

私にも
できた!

LIFE SCIENCE SERIES

ライフサイエンス実験シリーズ Vol.5

PCR実戦技術編(1)

技術の多様化にともなって、ライフサイエンス研究に占める研究試薬・キットの役割は日に日々大きくなってきています。その一方において、情報が増えすぎて逆に効果的な研究ができなくなっているとの声も聞かれます。

本シリーズは、そのような情報を一旦整理し、初心者の方にも分かりやすく効果的にライフサイエンス実験を解説できないか、との趣旨から企画されました。

今まで、研究員の実験ノートなども参考に、市販のノウハウ本や実施例集ではカバーできなかったような『生の事例』を紹介することで、より身近に技術を感じていただけないかと考え、『PCRを用いる遺伝子クローニング編(Vol.1)』、『遺伝子発現解析(前・後編)(Vol.2,4)』、及び『ウェスタンブロットング・免疫組織染色編(Vol.3)』をご紹介させていただきました。

その中で、「PCR～タンパク質発現実験」の中で使われるDNA関連技術に関して高い関心をもたれている学生さんや先生方が多い印象を受けました。ポストゲノム時代と呼ばれると昨今ですが、意外とDNAを扱う実験が多いようです。また、ポストゲノム時代になってから、初めて遺伝子実験をされるような方も多いように感じました。

そこで、今回から「PCR実戦技術編」と題したシリーズを4回に分けてお届けさせていただくことになりました。本稿が、研究に携われる方の一助になれば幸いです。

この前のシリーズでは、まだ駆け出しの新人だったA子さんは、入社4年目に突入し、ますます張り切っているようです。そんな中、強力なライバルが登場したようですが…。



研究所近郊でレンゲ草を見つけました

今までの 登場人物



Sリーダー
冷静沈着なライフ
サイエンスグルー
プのリーダー



A子さん
今年入社4年目
になる研究員



N代さん
今年入社3年目
になる研究員
(A子さんのライバル)



S本さん
アシスタント

本シリーズは、弊社ウェブサイト(<http://www.toyobo.co.jp/bio>)の「実験お助けコーナー」でご覧いただけます。

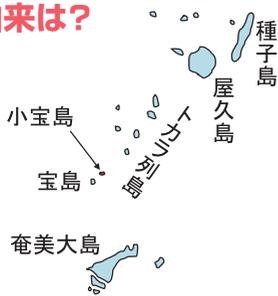
私にも
できた!

ライフサイエンス実験シリーズ Vol.5 1

KOD DNA polymeraseは、1997年に報告されて以来様々な方向へ進化を遂げ、実に多くの分子生物学実験に用いられるようになりました。ここでは、そのKOD DNA polymeraseについて、その過去と応用の歴史について解説いたします。

1-1 KODの名前の由来は？

KOD DNA polymerase (以下、KOD)は当時大阪大学のグループによって鹿児島県の小宝島の硫気孔より分離された超好熱Archaea: *Thermococcus kodakaraensis* KOD1株よりクローニングされました¹⁾。よく、“コダカラ”を“子宝”と思われている方がいらっしゃいますが、“小宝”が正解です。しかし、この島に子宝祈願に訪れる方もいらっしゃるとのこと(このポリメラーゼにご利益があるかは不明ですが…)。ともかく、KODの名前は、“Kodakara Island”に由来します。



このポリメラーゼは、5,013bp (1,671AA)という大変長い open reading frame (Accession No.D29671) 中に見いだされました。KODの分子量は約9万ですので、かなり大きなORFとして発見されたこととなります。実は、このORFにはインティンと呼ばれる2つの挿入配列 (Intein-1:360AA, Intein-2:537AA) が含まれていました。現在販売されているKODは、これらの配列を遺伝子工学的に除去したものです。

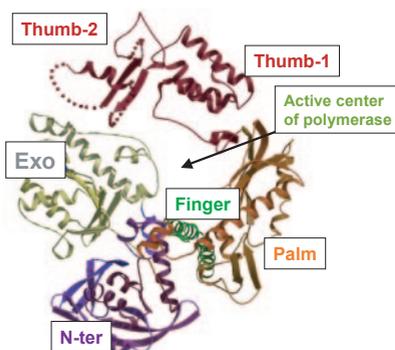
参考までに、インティン (Intein) とはタンパク質分子の一部として翻訳され、合成後に自動的に切除されるアミノ酸配列のことを指します。残った部分 (Extein) はペプチド結合で再結合されます。このインティンは1980年代後半に報告されて以来、生物界に広く確認されています。インティンの多くはhoming endonucleaseのドメインを含み、自身の伝播に関わっていると考えられています。この配列は利己的遺伝子要素として太古の昔にKODの遺伝子中に進入してきたものと推察されます。

1) M. Takagai, M. Nishioka, H. Kakhara, M. Kitabayashi, H. Inoue, B. Kawakami, M. Oka and T. Imanaka, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4504-4510 (1997)

1-2 KOD DNA polymeraseの特性

Family B (α 型) に分類されるKODのようなPCR用酵素がTaq DNA polymerase (以下、Taq) などの好熱細菌由来のFamily A (PolI型) に属するPCR用酵素と大きく異なる点としては、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性 (校正活性) を有する点を挙げることができます。この活性を持つことにより、KODは、Taqに比べ、約50~80倍という驚異的に高い正確性を示し、遺伝子のクローニングをはじめとする様々な用途に利用されています。

