

LIFE SCIENCE SERIES

ライフサイエンス実験シリーズ Vol.8

PCR実戦技術編 (4)

本シリーズは、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ライフサイエンス実験のコツなどについて、弊社研究員の実験ノートなども参考に、生の事例を交えながら紹介させていただいています。Vol.5から、最もリクエストの多かったPCR関連技術を更に深くご紹介する目的で、「PCR実戦技術編」をお届けしています。

さて前号では、Sリーダーからまたまた難問が出題され、その問題をもぐってA子さんとライバルのN代さんの間でバトルの予感が漂っていましたが…。

皆さんも、是非、前号で2人の考えた解答を確認してから、本号を読み進めてください。



前号の課題
ダイジェスト

●課題: 大腸菌のDHFR (ジヒドロ葉酸還元酵素) を発現するベクターがあります。そのDHFRのN末端にタグ配列を付加するにはどのようなプライマーを設計すれば良いですか?

〈条件〉

- インバースPCR法を用いること。
- タグのアミノ酸配列は以下のとおり。
Leu-Ile-Arg-Arg-Ile (L-I-R-R-I)
タグは開始コドンの隣りに挿入すること。
- 発現は大腸菌で行います。



図1 DHFR発現ベクター

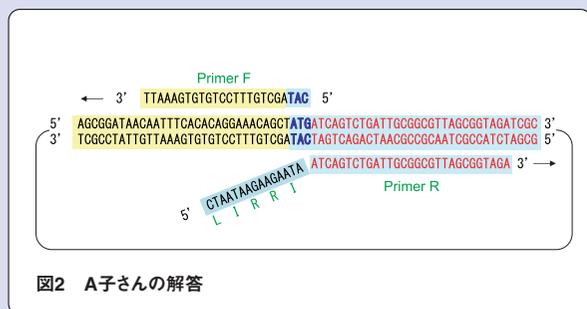


図2 A子さんの解答

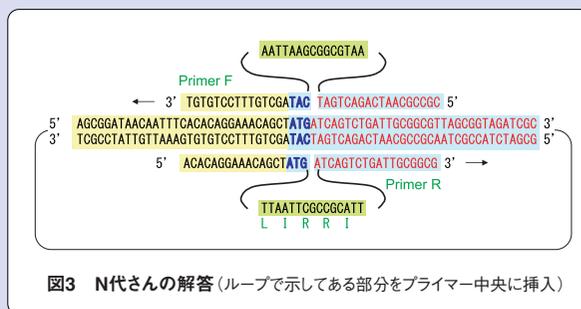


図3 N代さんの解答 (ループで示してある部分をプライマー中央に挿入)

注意!!

上の二人の解答には間違いが含まれている可能性があります。

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。

遺伝子組換え技術が発達し、変異を導入してタンパク質の機能を改変したり、タグを付加したりするような実験がとて簡単に行えるようになりました。今回は、そのような変異導入技術とそれに関連したトピックをご紹介します。

1-1 網羅的変異導入法と生物の進化

現在のような分子生物学的な手法が発展する以前から、様々な方法を用いて変異実験が行われてきました。例えば、細菌やショウジョウバエなどに紫外線やX線を照射することによって、様々な変異体が取得されてきたこともその一つです。これらの方法は、DNAが紫外線やX線によって損傷を受け、その修復段階で変異が導入されることを利用します。よって、遺伝子のどこに変異が導入されるかをあらかじめ知ることはできませんが、様々な領域にまんべんなく変異を導入できるという特徴があります。

また近年、PCRを用いて網羅的に変異導入する方法（エラーブローンPCR）が頻繁に行われるようになりました。この方法は、

PCR時のマグネシウムイオンをマンガンに変更したり、dNTP中の各ヌクレオチドのバランスを崩したりすることにより、DNAポリメラーゼの正確性を低下させて変異を導入します。

ところで、様々な生物で働いているDNAポリメラーゼは大きく分けて7種に分類されますが、Yファミリーに属するDNAポリメラーゼの正確性（忠実度）が低いことが最近分かってきました。この酵素は、多くの生物に存在することが知られており、実際に進化の原動力の一つになったのではないかと考えられているようです。

1-2 部位特異的変異導入 — 生体成分であるが故の宿命？ —

DNAポリメラーゼによる変異導入プライマーの伸長反応を利用して特定の塩基を置換するような技術も次々と開発されています。これらの技術は、タンパク質の機能を解明したり、タンパク質に新しい機能を付加するような実験に応用されています。実際に、活性中心と思われる部位に変異を導入してアミノ酸を変異させ酵素活性の変化を調べたり、酵素の耐熱性や反応性や基質特異性を改善したりする研究が行われています。

また、研究が進むにつれて、ほんの一点のアミノ酸の変異が、タンパク質全体の機能に多大なる影響を及ぼすような事例が次々と報告されるようになりました。その変異で、タンパク質の機能が失われることもあれば、タンパク質の機能が飛躍的に向上する場合もあるようです。現在、産業用や研究用として用いられている酵素の多くは、この手法を用いて改良されたものが少なくありません。

しかし、考えようによっては不思議な話です。生体中で働いて

いる酵素は、最大の力を発揮できないように進化してきた節があります。おそらく、酵素の過剰な活性は逆に生体に不利に働くため、生体にとってちょうど良い活性を発揮するように進化段階で調節されていたのでしょう。いわゆる、自動車やバイクなどと言うところのリミッターのイメージです。よって、機能改良のための変異導入は、このリミッターを外す作業といえるのかも知れません。



