

高効率・高成功率PCR酵素「KOD FX Neo」を用いたマウス爪からの直接PCR事例

東洋紡績（株） 敦賀バイオ研究所 小林 哲大

はじめに

KOD DNA polymerase*は、優れた伸長性を有し、クルード成分の阻害を受けにくいという特長を有しています。KOD FXは、この特性を利用して開発された高成功率PCR酵素であり、難配列やクルードサンプルからの増幅などの用途でご好評いただいています。

しかし、KOD FXをはじめ従来のPCR酵素は20~30サイクル以降、増幅が持続しなくなる〈プラトー現象〉が生じ、PCR機能が完全には発揮できないことがありました。「KOD FX Neo」は、KOD FXの技術に、弊社で新たに開発した「伸長エンハンサー」などの技術を応用することで、〈プラトー現象〉を抑え、微量サンプルや長鎖・難配列ターゲット、クルードサンプルなどからの増幅効率をさらに向上させることに成功しました。

今回は、微量かつクルードなサンプルの実施例としてマウスの爪からの直接PCRを実施しました。マウスのジェノタイピングでは通常、血液や尾を使用しますが、マウスを傷つけてしまうという欠点がありました。爪を用いることでマウスを傷つけることなくジェノタイピングが可能になります。その方法および結果を紹介いたします。

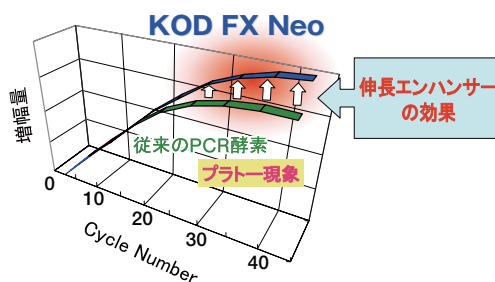


図1. 伸長エンハンサーの効果

*M. Takagi et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63** : 4504-4510 (1997)

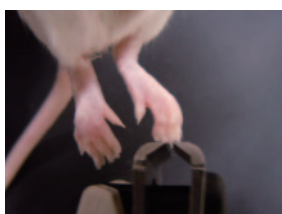
方法

(1) マウス爪の採取

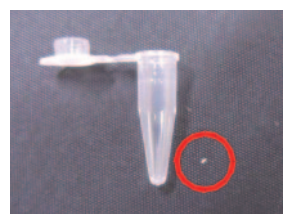
マウス爪は以下のように一指から採取しました。(爪の大きさはごく微量で十分です。目安としては鉤爪(かぎづめ)の先端を切り取る程度です。)



①マウスの足を固定する



②爪切りなどを用いて爪を切断



③PCRチューブに切断した爪、反応液を添加し、PCRへ

(2) PCR

反応液組成

PCR grade water	11 μ l
2×PCR Buffer for KOD FX Neo	25 μ l
2mM dNTPs	10 μ l
10pmol/ μ l Primer #1	1.5 μ l
10pmol/ μ l Primer #2	1.5 μ l
KOD FX Neo	1 μ l
Total reaction volume	50 μ l