また、KODだけに備わっている性質も明らかにされています。1分子の酵素が一度に伸長できる塩基数 (Processivity) は同じ α 型に属するPfu DNA polymerase (以下、Pfu) が約20であるのに対し、KODは300以上と、飛びぬけて優れていることが分かっています。また、酵素を過剰量添加した



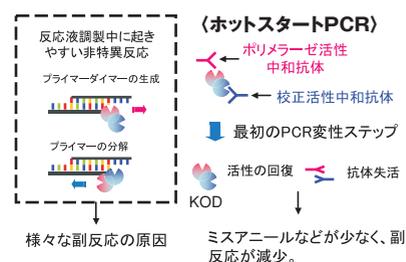
条件での、1秒間の伸長塩基数 (Elongation rate) も、Pfuが約25、Taqが約61であるのに対して、KODは約106-138と極めて優れていることが分かっています。

また、2001年にKODの立体構造が明らかとなり²⁾、その後のKODの改良研究は大きく進展しました。KODに特有な配列が立体的にどの部分に配置されているかも明らかとなり、KODの高い伸長性や効率に対する理解が深まりました。

2) H. Hashimoto, M. Nishioka, S. Fujiwara, M. Takagi, T. Imanaka, T. Inoue and Y. Kai, *J. Mol. Biol.*, **306**: 469-477 (2001)

1-3 様々な分野への応用

PCR反応溶液を調製してからPCRが開始されるまでの間に、ポリメラーゼとエキソヌクレアーゼ活性が発現して、プライマーなどを基点として様々な副反応が起こることが、非特

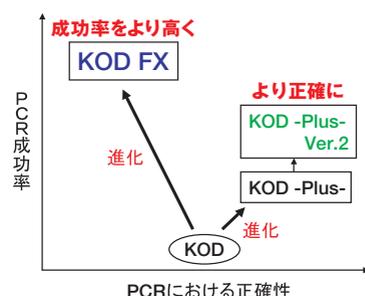


異増幅の要因の一つとして考えられています。そこで、KODのポリメラーゼ活性と校正活性に対する2種類の中和抗体が作製されました³⁾。この抗体を酵素に混合しておくことにより、常温下でのポリメラーゼ、及び校正活性を抑制することができます。抗体は最初の変性ステップで変性し、PCRには影響を及ぼしません。この技術は、『ホットスタートPCR法』と呼ばれ、高正確性PCR酵素「KOD -Plus-」に最初に取り入れられました。KOD -Plus-は更にバッファーを最適化することで、より高い正確性を達成し、現在、クローニング用酵素のスタンダードとなっています。

3) H. Mizuguchi, M. Nakatsuji, S. Fujiwara, M. Takagi and T. Imanaka, *J. Biochem. (Tokyo)*, **126**: 762-768 (1999).

1-4 高成功率という切り口

近年、研究の進展の速度は速まり、様々な分野で分子生物学領域の技術を使用するニーズも増大しました。その中で、最も必要とされるPCR酵素の特性の一つとして、『PCRの成功率』が挙げられるようになりました。難しい配列を増幅しなくてはならない場合や、設計に無理のあるプライマーを使わざるを得ない場合においても、迅速に実験を進める必要がでてきたのです。そこで、KOD -Plus-の正確性をそのまま (Taqの約80倍) に成功率を向上させた「KOD -Plus- Ver.2」と、独自の技術を用いて格段にPCR成功率を向上させた「KOD FX」が開発されました (KOD FXの正確性はTaqの約11倍)。KODは、今後さらに新たな境地を目指して、日々進化を続けています。



A子さんはT社バイオ研究所のライフサイエンス試薬開発グループの研究員です。新人だった彼女も入社4年目となり、そろそろ後輩の指導などのような仕事も増えてきています。

また4月からは、Sリーダー指導の下、A子さんを中心に数名の研究員とアシスタントさんでグループを作り、『PCRをテーマとした調査・改善活動』を行わなくてはなりません。今回、A子さんのグループには、以下のようなテーマが与えられました。しかし、あまりにも抽象的なテーマに、A子さんは少し戸惑っています。

課題：PCR実験を円滑に進めるにはどうすればよいか？

2-1 研究者はPCR実験の何に困っているの？

今日は、1回目の会合です。A子さん達は、早速、「PCR実験を円滑に進めるにはどうすればよいか」について話合うことにしました。しかし、みんながあまりにも色々なことを言ったため、結局全く収集がつかなくなってしまいました。



翌週行われた2回目の会合では、Sリーダーの指導もあって、まず、「PCR実験がうまくいかない」理由について、思いつくままポストイットに理由を書き付けていきました(図1)。みんな、思うところがあったのか、みるみる間に机はポストイットだらけになってしまいました。ざっと眺めると、みんなの意見は、幾つかに分類することができそうです。

そこで次に、「PCR実験がうまくいかない」ことに対する要因を分類してみました(図2)。すると、要因は、ターゲットのGC含量が高いなどの「増幅ターゲット」側の要因、変な場所にしかプライマーを設計できないなどの「実験上の制限」、「ポリメラーゼの選択」、「実験テクニック」の大きく分けて4つにきれいに分類できることが分かりました。順を追って考えると、きちんとまとめることに、みんな少し感動しました。