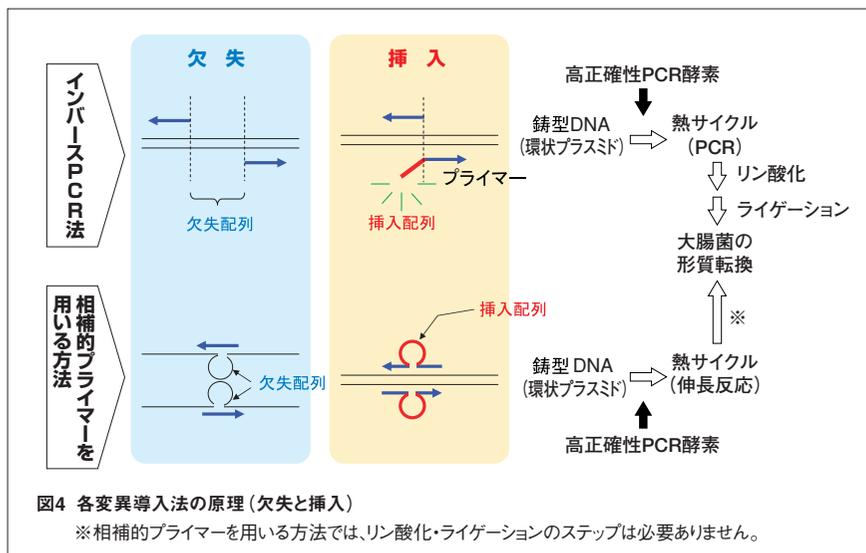
1-3 様々な変異導入法における利点と欠点

1-2のような置換に加え、特定の配列を削ったり、挿入したりするような変異導入も頻繁に行われています。しかし、このような変異導入は、方法によってかなり効率が異なるようです。

部位特異的変異導入法は、相補的なプライマーを用いる方法とそうでない方法に大きく分けることができますが（図4）、遺伝子配列の欠失や挿入には、相補的なプライマーを用いない「インバースPCR法」などの方法が効果的であるといえます。相補的なプライマーを用いる方法では、図4に示すように、プライマーがアニーリングする際にDNAがかなり不自然な構造をとる必要があり、効率が下がってしまうようです。近年、ヒスチジンタグなどを用いることが増えてきましたが、インバースPCR法はそのようなタグ配列の挿入にも力を発揮します。

また、相補的なプライマーを用いる変異導入法では、原理上、ミックス塩基（NNNなど）を導入することが困難です

が、インバースPCR法では問題なく行うことができます。よってこの方法は点突然変異ライブラリーなどの作製に適しているといえます。



A子さんとN代さんは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者です。先ほどからなにやら、Sリーダーの前で火花を散らしているようです。実は、つい先ほど2人に問題が出され、その解答がSリーダーに提出されたところなのです(ライフサイエンス実験シリーズの表紙参照)。



2-1 N代さんの落とし穴

まず、Sリーダーは、N代さんに向かって、「このプライマーペアでPCRができるの?」という疑問を投げかけました。N代さんはポカンとしています。

N代さんは学生時代にインバースPCR法とは異なる方法を用いて変異導入実験を行っていました(図4 相補的プライマーを用いる方法)。今回、N代さんはその方法の規則に従ってプライマーを設計してしまったのです。

増幅の機構を図に描いてみると分かるのですが、このような相補的なプライマーではいわゆる連鎖的増幅は起こりません(PCRできません!)。N代さんはとっさに、「はっ!」と気づいて、頭を抱えてしまいました。課題では、「インバースPCR法を用いて行う」となっていたので、N代さんの答えは課題の条件を満たしていないことになってしまいます。



続けて、Sリーダーは、確かにこの原理を用いても変異導入は可能なのですが、今回のように途中で長い挿入のあるようなプライマーではうまくいかないことが多いことをN代さんにアドバイスしました。Sリーダーは、以前行ったヒスチジンタグ配列挿入実験における比較結果を見せてくれました(表1)。確かに、18bpともなると、相補的プライマーを用いる方法では、問題があるよ

うです。

また、欠損変異体を作製する場合においても、インバースPCR法は有利なようです。表2は、同様にSリーダーが以前行った90bpの欠損変異体の作製効率を二つの方法で比較したものです。

表1 各方法におけるヒスチジンタグ(18bp)挿入効率の比較

	配列確認を試みたクローン数	目的の変異を有していたクローン数	目的とした変異体の割合
インバースPCR法*1	16	15	94%
相補的プライマーを用いる方法*2	16	0	0%

表2 各方法における欠損変異体(90bp)作製効率の比較

	配列確認を試みたクローン数	目的の変異を有していたクローン数	目的とした変異体の割合
インバースPCR法*1	16	14	88%
相補的プライマーを用いる方法*2	16	7	44%

