を40サイクルおこなった(LightCycler[®] Nano/Roche Diagnostics)。その際、反応溶液を2種類用意し、一方には、制限酵素切断部位(multi-cloning site)を挟むように設計したForward primer AとReverse primer Bを、もう一方には、multi-cloning siteを挟まないように設計したForward primer CとReverse primer Dを添加した(Fig.b)。反応終了後、得られたCt値よりコピー数を算出し、消化された割合を求めた。

*¹: 物質生命理工学科助教

*²: 物質生命理工科学部生

*³: 物質生命理工学科教授(hisatomi@st.seikei.ac.jp)

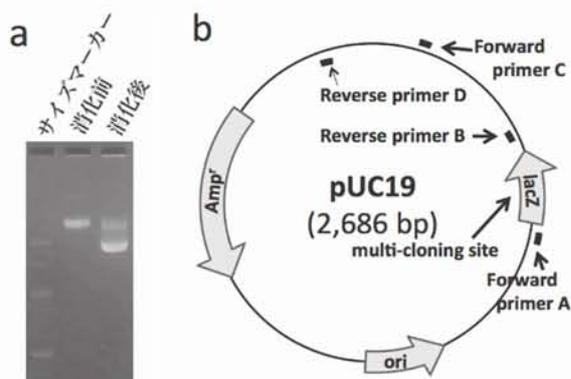


Fig. Electrophoresis (a) and primer sites (b)

2. 2 温度, 日数, 保存溶液によるpUC19の残存率

-20°C, 4°C, 37°Cで消化後～7日間保存した制限酵素消化産物を電気泳動した。

また, pUC19 (900 ng)を1×L Buffer, 10×M Buffer, 10×H Buffer, TE Buffer, 注射用蒸留水に溶解し混合後(各全量30 μL), 4°Cで当日～7日間保存し電気泳動した。

3. 結果

3. 1 pUC19DNA量, 制限酵素量, 反応溶液量および消化時間における至適消化条件の調査

pUC19の量を100～200 ngに変化させた結果, 制限酵素1 μL, 反応溶液量10 μL, 反応時間20分において100～150 ngのpUC19では電気泳動で消化が確認されたが, 200 ngのpUC19では消化が確認されなかった。real-time PCRにおける消化率の算出でも, 100 ngのpUC19では92%の消化が確認されたが, 150 ngでは75%, 200 ngでは69%しか消化されなかった。200 ngのpUC19, 反応溶液量20 μL, 反応時間20分において制限酵素量を1 μL, 3 μL, 5 μLと増やした場合, 電気泳動においてすべて消化が確認された。しかし, 制限酵素1 μL, 200 ngのpUC19に対して反応溶液量10 μLでは消化が確認されなかった。これに対し, 反応溶液量30 μLおよび50 μLでは消化が確認された。制限酵素 (*Kpn* I, *Pst* I, *Xba* I) 1 μL, 反応溶液量10 μLにおいて100 ngのpUC19の消化率は消化時間20分と60分とに差異は確認されず, いずれも98%以上の消化率を示した。

3. 2 温度, 日数, 保存溶液によるpUC19の残存率

pUC19を制限酵素で消化後, -20°C, 4°C, 37°Cで消化後～7日間保存した結果, -20°Cで保存した場合が電気泳動では最も残存が確認され, 2日目までは100%の残存率を示した。4日目以降では7日目まで約60%の残存率だっ

た。これに対し, 4°C, 37°Cでは翌日には30～40%しか残存せず, 4日目～6日目には約10%の残存率となった。また, 制限酵素Bufferでは, MおよびL Bufferでは4°Cにおいて翌日までは100%残存していたが, H Buffer, TE Buffer, 注射用蒸留水では翌日には50～70%の残存率だった。いずれの保存溶液でも3日目以降では20～40%の残存率を示した。

4. 考察

pUC19は10 μLの反応溶液では100 ng程度が至適量であったが, pUC19の消化量を増やすには酵素量の増加ではなく, 反応溶液の全量の増加で対応可能と判断された。また, 反応溶液が増加しても制限酵素は1 μLのまま20分で消化可能と示唆された。消化対象により, 多少の差異は想定されるものの, 市販されている制限酵素を過剰量使用する場合は, 20分程度の消化で充分であり, オーバーナイトによるpUC19の消化は, かえって消化率および残存率を下げることになるかと推測された。また, 本実験ではTAKARA BIO社の制限酵素を用いたが, 他社の複数の制限酵素により再現性を確認している。今回の結果はpUC19のものではあるが, 他のDNAでも同様の傾向が予測された。

今回用いた制限酵素処理産物もpUC19も温度, 日数および保存溶液によって残存率が大きく異なった。DNAの溶解液として一般に用いられるTE Bufferでさえも, 4°CではpUC19の分解が進んだことから, 冷蔵庫によるプラスミドの保存には注意が必要と示唆された。さらに-20°Cでの保存であってもpUC19では4日目以降の残存率が低く, すぐに使わない場合は-80°Cでの保存を推奨する。なお, 5回の凍結融解の繰り返しにより凍結融解の影響を調査した(データ未発表)が, pUC19に関しては量の減少や断片化は確認されなかった。

参考文献

1. タカラバイオ 制限酵素ハンドブック 2011-2012 制限酵素の使用に関して p7