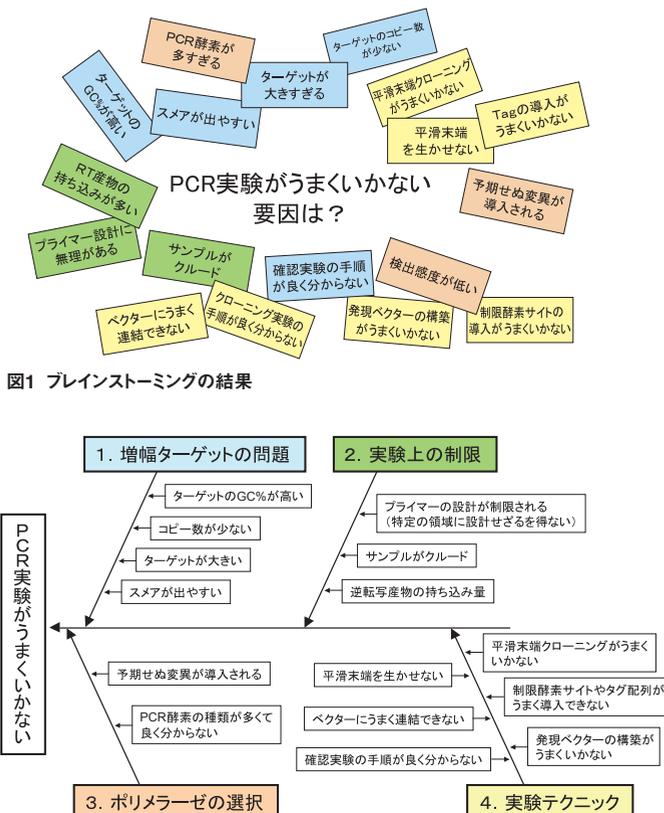


図1 ブレインストーミングの結果

図2 要因の解析結果

2-2 高成功率PCR酵素「KOD FX」

次に、A子さん達は対策を打つことにしました。今回挙げられた要因のすべてに対して対策を打つことで、理論的には、PCR実験はスムーズに進むようになるはずでした。

話し合いを進める中、「要因の1.と2.を考慮して開発されたのが『KOD FX』ではないの?」、という意見が出されました。KOD FXは、KOD DNA polymeraseをベースに、PCR成功率を考慮して最近開発されたPCR酵素です。様々な改良により今までにないくらいまでPCR成功率が向上しています。

そこで、A子さんたちは、要因の3.を『KOD FXをどういう時に使うべきか』、ということに置き換えて、図3に示すような対照表を作成してみました。結局、要因1.と2.はKOD FXをうまく用いることで、解決できそうです。若干正確性が落ちるので、クローニング実験に関してはKOD -Plus-にはかないそうもありませんが、従来のTaqベースの酵素と比べるとはるかに良いに違いありません。

結局、A子さん達は要因1.~3.の対策として、グループで年間を通じて、『KOD FXを用いる成功率向上に関する事例』を作成することにしました。残った要因4.の『実験テクニック』は、PCRでの増幅そのものではなく、PCRの周辺技術という感じです。これに関しては、Sリーダーに何やら良い考えがあるようです。

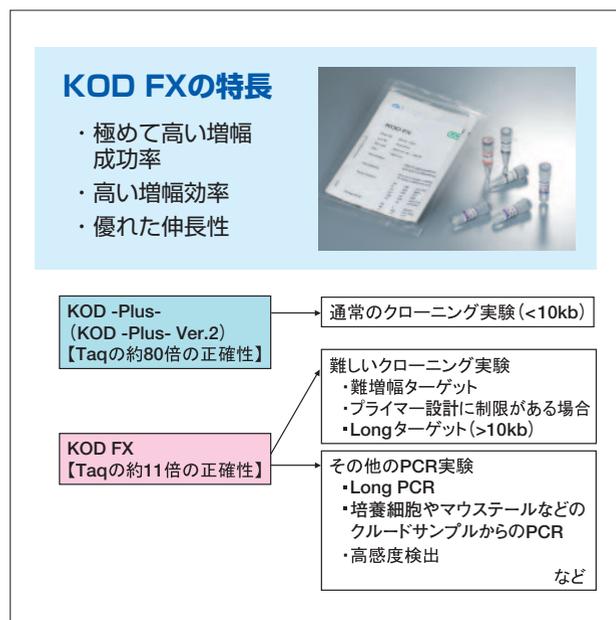


図3 PCR酵素の使い分け



今回は、10kb以上のターゲットの増幅において度々問題となる、非特異増幅の発生とプライマー長、及び精製グレードの関係について検討を行いました。

●プライマーの精製グレードの影響の検討

この実験では、比較的増幅が難しく、また、スミアやエキストラバンドが出やすいことの知られているβ-globin遺伝子17.5kbをターゲットとして検討を行いました。テンプレートとしては、50μlの反応あたり、ヒトゲノムDNAを50ngを用いて行いました。プライマーは、脱塩、カートリッジ精製、及びHPLC精製の3通りの方法で精製されたもの(表1のA及びB)を用いました。サイクルは、Long PCRに有効とされている2ステップサイクル(30サイクル)とステップダウンサイクル(5→5→20サイクル)で行いました(右図参照)。

その結果、脱塩グレードのプライマーの場合、いずれのサイクル条件においても、スミアが出やすい傾向にあることが分かりました(図4)。一方、カートリッジ精製とHPLC精製グレードのプライマーでは、ステップダウンのサイクル条件で目的バンドのみのキレイな増幅を確認することができました。この結果から、長いターゲットを増幅する場合、カートリッジ精製以上のグレード10kb以上のプライマーを用いることにより良好な結果が得られることが分かりました(図4)。

