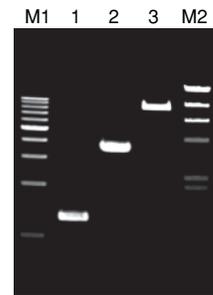


## 『KOD FX』を用いたマウステールライセートからの直接PCR

東洋紡績（株） 敦賀バイオ研究所 杉山 明生

### はじめに

『KOD FX』は、様々な優れた特性を有するPCR酵素『KOD DNA Polymerase』をベースに開発された高性能PCR試薬です。本酵素は、優れた「増幅成功率」、「増幅効率」、「伸長性」を示し、幅広いPCRにおいて確実にPCR産物を得ることができます。特に、その「増幅成功率」は、これまでの他のPCR酵素では不可能だったPCRを可能とする点で画期的なものです。例えば、クールドサンプルを鋳型に用いた場合や、GCリッチなターゲットを増幅する場合でも、KOD FXでは、特別な添加剤やサイクルを用いることなく、通常の条件で確実にPCR産物を得ることができます。図1に、全血をそのままサンプルとして増幅を行った例を示します。このように、KOD FXでは、クールドサンプルを直接PCR反応液に加えるような場合においても、十分な増幅を得ることができます。



サンプル:ヒト全血2  $\mu$ l / 50  $\mu$ l反応系  
ターゲット:Human  $\beta$ -globin cluster領域

M1: 1 kb Ladder Marker  
1: 1.3 kb  
2: 3.6 kb  
3: 8.5 kb  
M2:  $\lambda$ /Hind III digest

図1. 血液サンプルからの直接PCR

今回は、KOD FXのクールドサンプルに強い特長を生かして、マウステールライセートを直接サンプルとして用いて増幅を行った実施例をご紹介します。

### 方 法

#### (1) マウステールライセートの調製

マウステールライセートは、マウステール（凍結保存）を図2に示すアルカリ溶解法にて調製しました。本方法では、Proteinase Kを用いる方法と比較して、簡便に短時間でライセートを調製することができます。

なお、本方法ではマウステールは完全には溶解しませんのでご注意ください（完全に溶解させる必要はありません）。また、溶解液の核酸濃度は測定できません。

マウステール約3 mm

↓  $\leftarrow$ 50 mM NaOH 180  $\mu$ lを加え、Vortexにて良く攪拌

↓ 95 $^{\circ}$ C, 10 min.インキュベート\*

↓  $\leftarrow$ 1M Tris-HCl (pH 8.0) 20  $\mu$ lを加え、Vortexにて良く攪拌

↓ 12,000 rpm, 10 min.遠心

上清回収

(※熱アルカリ溶液の取り扱いに十分ご注意ください。)

図2. マウステールライセートの調製方法(アルカリ溶解法)

#### (2) PCR反応

PCR反応には、(1)で調製したライセートを原液( $\times$ 1)

として、滅菌水にて10倍、100倍希釈したものを5  $\mu$ lをサンプル(鋳型)として用い、以下の条件にて実施しました。

#### ●PCR condition

Template: マウステールライセートの希釈系列( $\times$ 1,  $\times$ 10,  $\times$ 100) 5  $\mu$ l / 50  $\mu$ l Reaction

Target: Mouse membrane glycoprotein (Thy-1) gene 2.6 kb (Accession No.:M10246)

Primer# 1 : 5'-CCACAGAATCCAAGTCGGAAGTCTTG-3' (26mer)

Primer# 2 : 5'-GTAGCAGTGGTGGTATTATACATGGTG-3' (27mer)

#### ①反応液組成

2 $\times$ PCR buffer for KOD FX	25 $\mu$ l
2 mM dNTPs	10 $\mu$ l
10 pmol / $\mu$ l Primer #1	1.5 $\mu$ l
10 pmol / $\mu$ l Primer #2	1.5 $\mu$ l
マウステールライセート	5 $\mu$ l
KOD FX (1.0 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Autoclaved, distilled water	X $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

#### ②PCRサイクル\*

94 $^{\circ}$ C, 2 min.  
98 $^{\circ}$ C, 10 sec.  $\leftarrow$   
68 $^{\circ}$ C, 2.5 min.\*\*  $\leftarrow$  30 cycles

