

2 Blend Taq[®]およびKOD Dash[®]を用いるコロニーダイレクトPCR

はじめに

Blend Taq[®]およびKOD Dash[®]は混合型PCR用酵素であり、優れたパフォーマンスが必要なPCRに幅広く応用することができます。今回、一般的な研究室において最も頻繁に行われていると予想される、大腸菌コロニーを直接鋳型とするインサートチェックPCRへ本酵素を応用した例をご紹介します。それぞれの酵素には、以下のような特性があり、それぞれの用途に応じて使い分けることで、最適な結果を得ることが可能です。

	Blend Taq [®]	KOD Dash [®]
説明	高度に精製されたTaq DNAポリメラーゼに3'→5' Exonuclease活性を有するDNAポリメラーゼを最適な混合比でブレンドすることにより、優れたパフォーマンスを実現した高効率DNAポリメラーゼ。	3'→5' Exonuclease活性を欠損させたKOD DNAポリメラーゼをベースとして、KOD DNAポリメラーゼを混合した高効率DNAポリメラーゼ。合成速度に優れ、かつ安定なKOD DNAポリメラーゼの利点を継承している。
特長	① 確実 ② Taq DNAポリメラーゼ感覚で条件を設定可能 ③ 安価 (¥19,000 / 250U) ④ 場合によっては、ホットスタート可能なBlend Taq [®] -Plus- を使用することも可能。	① 確実 ② 短時間増幅 (伸長時間30sec. / 1kb) ③ PCR溶液とした後、そのまま凍結保存し、何度も凍結融解しながら使用することが可能。

方法

コロニーダイレクトPCRの推奨反応条件を図1に、操作フローを図2に示しました。

今回は、弊社TAクローニングキット:TA Target Clone[™]を用いて、pTA2 Vectorに4.5kbのPCRプロダクトをクローニングした後、コロニーダイレクトPCRを行って、インサートの有無を確認しました。比較のため、同一コロニー (宿主はJM109使用) についてBlend Taq[®]およびKOD Dash[®]を用いて増幅を実施し、5 μlを1%アガロースゲルにて解析しています。プライマーおよびPCRサイクルは図1および下記に示した条件を用いました。

〈Primer配列〉

F primer : TCGAGGTCGACGGTATCGAT (20mer GC=55%)

R primer : CGCTCTAGAACTAGTGGATC (20mer GC=50%)

※プライマーはベクター上に設計

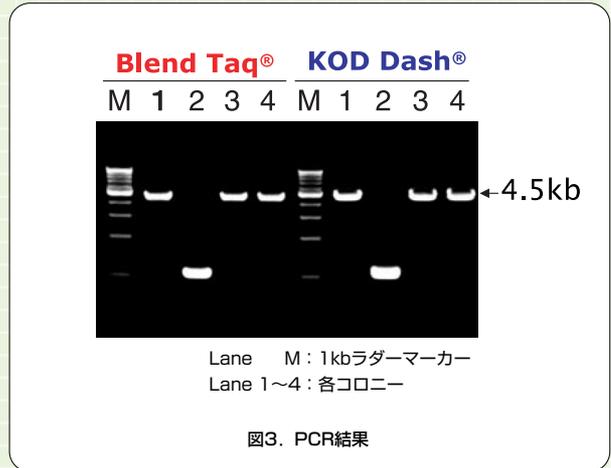
〈アニーリング温度および伸長時間〉

Blend Taq[®] アニーリング : 55°C、伸長時間 : 4.5min.

KOD Dash[®] アニーリング : 60°C、伸長時間 : 2.5min.

Blend Taq [®]			
	(1サンプル分)	() サンプル分	
D.W.	21.9 (μl)	() <input type="checkbox"/>	
10× Buffer for Blend Taq [®]	3	() <input type="checkbox"/>	
2mM dNTPs	3	() <input type="checkbox"/>	
Forward primer (10pmole/μl)	0.9	() <input type="checkbox"/>	
Reverse primer (10pmole/μl)	0.9	() <input type="checkbox"/>	
Blend Taq [®]	0.3	() <input type="checkbox"/>	
Total	30 (μl)	30 μl ずつ分注	
KOD Dash [®]			
	(1サンプル分)	() サンプル分	
D.W.	23 (μl)	() <input type="checkbox"/>	
10× KOD Dash [®] buffer	3	() <input type="checkbox"/>	
2mM dNTPs	3	() <input type="checkbox"/>	
Forward primer (10pmole/μl)	0.35	() <input type="checkbox"/>	
Reverse primer (10pmole/μl)	0.35	() <input type="checkbox"/>	
KOD Dash [®]	0.3	() <input type="checkbox"/>	
Total	30 (μl)	30 μl ずつ分注	

図1. それぞれの酵素におけるコロニーダイレクトPCRの反応条件



結果及び考察

4つのコロニーにおいて、いずれも良好な結果を得ることができました。3コロニーにインサートが挿入されていたことが確認できます。プライマーダイマーの生成はほとんど確認できませんでした。またデータは示しませんが、精製後のシーケンス解析結果も良好でした。

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD Dash®	250U×1本	-20℃	LDP-101	¥25,000
TArget Clone™	10回用	-20℃	TAK-101	¥12,000
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-	200回用	室温	NPK-601	¥25,000
Magical Trapper 【磁性スタンド】	1個	室温	MGS-101	¥38,000

Asterand

Asterand社ヒト病理組織

世界各地の提携先より提供された様々な病理組織を、厳密な品質管理の下、詳細な臨床データを添えてお届けいたします。

充実のラインナップ

世界各国40ヶ所以上の提供先から提供された病理組織を臨床データを添えて約10万サンプル（2004年末現在）保有しております。お客様のご要望にマッチしたサンプルを検索し、ご提供いたします。事前に各検体のHE画像、RNAの品質、既往歴、投薬歴などの臨床データをご覧いただけます。

豊富な保存形態・関連試料

凍結切片、パラフィン包埋切片（FFPE）の他、血清、血漿、RNA、DNAもお届け可能です。

※詳細につきましては右記ホームページにてご覧いただくことができます。 <http://www.asterand.com>

倫理面での厳格な対応

これらの検体は、研究、臨床開発用途での使用を目的とした試料、関連情報の提供、保有に適合されるすべての法律、規則、ガイドラインに従って入手、提供されています。

- 1) すべてのサンプルでインフォームドコンセントが得られています。
- 2) すべてのサンプルで2度にわたる匿名化が行われています。
- 3) サンプルの分譲にあたっては、弊社とのMTA (Material Transfer Agreement) の締結及び、御使用される施設の生命倫理委員会での承認が必要になります。