●プライマー長の影響の検討

次に、18merから40merまで2base刻みで長さを変化させたプライマー(表1のNo.1~12、精製は、いずれもカートリッジ精製グレード)を用いて検討を行いました。

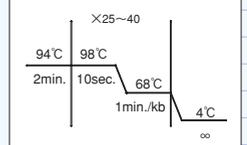
その結果、2ステップのサイクル条件では、24~40merでターゲットの増幅が認められ、同時に出現したエキストラバンドはプライマーが長い程少ない傾向にあることが分かりました(図5)。一方、ステップダウンのサイクル条件では、28~40merでターゲットの増幅が得られ、エキストラバンドはプライマー長に関わらず出現しませんでした。この結果から、Long PCRでは、通常より長めのプライマーを設計し特異性を上げると共に、アーニリング(及び伸長反応)を比較的高い温度に設定することでより良い結果が得られることが分かりました。

この傾向は、KOD FX以外のPCR酵素においても、ある程度当てはまると推察されます。

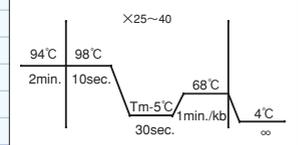
【プロトコル#1】KOD FXの基本反応条件

試薬	添加量(μl)	終温度
2×PCR buffer for KOD FX	25	1×
2mM dNTPs	10	0.4mM each
10pmol/μl Primer #1	1.5	0.3μM
10pmol/μl Primer #2	1.5	0.3μM
Template DNA	X	{ Genomic DNA : ~200ng/50μl Plasmid DNA : ~50ng/50μl cDNA : ~200ng (RNA相当量)/50μl
PCR grade water	Y	
KOD FX (1.0U/μl)	1	1.0 U / 50μl
Total	50 (μl)	

2ステップサイクル



3ステップサイクル



ステップダウンサイクル

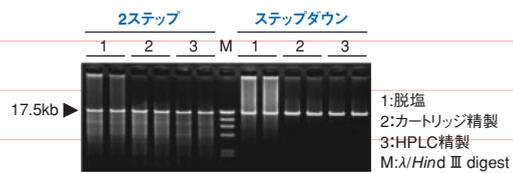
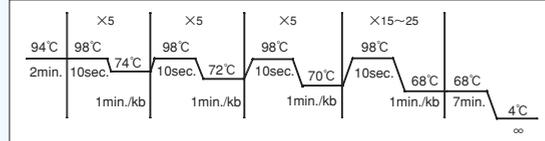
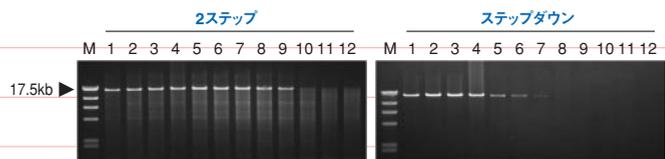


図4. プライマーの精製度が非特異反応に及ぼす影響



F側Primer (Primer長)

- 1: hBG17.5F40 (40mer) 7: hBG17.5F28 (28mer)
2: hBG17.5F38 (38mer) 8: hBG17.5F26 (26mer)
3: hBG17.5F36 (36mer) 9: hBG17.5F24 (24mer)
4: hBG17.5F34 (34mer) 10: hBG17.5F22 (22mer)
5: hBG17.5F32 (32mer) 11: hBG17.5F20 (20mer)
6: hBG17.5F30 (30mer) 12: hBG17.5F18 (18mer)

R側Primerは、1~12共通で、hBG17.5R (35mer)を使用。

図5. プライマー長が非特異反応に及ぼす影響

表1. 実験に用いたプライマー配列

No.	Primer名	Primer配列	PrimerSize (mer)	GC%	Tm (°C)	精製グレード
A	hGB17.5F	TGCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	35	49%	77.5	脱塩、カートリッジ、HPLC
B	hGB17.5R	ACATGATTAGCAAAAGGGCCTAGCTTGGACTCAGA	35	46%	76.9	脱塩、カートリッジ、HPLC
1	hGB17.5F40	GAC TTTGCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	40	48%	78.8	カートリッジ
2	hGB17.5F38	CTTTGCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	38	47%	78.0	カートリッジ
3	hGB17.5F36	TTGCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	36	47%	77.7	カートリッジ
4	hGB17.5F34	GCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	34	50%	75.9	カートリッジ
5	hGB17.5F32	ACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	32	47%	72.3	カートリッジ
6	hGB17.5F30	CTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	30	47%	69.9	カートリッジ
7	hGB17.5F28	GCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	28	46%	67.4	カートリッジ
8	hGB17.5F26	TCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	26	42%	64.0	カートリッジ
9	hGB17.5F24	TGTGATTATGACTATCCCACAGTC	24	42%	61.6	カートリッジ
10	hGB17.5F22	TGATTATGACTATCCCACAGTC	22	41%	57.9	カートリッジ
11	hGB17.5F20	ATTATGACTATCCCACAGTC	20	40%	52.7	カートリッジ
12	hGB17.5F18	TATGACTATCCCACAGTC	18	44%	49.7	カートリッジ