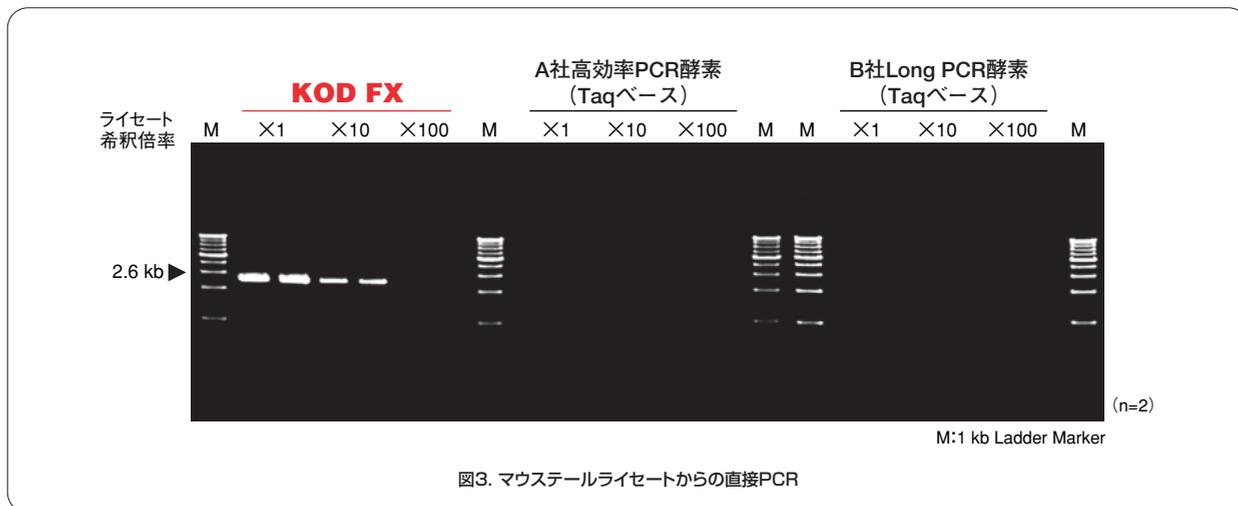
\*プライマーのTm値が73 $^{\circ}$ C未満の場合は、以下の3ステップサイクルを用いることをお勧めします。

94 $^{\circ}$ C, 2 min.  
98 $^{\circ}$ C, 10 sec.  $\leftarrow$   
(Tm-5) $^{\circ}$ C, 30 sec.  $\leftarrow$  30 cycles  
68 $^{\circ}$ C, 1 min./kb  $\leftarrow$

\*\* 1 min./kbを目安にしてください。

また、比較のためTaqベースの他社PCR酵素を用いて、取扱説明書推奨の条件にてPCRを実施し比較を行いました。

結果及び考察

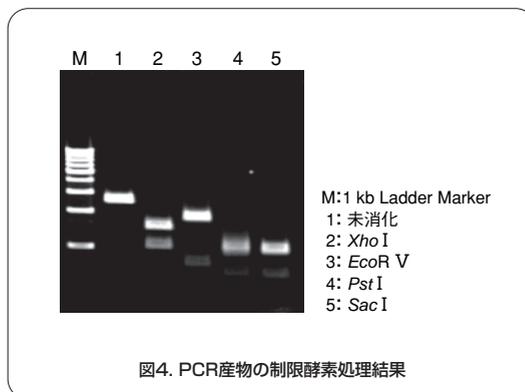


PCR産物は、1%アガロースゲルに5 μlアプライして解析を行いました(図3)。その結果、KOD FXでは、PCRが阻害されることなく、明瞭な2.6 kbの増幅を確認することができました。また、希釈したサンプルを用いた場合においても十分な増幅が確認できました。

マウステールサンプルからPCRを行う場合、精製したDNAを用いるか、Proteinase Kにより夾雑タンパク質を分解した前処理サンプルを用いてPCRを行うのが一般的です。しかし今回、KOD FXを用いることによって、簡便な「アルカリ溶解法」で調製したクルードサンプルを用いても十分に増幅産物が得られることが分かりました。これは、KOD FXが①クルードサンプルに強いこと、および②増幅効率が大変優れていることによるものと考えられます。

また、本アルカリ溶解法では、熱アルカリ処理のため、長鎖ターゲットが増幅できないことも危惧されましたが、別の実験により、5 kbのターゲットも増幅できることを確認しています。

図4は、ここで得られたPCR産物10 μlに対し、種々の制限酵素1 μl(5~10units)を加え、37℃で1hr処理後、電気泳動解析した結果を示しています。その結果、ターゲット配列から予想されるサイズの断片が得られることが確認できました。よって、本方法は制限酵素を用いる遺伝子タイピング(PCR-RFLP解析)にも応用可能であることが示唆されました。



まとめ

以上の検討から、KOD FXを用いることでトランスジェニックマウスの遺伝子解析を簡便化できることが示されました。また本酵素を用いた別の実験において、マウステールに限らず、これまでDNA精製が必要であった培養細胞や血液などからも、直接PCR可能であることが確かめられています。さらに、その他のサンプルにおいても、KOD FXを用いることによって、サンプルをそのまま、あるいは、簡便な前処理を行うのみでPCR実験に用いることができる可能性があると考えられます。多数のサンプルを処理しなければならない場合や、スクリーニング等において大変な思いをされている方は、是非一度、KOD FXをお試しください。その優れた「増幅成功率」に驚かれることと思います。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD FX KOD FX (1U/μl) 2×PCR Buffer for KOD FX 2mM dNTPs	200U×1本 [200回用*]	-20℃	KFX-101	¥35,000
	(200U×1本)×5 [1,000回用*]	-20℃	KFX-101X5	¥140,000

\*50 μl反応を行った時の反応回数を表示しています。

※KOD FXで増幅されたDNA断片は平滑化されているため、通常のTAクローニングはできません。TArget Clone™ -Plus-をお使いください。

関連商品

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
高効率TAクローニングキット TArget Clone™ -Plus-	10回用	-20℃	TAK-201	¥16,000