*1 部位特異的変異導入キット「KOD-Plus- Mutagenesis Kit (Code No. SMK-101)」を用いました(図4上参照)。

*2 相補的プライマーを用いる方法(図4下)にて実施。

※*1、*2ともに、増幅反応の後に制限酵素Dpn Iを用いて鋳型プラスミドの分解を行っています(図7参照)。

※実験に用いたプラスミドの全長は7.3kbです。

2-2 A子さんの落とし穴

今回、A子さんは慎重でした。原理は完璧なはずですが。Sリーダーは、N代さんと呼んで、A子さんの解答を見せつつ解説を始めました。

まず、プライマーの設計は、変異の種類によって様々であり、以下のようなコツがあります。

- 変異導入部位は、プライマーの5'末端、あるいは5'末端付近に設計します(欠失の場合は変異部位の導入は必要ありません)。
- 3'末端側には、鋳型DNAと相補性のある領域が少なくとも20塩基以上(望ましくは25塩基以上)になるようにプライマーを設計します。
- プライマーが50塩基を超えるような場合は、精製度の高いプライマーを用います(プライマーが長くなるほど、5'末端の欠落した不完全なプライマーの混入が増える傾向にあります)。
- プライマーをあらかじめリン酸化しておくか、PCR産物をリン酸化する必要があります。

※KOD-Plus- Mutagenesis Kit (Code No. SMK-101)を用いる場合、あらかじめプライマーをリン酸化しておく必要はありません。PCR後にPCR産物をリン酸化するステップが設定されています。

右が、3種類の変異を導入する場合の典型的なプライマー設計例です。(図5)

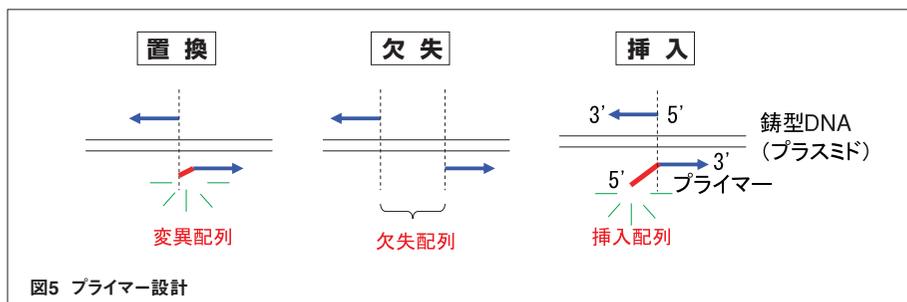
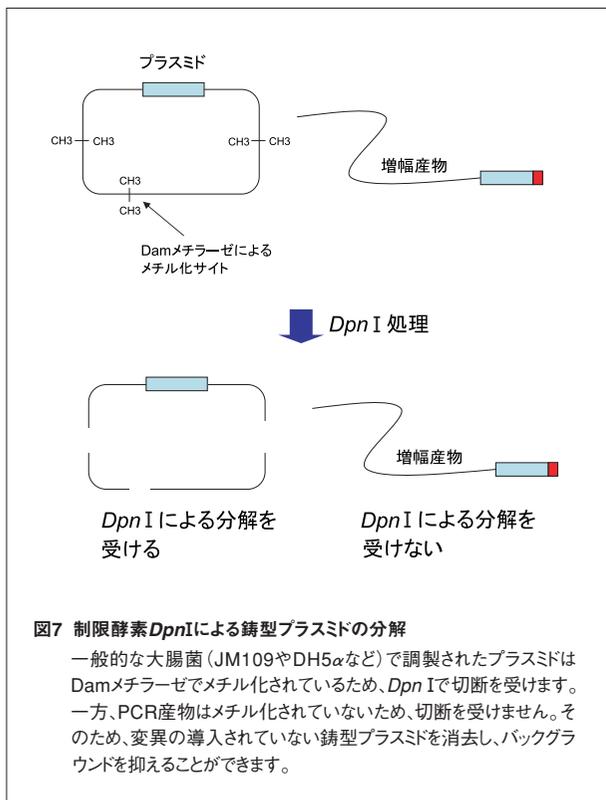
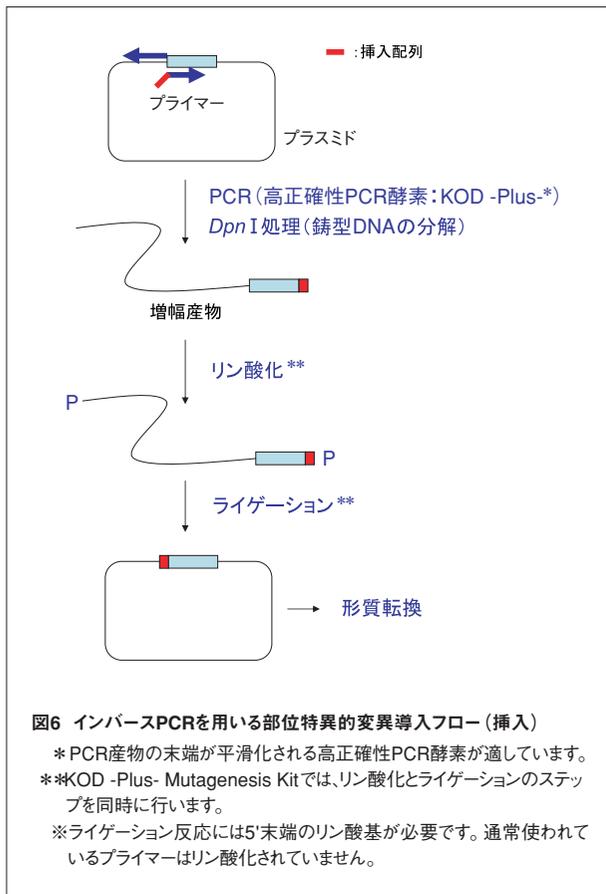