2-3 強ライバル出現

A子さんたちの話し合いの中で、PCR実験の問題の一つとして挙げられた「実験テクニック」に関して、Sリーダーから提案がありました。実験テクニックに関する課題を年間に数回に分けて出して、その課題の解決を通じてそれぞれの手法の裏に潜む注意点・問題点を明らかにするというのです。いつも冷静沈着なSリーダーには、なにやら考えがありそうです。

結局、サークル員の中から代表としてAさんとN代さんに、それぞれ関連のある課題が出されることになりました。Aさんは、後輩のN代さんに先輩の威厳を示さなくてはとあせているようです。一方、N代さんは、Aさんとは違って、学生時代から分子生物学分野の研究を行ってきた経歴がありますし、負けん気では一歩も引けをとりません。

さて、二人には、次のような課題が出されました(皆さんも是非考えてみてください)。



今後の活動方針 (対策)

- 要因1~3 → PCR事例を収集
- 要因4 → Sリーダーの出す課題にチャレンジ

A子さんへの課題：

- 平滑末端を有するPCR増幅断片の平滑末端クローニング方法の手順をまとめなさい。
- その手法を用いて、human β -Actin cDNAのC末端欠損変異体を作製しなさい。

条件：・Accession No.X00351のcDNAクローンを準備するので、そのプラスミドをPCRの鋳型とすること。
 ・開始コドンの位置にNde Iのサイトを導入すること。
 ・732番目のGCTをTGA(ストップコドン)に変更し、なるべくすぐ後ろにXba Iサイトを導入すること。
 ・作製したクローンを大腸菌DH5 α に形質転換した後に、Nde IとXba Iで切り出して、発現ベクターに組換えること。

N代さんへの課題：

- 平滑末端を有するPCR増幅断片をTAクローニングする手順をまとめなさい。
- その手法を用いて、human G3PDH cDNAのC末端欠損変異体を作製しなさい。

条件：・Accession No.M17851のcDNAクローンを準備するので、そのプラスミドをPCRの鋳型とすること。
 ・開始コドンの位置にNco Iサイトを導入すること。
 ・796番目のTATをTGA(ストップコドン)に変更し、なるべくすぐ後ろにXba Iサイトを導入すること。
 ・作製したクローンを大腸菌DH5 α に形質転換した後に、Nco IとXba Iで切り出して、発現ベクターに組換えること。

2-4 平滑末端クローニング (Aさんのプロトコール)

KOD DNA polymeraseの優れた正確性を担っているのは校正活性とも呼ばれる3'→5'エキソヌクレアーゼ活性です。この活性によって、KOD-PlusやKOD FXなどのPCR酵素によって増幅されたPCR産物の末端は平滑化されています。よって、PCR産物は、EcoRVやSma Iなどの平滑末端を生じる制限酵素サイトに直接クローニングすることが可能です。

Aさんは、この課題を与えられた瞬間に過去の失敗を思い出しました(Vol. 1参照)。Aさんは、脱リン酸化処理されたベクターにPCR産物を直接連結しようとして失敗したのです。苦い思い出ですが、今となってはありがたい失敗でもあります。Aさんは、失敗した直後に、平滑末端クローニングのプロトコールを完全にまとめていました。

平滑末端サイトを用いてクローニングする場合、ベクターのセルフライゲーションが問題になります。そこで、ベクターを制限酵素で切断した後に脱リン酸化して使用するのが普通です。ライゲーションが成立するにはDNAの5'末端がリン酸化されていないと、脱リン酸化されたサイト同士は連結することができないからです。

しかし、ここで注意しなくてはならないのが一般的にPCRに用いられるプライマーの5'末端がリン酸化されていないということです。当然、そのプライマーを用いて得られたPCR産物の5'末

端も、制限酵素で処理された末端とは異なりリン酸化されていません。DNA断片を連結するには少なくとも片方の断片の5'末端はリン酸化されていなければならないので、このような場合、リン酸化されたプライマーを用いてPCRを行うか、PCR産物をリン酸化して用いる必要があります。

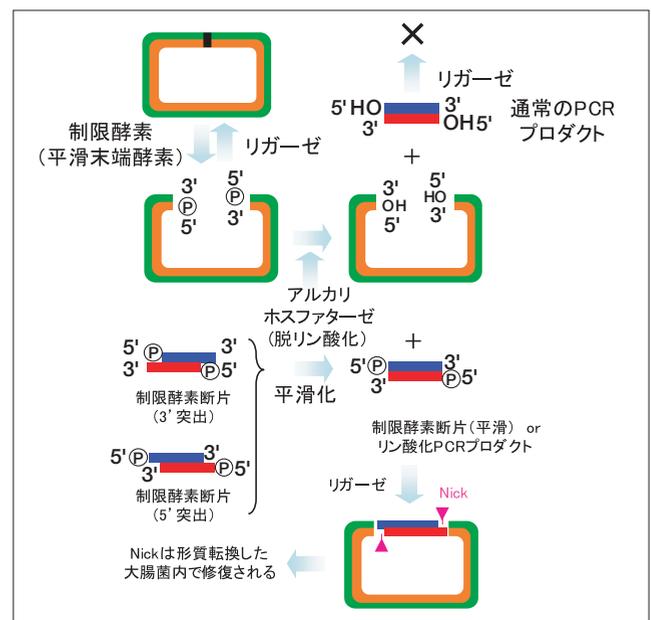


図6 平滑末端クローニングのフロー

ワンポイントメモ ①

- ・KOD -Plus-やKOD FXのPCR産物は平滑化されています。
- ・通常PCRに用いられるプライマーはリン酸化されていません。

【プロトコール#2】プライマーのリン酸化

【使用試薬】

- ・50pmole/ μ l (μ M) 以上のPrimer溶液
- ・T4 Polynucleotide Kinase (Code No. PNK-111)
- ・rA TP (Code No. ATP-111) \rightarrow 10mMに希釈して使用

