

## KOD -Plus- Mutagenesis Kitを用いる 部位特異的変異導入

知っているようで、少し自信がない。本コーナーでは、そのようなプロトコルを詳しく解説いたします。

### はじめに

部位特異的変異導入法 (Site-Directed Mutagenesis) は、タンパク質の機能変更のみならず、タンパク質へのタグやストップコドンの挿入、プロモーターやシスエレメントの解析など、様々な解析に必須の手法となっています。その方法としては、古典的なKunkel法をはじめ、近年では、PCR法を応用した様々な方法が開発されています。プロトコルコーナー第2回目の今回は、Inverse PCR (iPCR) 法に基づく部位特異的変異導入法について、部位特異的変異導入キット「KOD -Plus- Mutagenesis Kit (Code No.:SMK-101)」を中心に、プロトコルおよびコツをご紹介します。

今回、ご紹介するステップを図1に示しました。まず、①Plasmid DNAを鋳型に、変異を導入したプライマーを用いてInverse PCRを行います。欠失変異体を取得したい場合には、その欠失させたい領域の外側にプライマーを設計します。次に、②PCR産物に制限酵素DpnIを加え、鋳型Plasmidを消化します (DpnIは、メチル化サイトを認識し、一般的な大腸菌株から調製したプラスミドはメチル化されており、DpnIにより切断を受けます)。

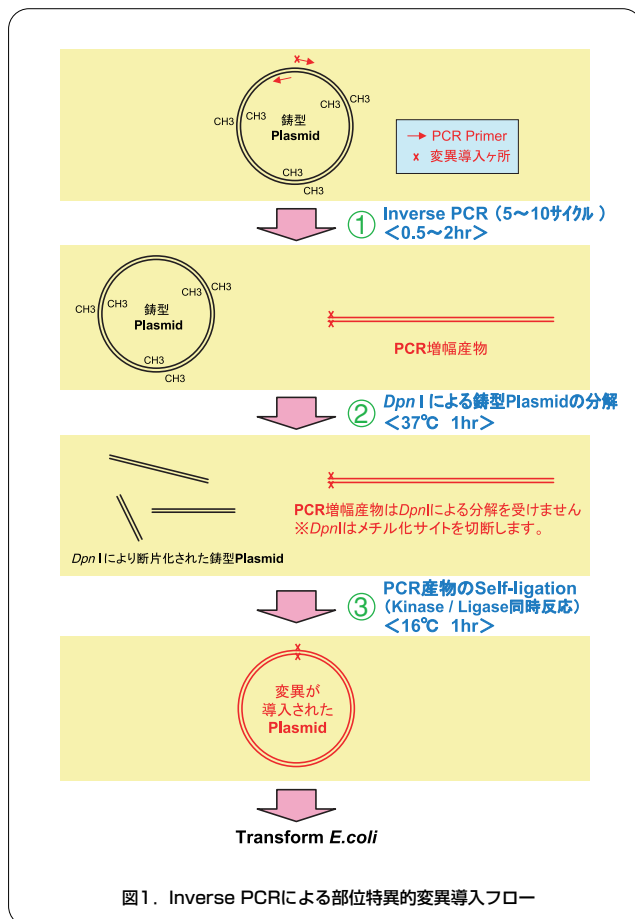


図1. Inverse PCRによる部位特異的変異導入フロー

最後に、③直鎖状プラスミドであるPCR産物をSelf-ligationすることにより環状化し、大腸菌の形質転換に供します。

本稿で紹介する方法では、①→②→③の各ステップ間でDNAの精製は行いません。とすると、②のステップで断片化された鋳型Plasmidが、③のSelf-ligation反応時にPlasmidに挿入されてしまうのではないかと心配される方もおられるかと思いますが、弊社の検討では、断片が挿入された経験はありません。これは、2 piece ligationよりもSelf-ligationの方が圧倒的に反応効率が良いことによるものと考えられます。

それでは、実際のプロトコルの詳細をご紹介します。

### 方法

#### 1. プライマー設計

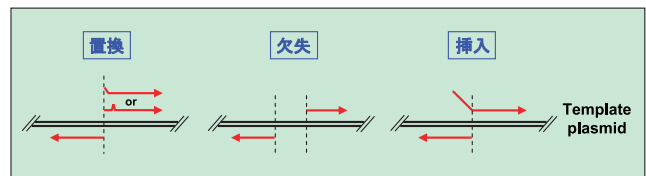


図2. プライマー設計方法

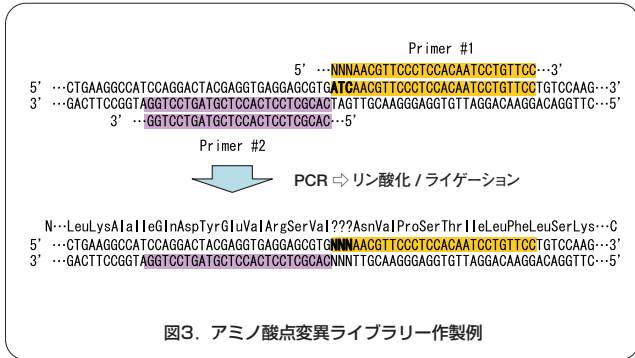
分子生物学実験では、様々な変異導入実験を行いますが、大きく(1)置換、(2)欠失、(3)挿入に分けることができます。(1)(3)の変異導入に共通したプライマー設計に関する注意点・コツは以下のとおりです。(2)については、変異を導入したプライマーを設計する必要はありません。