図5 プライマー設計

前述の、KOD -Plus- Mutagenesis Kit (Code No. SMK-101)は、インバースPCRで用いる高正確性PCR酵素『KOD -Plus-』をはじめ、変異導入に必要な試薬をすべて含んでいます。更に、*Dpn I* 処理工程などの実験の効率を高める工夫もなされているため、初めて変異導入実験をされるような場合にはとても便利です。以下に、このキットを用いるインバースPCR法による部位特異的変異導入フローをA子さんの解答を元に示します(図6、図7)。また、プロトコール#1に具体的な実験方法を示します。



【プロトコール#1】
インバースPCR法を用いる部位特異的変異導入 (KOD -Plus- Mutagenesis Kitを使用)

1. PCR

滅菌蒸留水	35 (μl)
10×Buffer for iPCR	5
2 mM dNTPs	5
プライマー1 (10 pmol/μl)	1.5
プライマー2 (10 pmol/μl)	1.5
Plasmid DNA (50ng/μl)	1
KOD -Plus- (1 U/μl)	1
Total Volume	50 μl

94°C 2 min
 98°C 10 sec ← Y (4~10) サイクル*2
 68°C X min*1
 4°C Hold

*1 増幅するサイズ (kb) を基に、1min./kbを目安に設定します。例えば、5kbのPlasmidの全周を増幅したい場合には、5min.に設定します。

*2 増幅するサイズ (kb) を基に、1サイクル/kbを目安に設定します。但し、最終的に得られるコロニー数は、用いるコンピテントセルの形質転換効率等によっても変動しますので、実験に余裕がある場合には、反応液を2分割し、二通りのサイクル数にて実施します (例えば、5サイクルと10サイクル)。

2. *Dpn I* 処理

PCRの終了した反応液 (全量50 μl)	
<i>Dpn I</i> (10U/μl)	2 μl
Total Volume	52 μl

↓
 37°C、1h反応

3. リン酸化、ライゲーション

<i>Dpn I</i> 処理済みPCR産物	2 μl
滅菌蒸留水	7
Ligation high	5
T4 Polynucleotide Kinase (5U/μl)	1
Total Volume	15 μl

↓
 16°C、1h反応 ⇒ 形質転換

インバースPCRにおける増幅は、KOD -Plus- (Code No. KOD-201) のような高正確性PCR酵素を用いる必要があります (前号参照)。これは、PCR産物の末端をライゲーションによって結合するため、平滑末端でなくてはならないからです。また、変異導入部位以外にPCRエラーによる変異が導入されないようにする目的もあります。よって、この用途には正確性が極めて高いKOD -Plus-が適していると言えます。さらにこの方法では、末端をライゲーションにより結合することから、PCR産物をリン酸化する必要があります。

Sリーダーは更に、以前、実際に実験に使用したことのある、プライマーペア (ヒスチジンタグ: 図8、アミノ酸点変異ライブラリー: 図9) を示して説明してくれました。皆さんも、これらのプライマーペアを用いて変異実験をシミュレーションしてみてください。このようにNNNというような配列を導入できるのは、インバースPCR法の利点でもあります。

ワンポイントメモ ①

Dpn I は4塩基認識の制限酵素で、Damメチラーゼでメチル化されたGATC配列を認識して、切断するという珍しい性質を有しています。

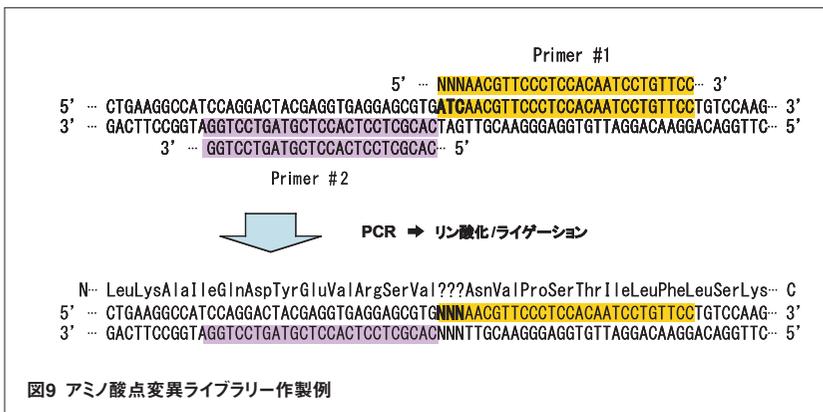
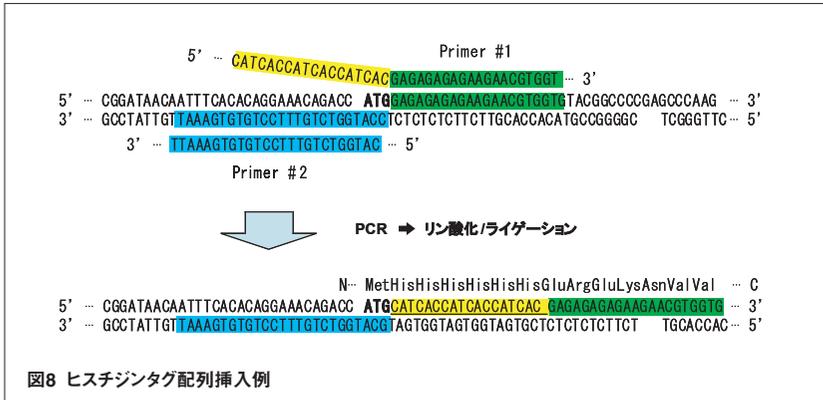