Primer (50pmole/ μ l [50 μ M])	14 (μ l)
10 \times Protruding End Kinase Buffer	2
10mM rATP (Code No.ATP-111を希釈して使用)	2
T4 Polynucleotide Kinase (5 \sim 20U/ μ l) *1	2
Total	20

↓
37 $^{\circ}$ C、1h反応

↓
95 $^{\circ}$ C、5min (T4 Polynucleotide Kinaseを失活)

↓ ← 50 μ l 滅菌ミQ水を添加します

↓
10pmole/ μ l [10 μ M] primer溶液として使用します*2*3

↓
PCRを行います

↓
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up- (Code No. NPK-601) などによる精製

*1 T4 Polynucleotide Kinaseは添加できる最大量を添加します(最終液量の10%)。

*2 このままPCR反応に使用します。

*3 凍結して何度でも使用可能です。

【プロトコール#3】PCR産物のリン酸化

【使用試薬】

- ・高正確性PCR酵素の精製PCR産物(平滑末端)
- ・T4 Polynucleotide Kinase (Code No. PNK-111)
- ・rATP (Code No. ATP-111) \rightarrow 10mMに希釈して使用

精製PCR産物	~1 μ g
10 \times Blunt End Kinase Buffer	5
10mM rATP (Code No.ATP-111を希釈して使用)	5
T4 Polynucleotide Kinase (5 \sim 20U/ μ l) *1	5
Total	50 (μ l)

↓
37 $^{\circ}$ C、1h反応

↓
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up- (Code No. NPK-601) などによる精製

*1 T4 Polynucleotide Kinaseは添加できる最大量を添加します(最終液量の10%)。

【プロトコール#4】ベクターの脱リン酸化

【使用試薬】 *E. coli* Alkaline Phosphatase (Code No. BAP-111)

精製ベクター溶液(制限酵素処理後精製したもの)	0.5 \sim 2.5 μ g
10 \times Buffer	10
<i>E. coli</i> Alkaline Phosphatase (0.1 \sim 1U/ μ l) *	10
Total	100 (μ l)

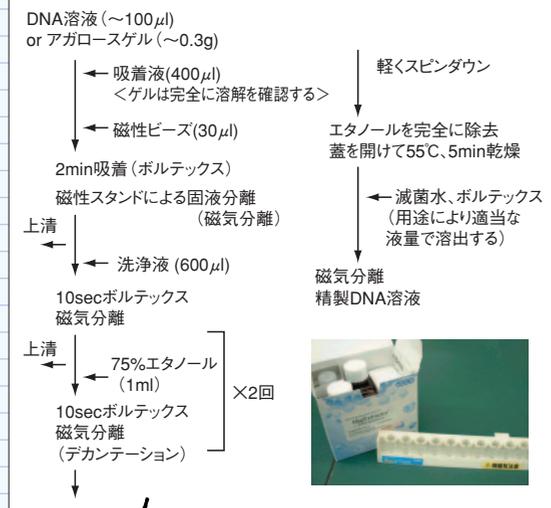
*目安として5 \sim 20pmolesの5'末端に対して2Uですが、添加できる最大量(最終液量の10%)を添加することでほとんどの場合、問題なく脱リン酸化できます。

↓
平滑末端、3'突出末端 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C、60min

↓
5'突出末端 \rightarrow 37 $^{\circ}$ C、60min

↓
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up- (Code No. NPK-601) などによる精製

【プロトコール#5】MagExtractor™-PCR & Gel clean up- を用いるDNA断片の精製(磁性ビーズ使用)



上に示した平滑末端クローニングで用いられるプロトコールは便利なので、様々な場合で役に立ちます。また、DNA断片の精製は、ほぼすべての組換え工程の中で使用されますので覚えておくと良いと思います(少量の場合は1/2スケールで行うこともできます)。

ワンポイントメモ ②

- プロトコール#5の精製法では約40bp以下のDNA断片は除去されます。
- ゲルからの切り出しは、UV照射によりDNAが損傷を受けるため効率が低下します。トランスイルミネーター上で切り出す際は、アクリル板などを間にはさみ、短時間で切り出す配慮が必要です。

2-5 平滑末端PCR産物のTAクローニング (N代さんのプロトコール)

KOD -Plus-やKOD FXのPCR産物の末端は平滑化されていますので、そのままではTAクローニングすることはできません。このような場合、KOD専用のTAクローニングキット「TARget Clone™ -Plus- (Code No. TAK-201)」を用いると便利です。原理は、増幅産物にTaqを混合して末端にdAを付加するという単純なものです。しかし、KODは熱安定性に優れ、PCR後の反応液の中でも活性を保っているため、せっかくdA付加が起きてもKODの校正活性でまた削られてしまいます。よって、このキットには、KODの校正活性に対する中和抗体が使用されています。つまり、この抗体でKODの校正活性を抑えている間に、Taqを用いてdA付加反応を行うわけです(図7)。そして、そのままTベクターにライゲーションします。この方法は、PCR産物を精製せずにそのままベクターにクローニングすることができるので、とても便利です。