ターゲット: Mouse TBP

Primer #1: CAGTTGCTACTGCCTGCTGTTGTT
Primer #2: GCTAGGATTAAGACGTGCCACCA

ターゲット: Mouse Tfrc

Primer #1: TGTGGAGGGTCAACGTGGTAGTT
Primer #2: GTGACATTCTCAGGTGGCAGCTT

ターゲット: Mouse Thy-1

Primer #1: CCACAGAATCCAAGTCGGAAGTCTCTG
Primer #2: GTAGCAGTGGTGGTATTATACATGGTG

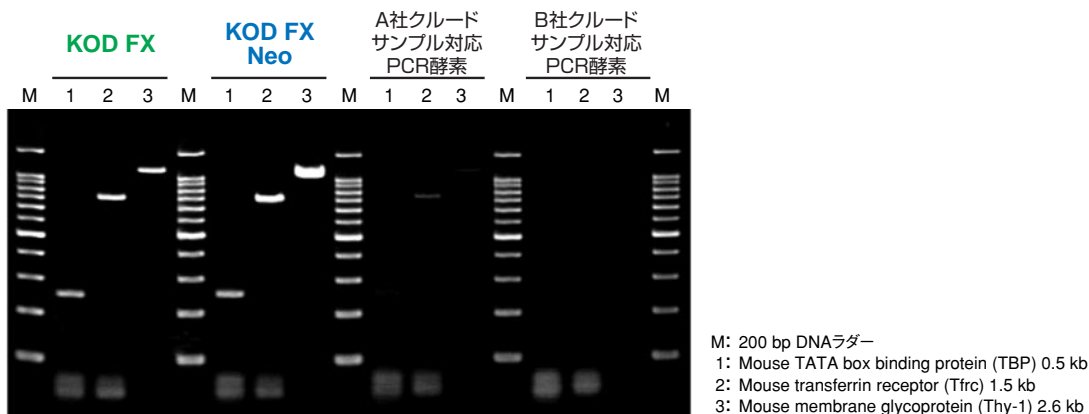
【サイクル条件】

94°C, 2min.
98°C, 10sec.
68°C, 4min./kb
4°C, Hold

← 35 cycles

比較のため他社クルードサンプル対応PCR酵素でも、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。この際、サイクルはKOD FX Neoと同じく35サイクルで行いました。

結果および考察



PCR産物を、2%アガロースゲルに5 μ lアプライして解析を行いました。その結果、KOD FX、KOD FX Neoでのみ増幅が確認できました。なお、KOD FXとKOD FX Neoを比較すると、KOD FX Neoを用いた方が増幅量が多い結果となりました。爪に含まれるDNAは微量とされています。KOD FX Neoを用いれば、このような微量テンプレートからでも十分増幅が可能でした。

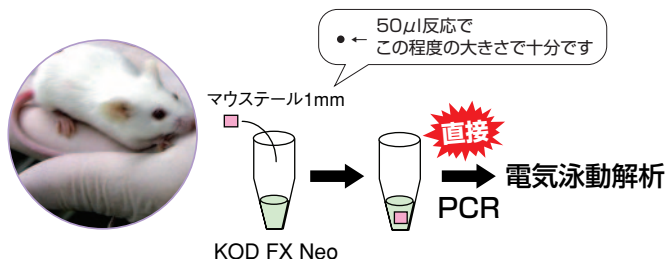
まとめ

爪などの微量サンプルからの精製はロスが生じやすく高度な精製技術を必要とします。今回紹介したマウス爪からの直接PCRは微量サンプルから簡便かつ迅速に目的遺伝子を増幅することが可能です。

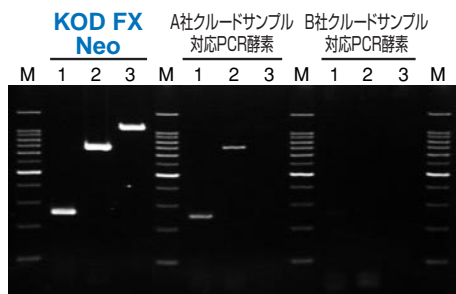
マウスのジェノタイピングの際は、是非、本方法をお試しください。

また、ヒトの爪を用いた検討においても良好な結果を得ています。同様にお試しください。

KOD FX Neoではマウステールの直接PCRも可能です。この際もPCRに持ち込む量はごく微量で実施してください。



*マウステールなど動物組織を直接増幅した場合、PCR産物がアガロースゲル電気泳動のウェルに残ることがあります。泳動する際は、PCR産物 50 μ lに対し、20 mg/ml Proteinase K 10 μ lを添加してから泳動することをお勧めします。



M: 200 bp DNAラダー
1: Mouse TATA box binding protein (TBP) 0.5 kb
2: Mouse transferrin receptor (Tfrc) 1.5 kb
3: Mouse membrane glycoprotein (Thy-1) 2.6 kb

■キャンペーン期間：～2012年3月30日（ご注文分）まで

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	通常価格	キャンペーン価格
高効率・高成功率PCR酵素 KOD FX Neo	200U×1本 [200回用]*	-20℃	KFX-201	¥35,000	¥21,000
KOD FX Neo (1.0U/ μ l)	(200U×1本)×5 [1,000回用]*	-20℃	KFX-201X5	¥140,000	対象外
2×PCR Buffer for KOD FX Neo 2mM dNTP	(200U×1本)×10 [2,000回用]*	-20℃	KFX-201X10	¥260,000	対象外

*50 μ l反応を行ったときの反応回数で表示しています。

関連商品

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
高効率TAクローニングキット (KOD用) TARget Clone™ -Plus-	10回用	-20℃	TAK-201	¥16,000

KOD FX Neoによって増幅されたDNAの末端は平滑化されていますので、末端を制限酵素処理するか、平滑末端クローニングの手法を用いてクローニングを行う必要があります。また専用のTAクローニングキット「TARget Clone™-Plus-(Code No. TAK-201)」を用いることで増幅産物に直接Aを付加し、そのまま容易にTAクローニングを行うことができます。