表3 大腸菌K12株におけるコドンの使用頻度

(Codon usage database [http://www.kazusa.or.jp/codon/]より転記しました)

Escherichia coli K12 [gbcbct]: 14 CDS's (5122 codons)

UUU (Phe) 19.7	UCU (Ser) 5.7	UAU (Tyr) 16.8	UGU (Cys) 5.9
UUC (Phe) 15.0	UCC (Ser) 5.5	UAC (Tyr) 14.6	UGC (Cys) 8.0
UUA (Leu) 15.2	UCA (Ser) 7.8	UAA (Stop) 1.8	UGA (Stop) 1.0
UUG (Leu) 11.9	UCG (Ser) 8.0	UAG (Stop) 0.0	UGG (Trp) 10.7
CUU (Leu) 11.9	CCU (Pro) 8.4	CAU (His) 15.8	CGU (Arg) 21.1
CUC (Leu) 10.5	CCC (Pro) 6.4	CAC (His) 13.1	CGC (Arg) 26.0
CUA (Leu) 5.3	CCA (Pro) 6.6	CAA (Gln) 12.1	CGA (Arg) 4.3
CUG (Leu) 46.9	CCG (Pro) 26.7	CAG (Gln) 27.7	CGG (Arg) 4.1
AUU (Ile) 30.5	ACU (Thr) 8.0	AAU (Asn) 21.9	AGU (Ser) 7.2
AUC (Ile) 18.2	ACC (Thr) 22.8	AAC (Asn) 24.4	AGC (Ser) 16.6
AUA (Ile) 3.7	ACA (Thr) 6.4	AAA (Lys) 33.2	AGA (Arg) 1.4
AUG (Met) 24.8	ACG (Thr) 11.5	AAG (Lys) 12.1	AGG (Arg) 1.6
GUU (Val) 16.8	GCU (Ala) 10.7	GAU (Asp) 37.9	GGU (Gly) 21.3
GUC (Val) 11.7	GCC (Ala) 31.6	GAC (Asp) 20.5	GGC (Gly) 33.4
GUA (Val) 11.5	GCA (Ala) 21.1	GAA (Glu) 43.7	GGA (Gly) 9.2
GUG (Val) 26.4	GCG (Ala) 38.5	GAG (Glu) 18.4	GGG (Gly) 8.6

と、ここまで来て、SリーダーがボンッとA子さんにつぶやきました。「ところでA子さん。コドンユーセージ(Codon usage)って知っている?」。Aさんは目をパチパチしています。「Codon usageとは、確か特定の生物におけるコドンの使用頻度...」。とそのとき、Aさんは同じタグ配列なのに、Aさんの選んだタグの塩基配列がN代さんの選んだものとはかなり異なることに気づきました。

インバースPCRの原理ばかり考えていたAさんは、そのことにまで気が回っていませんでした。確か、遺伝子は*大腸菌*で発現させなくてはならないはず。Aさんは、念のためインターネットで*大腸菌*K12株におけるコドンの使用頻度を調べてみました(表3)。そして、愕然としました。何と、Aさんの選んだコドンは、あろうことか*大腸菌*における低頻度(レア)コドンばかりでした。逆に、N代さんの選んだ配列は使用頻度のとても高いものばかりでした(図10)。

●Aさんの設計したタグ配列

CTAATAAGAAGAATA

L I R R I

5.3 3.7 1.4 1.4 3.7 [frequency per thousand]
(コドンの使用頻度)

●N代さんの設計したタグ配列

TTAATTTCGCCGCATT

L I R R I

15.2 30.5 26.0 26.0 30.5 [frequency per thousand]
(コドンの使用頻度)

図10 2人の選択したコドンと各コドンの大腸菌における使用頻度



Sリーダーからは以下のような解説がありました。

mRNAのコドンの使われ方は、翻訳速度に大きく影響します。現在までに、高頻度コドンに対応するtRNAは細胞内に高濃度で存在し、低頻度コドンに対応するtRNAは低濃度でしか存在しないことが確かめられています。発現させようとする遺伝子に低頻度コドンが多く含まれている場合、対応するtRNAが少ないので翻訳速度が低下し、発現量が少なくなることが調べられています。特に、N末端付近にレアコドンが連続するような場合、発現量に大きく影響する可能性が高いという報告もあるようです。よって、Aさんの配列では、このタンパク質全体の発現量が大きく低下する恐れがあります。



ワンポイントメモ ②

mRNAのコドンの使われ方は、生物種によってかなり異なるようです。よって、他の生物種の発現系を用いて発現実験を行う場合には、注意が必要です。以下の表はコドンの使用頻度を千分率で表したものです。下表には、便宜上6以下の低頻度コドン(stopコドンを除く)を黄色で示しています。これとみると、大腸菌のK12株とB株では低頻度コドンの分布はほぼ等しいのですが、ヒトやシロイヌナズナなどは低頻度コドンが重なっていないところもあるようです。例えば、真核生物の遺伝子を大腸菌で発現させるような場合、注意が必要です。