- ・ 変異導入部位は、プライマーの5' 端、あるいは5' 端付近に設計します。
- ・ 3' 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25bp程度) になるようにします。
- ・ 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' 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)

以下に、それぞれの場合に分けて説明いたします。

#### (1) 置換

1~6塩基程度の置換が最もよく行われます。また、InversePCR法を採用している本キットでは、ミックス塩基を導入することで、アミノ酸点変異ライブラリーの作製なども可能です。図3は、アミノ酸点変異ライブラリーを作製したプライマーの例を示しています。



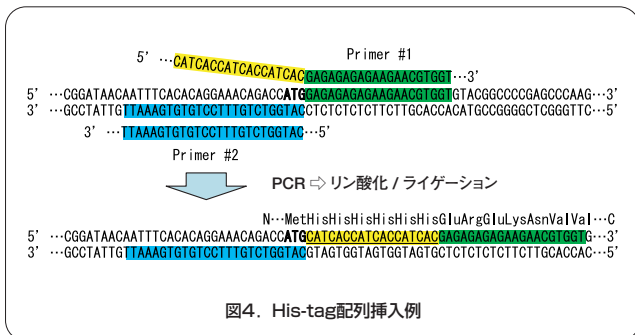
NNNは完全に5' 末端に設定する必要はなく、5' 端付近に設定すれば問題ありません。また、5' 末端付近に設定した方が、ライゲーションされる末端の配列が統一されるため、クローン間でのライゲーション効率を統一することができます。

(2) 欠失

欠失の導入はInverse PCRの利点を最大に生かせる変異導入の一つです。プライマー設計は、欠失させたい領域を増幅しないようにプライマーを設計するだけです(図2)。プライマー中に変異を導入する必要はありません。よって、広い領域に渡る欠失変異体を作製することが可能です。

(3) 挿入

挿入は、短いタグ配列などを導入する場合には行います。挿入も、Inverse PCR法を採用している本キットでは容易に行うことができます。以下に、His-tag配列の挿入に用いたプライマーの例をお示しします。



ここでは、片方のプライマーのみにタグ配列を設計しましたが、挿入配列が長い場合などPCR効率の低下が予想される場合は、挿入配列を2分割して両方のプライマーに設計することも可能です。

2. Inverse PCR

ここでのポイントは、KOD -Plus-のようなProofreading (校正) 活性を有する高正確性のPCR酵素を用いることです。この理由は、

- ・ 目的の変異箇所以外に変異が入るのを防ぐ。
- ・ PCR産物の端がBlunt End (平滑末端) となるため Self-ligationが可能となる。

の2点です。Taq polymeraseでは、3' 端に主にAがついた突出末端となるため、図1の③のステップでSelf-ligationされません。よって、本キットには、高正確性PCR酵素「KOD -Plus-」が採用されています。

なお、本プロトコルでは、③のSelf-ligation反応時に、KinaseIによるリン酸化を同時に行いますので、プライマーを予めリン酸化しておくことは不要です。以下に実験操作を示します。

(1) 各PCRプライマーの濃度を10pmoles/μlに、鋳型 Plasmid DNAの濃度を50ng/μlに調整します。

(2) PCR用チューブに以下のように反応液を調製します。

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

(3) 以下の反応サイクルにてPCRを実施します。

94°C	2min	
98°C	10sec	← Y (4~10) サイクル*2
68°C	Xmin*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)。

予備実験を行う場合は、PCRを10~20サイクルにて実施し、アガロースゲル電気泳動にてエキストラバンドが発生しないPCR条件の検討を行います。条件を見出せたら、PCR反応組成はそのまま、サイクル数を下げて増幅を行います。

3. Dpn Iによる鋳型Plasmidの消化

次に、メチル化されているDNAを特異的に分解する制限酵素 Dpn Iを作用させて鋳型Plasmid DNAを消化します。Dpn Iの反応には一般的に、本来TA bufferが用いられますが、添付されているKOD -Plus-の反応Buffer中でも十分に本来の活性を発揮します。一般的に用いられるJM109やDH5αなどの大腸菌で調製したPlasmid鋳型はメチル化を受けているので、Dpn Iの分解を受け消去できます。以下に実験操作を示します。