ワンポイントメモ ③

KOD -Plus-やKOD FXのPCR産物は平滑化されていますが、TARget Clone™ -Plus- (Code No. TAK-201)を用いることで、簡単にTAクローニングすることが可能です。

【プロトコル#6】KOD産物のTAクローニング

試薬	添加量
PCR産物 from KOD	9 μ l
10x A-attachment Mix	1
60°C、10min	

試薬	添加量
DW	(3-X) μ l
2x Ligation Buffer	5
pTA2 Vector (50ng/ μ l)	1
上記反応物	X
T4 DNA Ligase	1
室温 (15~25°C)、30min 形質転換	

Vector : PCR産物は1:3以上に設定します。

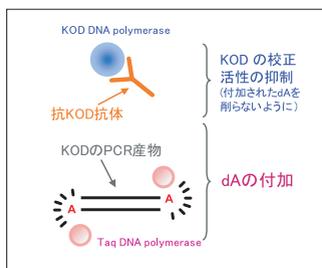


図7 KOD PCR産物のTAクローニングの原理

2-6 二人の解答

今日は朝から、A子さんとN代さんは、Sリーダーから出されたC末端欠損変異体作製の課題に一心不乱に取り組んでいます。何やら張り合っているようです。

A子さんは、鑄型はプラスミドなので、少し強引な設計のプライマーを用いてもきちんと増幅されるはずと考えています。まず、A子さんは、指定どおりNde I サイトを含んだフォワードプライマー (BACT-F) を設計しました (図8)。次に、リバーズ側のプライマーの設計ですが、まず、指定のあった732番目のGCTをTGAに変更しました。次に、その直後の配列がXba I サイトとホモロジーの高い配列であったこともあり、そのまま続けて直近にXba I サイトを導入し、BACT-Rプライマーを設計しました (図8)。A子さんは、このプライマーを用いてKOD -Plus-で増幅したPCR産物を、先程の平滑末端クローニングの方法に従って、クローニングするつもりです。この程度の増幅ならば、KOD FXを使うまでもありません。慎重なA子さんは、最後に、組換え後のプラスミドの制限酵素マップをシュミレーションすることも怠りませんでした。A子さんは、気になるのか、余った時間でN代さんの配列も何やらコンピューターで解析しているようです。

N代さんも、フォワードプライマーはさっさと設計してしまいました (G3PDH-F:図9)。次に、リバーズプライマーの設計ですが、N代さんは、ストップコドンの種類が“TGA”に限定されていることと、続けてXba I サイト (TCTAGA) を導入するということから、すぐに、「これはDamメチラーゼの問題だ! 確か、Damメチラーゼの認識配列はGATCのはず…」と“ピンツ”とききました。彼女は、学生時代、このミスで大切な1ヶ月間を無駄にしてしまった苦い経験がありました。N代さんは、Sリーダーによって巧妙に仕掛けられたトラップをかいぐるように、注意深くリバーズプライマー (G3PDH-R) を設計しました (図9)。

結局、TGA (ストップコドン) から3塩基も下流にXba I サイトを導入しなければなりません。G3PDH-Rプライマーは多くのミスマッチを含みますが、特異的な部分を伸ばしたので問題ないはず。また、上流側のAの連続が気になったので、下流側を少し長めに設計しました。N代さんは、このプライマーを用いてKOD -Plus-で増幅したPCR産物をTARget Clone™ -Plus- (Code No. TAK-201)を用いて直接TAクローニングするつもりです。

二人とも、何とか夕方にはプライマーの注文を終わらせることができました。念のため、2人は自分の設計したプライマーのデザイン案をSリーダーのところに持ち寄りました。Sリーダーの机の上に広げられた解答をしばらく眺めていたA子さんとN代さんは、それぞれ内心“にやり”としました。

ちょうどその時、Sリーダーのメガネのレンズが夕日に反射して一瞬“キラリ”と輝いたのを、横にいたアシスタントのS本さんは見逃しませんでした。

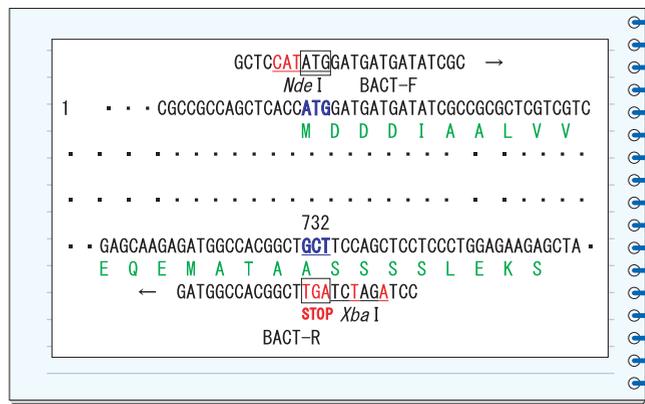


図8 A子さんの解答 β -actin [Accession No.X00351] のC末端欠損変異体の作製方法

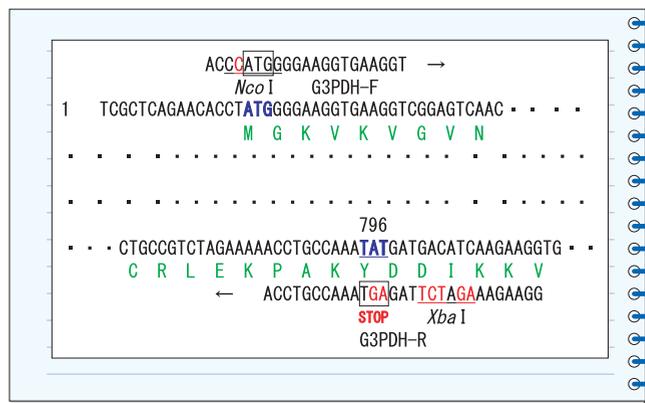


図9 N代さんの解答 G3PDH [Accession No.M17851] のC末端欠損変異体の作製方法

みなさんも2人の解答が正しいかどうかを、吟味してみてください。【注意:2人の解答には間違いが含まれている可能性がありますので、上の図を実験の参考にはしないでください。】