実際、低頻度コドンは生物における発現制御にも用いられているようです。例えば、大腸菌におけるrpoDシストロン産物がdnaGシストロン産物より多く合成されるのはこのメカニズムによっていると考えられています。

表4 各生物におけるコドンの使用頻度の比較

(Codon usage database [http://www.kazusa.or.jp/codon/]より転記しました)

大腸菌K12株

Escherichia coli K12 [gbpct]: 14 CDS's (5122 codons)
fields: [triplet] [frequency: per thousand]

UUU (Phe) 19.7	UCU (Ser) 5.7	UAU (Tyr) 16.8	UGU (Cys) 5.9
UUC (Phe) 15.0	UCC (Ser) 5.5	UAC (Tyr) 14.6	UGC (Cys) 8.0
UUA (Leu) 15.2	UCA (Ser) 7.8	UAA (Stop) 1.8	UGA (Stop) 1.0
UUG (Leu) 11.9	UCG (Ser) 8.0	UAG (Stop) 0.0	UGG (Trp) 10.7
CUU (Leu) 11.9	CCU (Pro) 8.4	CAU (His) 15.8	CGU (Arg) 21.1
CUC (Leu) 10.5	CCC (Pro) 6.4	CAC (His) 13.1	CGC (Arg) 26.0
CUA (Leu) 5.3	CCA (Pro) 6.6	CAA (Gln) 12.1	CGA (Arg) 4.3
CUG (Leu) 46.9	CCG (Pro) 26.7	CAG (Gln) 27.7	CGG (Arg) 4.1
AUU (Ile) 30.5	ACU (Thr) 8.0	AAU (Asn) 21.9	AGU (Ser) 7.2
AUC (Ile) 18.2	ACC (Thr) 22.8	AAC (Asn) 24.4	AGC (Ser) 16.6
AUA (Ile) 3.7	ACA (Thr) 6.4	AAA (Lys) 33.2	AGA (Arg) 1.4
AUG (Met) 24.8	ACG (Thr) 11.5	AAG (Lys) 12.1	AGG (Arg) 1.6
GUU (Val) 16.8	GCU (Ala) 10.7	GAU (Asp) 37.9	GGU (Gly) 21.3
GUC (Val) 11.7	GCC (Ala) 31.6	GAC (Asp) 20.5	GGC (Gly) 33.4
GUA (Val) 11.5	GCA (Ala) 21.1	GAA (Glu) 43.7	GGA (Gly) 9.2
GUG (Val) 26.4	GCG (Ala) 38.5	GAG (Glu) 18.4	GGG (Gly) 8.6

大腸菌B株

Escherichia coli B [gbpct]: 11 CDS's (3771 codons)
fields: [triplet] [frequency: per thousand]

UUU 28.9	UCU 8.5	UAU 18.6	UGU 4.2
UUC 18.8	UCC 8.0	UAC 8.5	UGC 5.8
UUA 17.5	UCA 6.1	UAA 1.9	UGA 0.8
UUG 18.6	UCG 11.4	UAG 0.3	UGG 12.7
CUU 12.7	CCU 5.8	CAU 9.3	CGU 16.4
CUC 14.1	CCC 2.4	CAC 7.2	CGC 18.8
CUA 3.4	CCA 7.4	CAA 13.5	CGA 2.4
CUG 54.9	CCG 24.9	CAG 24.7	CGG 5.0
AUU 33.9	ACU 7.7	AAU 21.2	AGU 9.0
AUC 31.0	ACC 25.2	AAC 15.9	AGC 14.3
AUA 5.0	ACA 6.1	AAA 29.2	AGA 2.4
AUG 37.4	ACG 14.6	AAG 8.8	AGG 2.1
GUU 19.6	GCU 13.8	GAU 30.0	GGU 24.4
GUC 14.3	GCC 25.5	GAC 15.1	GGC 33.1
GUA 10.6	GCA 19.6	GAA 29.4	GGA 8.2
GUG 33.9	GCG 32.6	GAG 18.0	GGG 14.3

ヒト

Homo sapiens [gbpct]: 93487 CDS's (40662582 codons)
fields: [triplet] [frequency: per thousand]

UUU 17.6	UCU 15.2	UAU 12.2	UGU 10.6
UUC 20.3	UCC 17.7	UAC 15.3	UGC 12.6
UUA 7.7	UCA 12.2	UAA 1.0	UGA 1.6
UUG 12.9	UCG 4.4	UAG 0.8	UGG 13.2
CUU 13.2	CCU 17.5	CAU 10.9	CGU 4.5
CUC 19.6	CCC 19.8	CAC 15.1	CGC 10.4
CUA 7.2	CCA 16.9	CAA 12.3	CGA 6.2
CUG 39.6	CCG 6.9	CAG 34.2	CGG 11.4
AUU 16.0	ACU 13.1	AAU 17.0	AGU 12.1
AUC 20.8	ACC 18.9	AAC 19.1	AGC 19.5
AUA 7.5	ACA 15.1	AAA 24.4	AGA 12.2
AUG 22.0	ACG 6.1	AAG 31.9	AGG 12.0
GUU 11.0	GCU 18.4	GAU 21.8	GGU 10.8
GUC 14.5	GCC 27.7	GAC 25.1	GGC 22.2
GUA 7.1	GCA 15.8	GAA 29.0	GGA 16.5
GUG 28.1	GCG 7.4	GAG 39.6	GGG 16.5