(1) 以下のように、PCR反応の終了したチューブに、Dpn Iを加え、反応させます。

PCRの終了した反応液	(全量50 $\mu$ l)
<i>Dpn</i> I (10U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Total Volume	52 $\mu$ l
↓	
37°C、1h反応	

(2) (オプション) *Dpn* I処理後の反応液5 $\mu$ lをアガロースゲル電気泳動に供し、PCR増幅産物の確認を行います。但し、サイクル数が少ない(5サイクル程度以下)の場合には、バンドが確認できない場合があります。その場合であっても、ほとんどの場合、変異体は得られます。そのまま、次のステップに進んでください。

#### 4. PCR産物のSelf-ligation

最後に、T4 Polynucleotide KinaseとLigaseを同時に作用させてPCR産物を自己環状化させます。キットに添付されてい

るLigation試薬:Ligation highには、Ligaseの他にrATP等も含まれており、Kinaseは十分に働くことができます。手順は以下のとおりです。

(1) 新しいPCR用チューブに以下の順番で反応液を調製し、反応させます。

<i>Dpn</i> I処理済みPCR産物	2 ( $\mu$ l)
滅菌蒸留水	7
Ligation high	5
T4 Polynucleotide Kinase (5U/ $\mu$ l)	1
Total Volume	15 $\mu$ l
↓	
16°C、1h反応	

(2) 反応液の一部(～10 $\mu$ l)を大腸菌の形質転換に供します。

### おわりに

ここでご紹介したInverse PCR法に基づく部位特異的変異導入法には、以下の特長があります。

- ①数bpの置換、挿入、欠失のみでなく、数10bpの挿入(Tagの導入)や数100bpの欠失等、幅広い変異導入に対応できる。
- ②特定部位のアミノ酸を20種類のアミノ酸に置換するなどのアミノ配点変異ライブラリーの作製(Saturation Mutagenesis)も可能。

また、本キットには、コントロールプラスミドとプライマーが添付されており、初めての方でも確実に変異導入実験を行うことができるようになっています。是非一度お試しください。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格	キャンペーン価格
<b>KOD -Plus- Mutagenesis Kit</b> ・KOD -Plus- ・10×Buffer for iPCR ・2mM dNTPs ・ <i>Dpn</i> I ・T4 Polynucleotide Kinase ・Ligation high ・Control Plasmid ・Control Primer #1 ・Control Primer #2	20回用	-20°C	SMK-101	¥38,000	¥26,600

キャンペーン期間中 30%OFFにてご提供いたします。 キャンペーン期間：2007年8月6日～2007年9月28日 [ご注文分]

## Web de 温故知新

過去に紹介した記事で、今号に関連のある記事をピックアップしてご紹介するコーナーです。

### 『KOD FX』 (本誌p.5・6掲載)

本誌で紹介いたしましたKOD FXは、高い成功率、抜群の増幅効率、優れた伸長性、および正確性を兼ね備えた新しいPCR試薬です。

弊社では、今までKODシリーズとして、KOD -Plus-、KOD -Plus- Ver.2、KOD Dash\*などを販売して参りました。すべてKODという名前を冠しますが、それぞれ特性が異なっており、実験の種類によって使い分ける必要があります。このあたりの使い分けにつきましては、弊社ウェブサイト ([www.toyobo.co.jp/bio](http://www.toyobo.co.jp/bio)) 「PCRコーナー」に詳しくまとめているので、是非一度ご覧ください。このページからは各ポリメラーゼや試薬、キットなどへのリンクが張っております。また、それぞれの詳細ページは様々な実施例にもリンクしていますので便利です。

さて、このKOD FXですが、弊社のPCR酵素の中でも抜群に成功率が高い

ことが確かめられています。よって、研究室のフリーザーに常備しておくことと便利なPCR試薬なのかも知れません。KOD FXの正確性はTaq DNA polymeraseの約11倍であり、ベストとは言わないまでも、クローニング実験などにも用いることができます。

ちなみに、クローニングに本当に向いているPCR試薬は、KOD -Plus-とKOD -Plus- Ver.2です。両方ともにTaq DNA polymeraseの約80倍の正確性を示します(KOD -Plus- Ver.2の方がPCR成功率に優れています)。

また、KOD FX、KOD -Plus-、およびKOD -Plus- Ver.2で増幅されたDNA断片の末端は平滑化されているため、通常の方法ではTAクローニングすることができません。よって、弊社ではそのような場合に、PCR産物を直接用いてTAクローニングできる試薬として「**TArget Clone™ -Plus-**」を発売しています。この試薬も、弊社ウェブサイトの「PCRコーナー」でご紹介していますので、是非一度チェックしてみてください。