2人の解答の解説は、次号「PCR実戦技術編(2)」でお届けする予定です。

次回、をうご期待!!

Q & A

A子さん KOD -Plus- Ver.2とKOD FXはどのように使い分ければいいですか？

Sりーダー KOD -Plus- Ver.2はKOD -Plus-の正確性を落とさずに〈Taqの約80倍〉、PCR成功率を向上させています。よって、難しい配列などを、正確性を落とさずに増幅したいような場合に用います。

KOD FXは、KOD -Plus- Ver.2以上にPCR成功率にこだわって改良を加えたポリメラーゼです。GCが高く、どの酵素を用いても増幅が困難なターゲットの増幅や、10~20kb以上程度の比較的大きなターゲットの効果的な増幅、プライマーの設計に制限があり適切な位置にプライマーが設計できなかった場合の増幅などに有効です。しかし、KOD -Plus-に比べて正確性が若干低下している〈Taqの約11倍:PCRエラーは144,535塩基中、19塩基程度〉なので、それを考慮して実験する必要があります。よって、正確性を優先するPCRは、まずはKOD -Plus- もしくはKOD -Plus- Ver.2を用いることを薦めます。

A子さん 高成功率という言葉の意味が良く分からないのですが…

Sりーダー GC含量の高いターゲットなどの増幅を行うときに、一回のチャレンジで成功する確率が向上しているようなイメージです。クルードなサンプルにおいても同様なことが言えます。今までどの酵素を用いても成功しなかったようなPCRもKOD FXを用いることで増幅できる可能性がありますので、冷蔵庫で眠っているプライマーを掘り起こしてきて、一度チャレンジしてみると良いかも知れません。

A子さん KOD FXはクルードなサンプルの増幅にも有効ですか？

Sりーダー KOD FXは細胞などを含むクルード溶液からのPCRにも有効です。実際の増幅では、細胞懸濁液の液量を反応液50μlに対して2μl以下にすると効果的に増幅できます。ヒトの細胞ならば、1反応に 2×10^4 cells程度あれば十分です。ヒト細胞株 (Jurkat細胞) の培養液を用いて、 2×10^4 cellsから8.5kbの増幅の成功例があります。また、KOD FXはマウステールなどからのPCRにおいても有効です。

A子さん KOD FXの末端も完全に平滑化されているのですか？

Sりーダー KOD FXは、KOD -Plus-に比べて正確性は若干低下していますが、末端を平滑化するのに十分な校正活性を有しています。

よって、KOD FXで増幅されたDNA断片は、KOD -Plus-のPCR産物と全く同じ方法を用いて、クローニングすることができます。



関連製品紹介

品名	用途	包装	Code No.	価格
KOD -Plus-	高正確PCR	200U×1本	KOD-201	¥30,000
KOD -Plus- Ver.2	” (さらに高効率)	200U×1本	KOD-211	¥32,000
KOD FX	高成功率PCR	200U×1本	KFX-101	¥35,000
KOD Dash	インサートチェック	250U×1本	LDP-101	¥25,000
Blend Taq®	正確性の不要なPCR全般	250U×1本	BTQ-101	¥19,000
Blend Taq® -Plus-	” (Hot start可能)	250U×1本	BTQ-201	¥21,000
RevaTra Ace -α-®	高効率RT	100回用	FSK-101	¥53,000
Ligation high Ver.2	高効率Ligation	750μl×1本	LGK-201	¥22,000
T4 Polynucleotide kinase	DNAのリン酸化	1,500U×1本	PNK-111	¥15,000
rATP	リン酸化の基質	50μmoles/0.5ml	ATP-111	¥15,000
<i>E. coli</i> Alkaline Phosphatase	DNA断片の脱リン酸化	100U×1本	BAP-111	¥15,000
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-	DNA断片の精製 (磁性ビーズ使用)	200回用	NPK-601	¥28,000
MagExtractor™ -mRNA-	Poly (A) ⁺ RNAの精製 (磁性ビーズ使用)	5回用	NPK-801	¥44,000
MagExtractor™ -Plasmid-	プラスミドの精製 (磁性ビーズ使用)	500回用	NPK-301	¥33,000
Magical Trapper	磁性分離 (磁性スタンド)	1個	MGs-101	¥38,000
TArget Clone™	TA Cloning	10回用	TAK-101	¥12,000
TArget Clone™ -Plus-	” (KOD専用)	10回用	TAK-201	¥16,000
Competent high JM109	高効率形質転換	0.1ml×10本	DNA-900	¥17,000
Competent high DH5α	高効率形質転換	0.1ml×10本	DNA-903	¥17,000
Competent Quick DH5α	サブクローニング用形質転換	0.1ml×20本	DNA-913	¥29,000