シロイヌナズナ

Arabidopsis thaliana [gbpct]: 80395 CDS's (31098475 codons)
fields: [triplet] [frequency: per thousand]

UUU 21.8	UCU 25.2	UAU 14.6	UGU 10.5
UUC 20.7	UCC 11.2	UAC 13.7	UGC 7.2
UUA 12.7	UCA 18.3	UAA 0.9	UGA 1.2
UUG 20.9	UCG 9.3	UAG 0.5	UGG 12.5
CUU 24.1	CCU 18.7	CAU 13.8	CGU 9.0
CUC 16.1	CCC 5.3	CAC 8.7	CGC 3.8
CUA 9.9	CCA 16.1	CAA 19.4	CGA 6.3
CUG 9.8	CCG 8.6	CAG 15.2	CGG 4.9
AUU 21.5	ACU 17.5	AAU 22.3	AGU 14.0
AUC 18.5	ACC 10.3	AAC 20.9	AGC 11.3
AUA 12.6	ACA 15.7	AAA 30.8	AGA 19.0
AUG 24.5	ACG 7.7	AAG 32.7	AGG 11.0
GUU 27.2	GCU 28.3	GAU 36.6	GGU 22.2
GUC 12.8	GCC 10.3	GAC 17.2	GGC 9.2
GUA 9.9	GCA 17.5	GAA 34.3	GGA 24.2
GUG 17.4	GCG 9.0	GAG 32.2	GGG 10.2

今回のバトル、痛みわけという感じでしょうか。それにしても、今回のバトルもお互い大変良い勉強になったようです。

(それからしばらくして…)

A子さんの1年間を通した活動も終わりを迎えました。高成功率PCR酵素『KOD FX』を用いたクルードサンプルや難ターゲットの増幅に関するノウハウもかなり集まりましたし、高正確性PCR酵素『KOD -Plus-』を用いた様々な遺伝子加工技術もSリーダーからの(意地悪な?)質問を通して驚くほど身につきました。何より、実験前にすべての可能性を疑ってみる癖が2人には身についたようです。

新しい年度を向かえ、A子さんとN代さんはますます張り切っているようです。いつの間にか、ここ北陸の長い冬も終わり、暖かな春がやってきたようです。

さて、このシリーズ、そろそろ予定していた紙面を埋め尽くしてしまったようです。この続きは、また機会のあるときにお届けいたします。今後の、皆様方のご活躍を期待しております。



高成功率PCR酵素『KOD FX (Code No.KFX-101)』は、クルードサンプルを用いるPCRにおいて高い効率を示します。前回は、マウステールライセートをサンプルとして用いるPCR法ご紹介しました。そこで今回は、植物ライセートをサンプルとしたPCRについて検討を行いました。この方法を用いることによって、煩雑なDNA精製操作なしで、高効率に植物体からのPCRが可能になると考えられます。

●植物組織の前処理方法

ワンステップ法

① 葉 (3mm角) 精米 (1粒)

② マイクロチューブへ

③ Buffer A 100µl添加
Vortexにて良く攪拌
Buffer A: 100mM Tris-HCl (pH9.5) 1M KCl 10mM EDTA

④ 95°C・10 min.
Vortexにて良く攪拌

⑤ 上清1µlをPCR反応液に添加 (植物組織は完全には溶解しません)
左:葉 右:精米

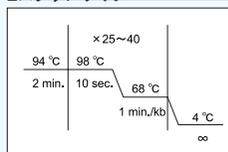
【参考文献】BioTechniques, 19: 394 (1995)

図11 ワンステップ法フロー

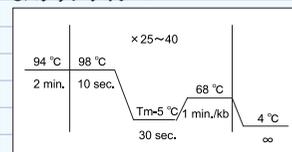
【プロトコール#2】KOD FXの基本反応条件

試薬	添加量(µl)	終濃度
2×PCR buffer for KOD FX	25	1×
2mM dNTPs	10	0.4 mM each
10pmol/µl Primer #1	1.5	0.3 µM
10pmol/µl Primer #2	1.5	0.3 µM
Template DNA	X	{ Genomic DNA : ~200 ng/50µl Plasmid DNA : ~50 ng/50µl cDNA : ~200 ng (RNA相当量)/50µl ワンステップ法からのサンプル : ~1µl
PCR grade water	Y	
KOD FX (1.0 U/µl)	1	1.0 U / 50 µl
Total	50 (µl)	

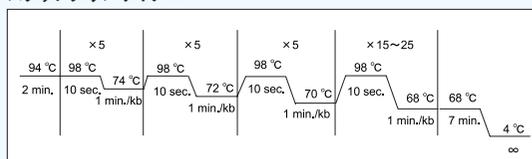
2ステップサイクル



3ステップサイクル



ステップダウンサイクル



※プライマーのTm値が73°C未満の場合は、3ステップサイクルをお勧めします。

【ターゲット】

ribose-1.5-bisphosphate carboxylase / oxygenase large subunit (rbcL)の1.3kb

【プライマー】

- Primer F1 : 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' (トマト&タバコ用)
- Primer R1 : 5'-AAGCAGCAGCTAGTTCGGGCTCCA-3' (トマト&タバコ用)
- Primer F2 : 5'-ATGTCACCACAAACAGAAACTAAAGC-3' (イネ用)
- Primer R2 : 5'-AAGCTGCGGCTAGTTCAGGACTCCA-3' (イネ用)

上記プライマーを用い、2ステップサイクル (伸長時間1.5 min、30サイクル、サンプル1µl使用)にてPCRを実施しました。

●結果

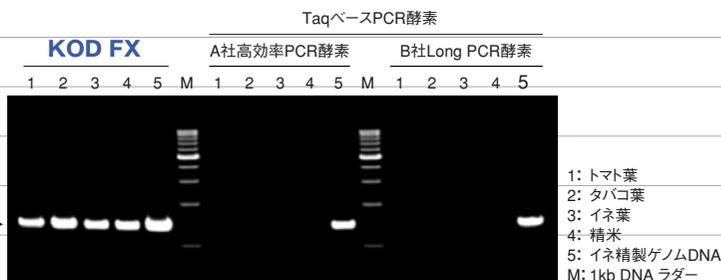
従来、植物サンプルからのPCRでは、DNAサンプルの調製に大変な時間を要していましたが、本方法を用いることで、トマト、タバコ、イネの葉、及び精米のライセートをサンプルとして、短時間で解析することができました。一方、今回用いた他のPCR酵素では増幅は認められませんでした。よって、ワンステップ法とKOD FXを組み合わせることが重要であると考えられました。

KOD FXは、夾雑物による阻害に大変強いという特性を有しており、今回の例以外にも、マウステールライセートや酵母などのサンプルにおいても良好な増幅結果が得られています。

実施例を弊社ウェブサイトでご確認いただけます。

www.toyobo.co.jp/bio

1.3 kb ▶



- 1: トマト葉
- 2: タバコ葉
- 3: イネ葉
- 4: 精米
- 5: イネ精製ゲノムDNA
- M: 1kb DNA ラダー

図12 植物ライセートを用いたPCRの結果

A子さん

KOD FXを用いて、植物ライセートからPCRを行う際に何かコツなどありますか？

今回ご紹介したワンステップ法(前ページ参照)を用いて行う場合、植物ライセートを持ち込み過ぎないようにすることが大切です。50 μ lの反応系に対して、最大1 μ lまでとしてください。また、本方法でサンプル調製を行う場合、サンプルとした植物体がすべて溶解してしまうことはありません。上清を用いてください。

Sリ-ダー

A子さん

インバースPCR法を用いて変異導入する際のプライマーについて、何かアドバイスはありますか？

最終的に、増幅産物の末端を結合させるような形となりますので、それをイメージしながらプライマーを設計することをお勧めします。基本的に2つのプライマーにオーバーラップ部分は生じることはありませんので、注意してください。また、長い配列を挿入するような場合は、プライマーの両方に均等に挿入部分を配置するような配慮も必要です。とにかく、インバースPCRといえどもPCRなので、日常の経験を踏まえて、PCRがうまく行くようにプライマーを設計することが重要です。

また、本文中にも出ていますが、プライマーの特異的な部分(鑄型DNAと相補性のある領域)が少なくとも20塩基、好ましくは25塩基必要です。よって、多くの場合Tm値は73 $^{\circ}$ Cを超えることから、2ステップサイクルを用いてPCRを行うと便利です。しかし、プライマーのTm値が73 $^{\circ}$ Cより低くなるような場合は、アニーリング温度をTm値より5~10 $^{\circ}$ C程度低く設定した3ステップサイクルをお勧めします。

Sリ-ダー

A子さん

Taq DNAポリメラーゼを使ってインバースPCR法による変異導入実験を行いたいのですが、どうしたら良いですか？

Taq DNAポリメラーゼには、ターミナルトランスフェラーゼ活性があり、そのPCR産物を用いると3'末端のdAがライゲーションの邪魔をするため、効率が極端に下がってしまいます。よって、校正活性(Proof reading活性)を有するKOD -Plus-(Code No.KOD-201)やKOD FX(Code No.KFX-101)などで増幅した平滑末端を有するPCR産物を用いる必要があります。本文中でもご紹介しましたが、KOD -Plus- Mutagenesis Kit(Code No.SMK-101)を用いると大変便利です。お薦めします。

Sリ-ダー



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
KOD -Plus- Mutagenesis Kit	部位特異的変異導入	20回用	SMK-101	¥38,000
ReverTra Ace - α - [®]	高効率逆転写	100回用	FSK-101	¥53,000
Ligation high Ver.2	高効率Ligation	750 μ l×1本	LGK-201	¥22,000
MagExtractor [™] -PCR & Gel Clean up-	DNA断片の精製	200回用	NPK-601	¥28,000
MagExtractor [™] -mRNA-	Poly (A) ⁺ RNAの精製	5回用	NPK-801F	¥43,000
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	50 μ moles/0.5ml	ATP-111	¥15,000
<i>E. coli</i> Alkaline Phosphatase	脱リン酸化	100U×1本	BAP-111	¥15,000
MagExtractor [™] -Plasmid-	プラスミドの精製	500回用	NPK-301	¥33,000
<i>Magical Trapper</i>	磁性分離(磁性スタンド)	1個	MGS-101	¥38,000
TArget Clone [™]	TA Cloning vector	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 DH5 α	高効率形質転換	0.1ml×10本	DNA-903	¥17,000
Competent Quick DH5 α	サブクローニング用	0.1ml×20本	DNA-913	¥29,000