

KOD One[®]

PCR Master Mix
PCR Master Mix -Blue-

実施例集





Contents

- 製品の概要および特長 p2
- 基本反応条件 p3
- 実施例：基礎データ
 - 実施例 1 高速PCRによる200bp~10kbのターゲットの増幅 p4
 - 実施例 2 高速PCRによる17.5~40kbの長鎖ターゲットの増幅 p4
 - 実施例 3 GC含量70%以上の領域を含むターゲットの増幅 p5
 - 実施例 4 イノシンを含むプライマーを用いた増幅 p5
 - 実施例 5 プラスミドDNA、cDNAをテンプレートとした検出感度の比較 p6
 - 実施例 6 逆転写反応液の持ち込み可能量の確認 p6
- 実施例：クルードサンプルからの増幅
 - 実施例 7 マウステールライセートからの増幅 p7
 - 実施例 8 植物ライセートからの増幅 p7
 - 実施例 9 血液のダイレクトPCR p8
 - 実施例 10 フミン酸耐性の確認 p8
 - 実施例 11 糸状菌・酵母のダイレクトPCR p9
 - 実施例 12 酵母の遺伝子破壊の確認 p10
 - 実施例 13 *A. fumigatus flbC*欠損株のPCRジェノタイピング p11
- 実施例：難配列の増幅
 - 実施例 14 高GC配列mouse c-Maf cDNA全長配列の増幅 p12
- 実施例：PCRによる組み換え
 - 実施例 15 遺伝子の発現ベクター間の移し替え p13
- 実施例：PCRによる変異導入
 - 実施例 16 相補的なプライマーを用いる変異導入 p14
 - 実施例 17 哺乳動物細胞用発現ベクターにクローニングされた遺伝子配列への3塩基変異導入 p15

保存温度：-20℃**

| | (Dye-free 2×PCR Master Mix) KOD One® PCR Master Mix | | | (Dye-containing 2×PCR Master Mix) KOD One® PCR Master Mix -Blue- | | |
|----------|---|-----------------|-----------------|--|-----------------|-----------------|
| Code No. | KMM-101 | KMM-101X5 | KMM-101X10 | KMM-201 | KMM-201X5 | KMM-201X10 |
| 包装 | 1mL×5本* | (1mL×5本) ×5 | (1mL×5本) ×10 | 1mL×5本* | (1mL×5本) ×5 | (1mL×5本) ×10 |
| 価格 | ¥35,000 | ¥140,000 | ¥260,000 | ¥35,000 | ¥140,000 | ¥260,000 |

* 50 μL反応系の場合、200回使用できます。

** 1ヶ月以内であれば、2~8℃で冷蔵保存することが可能です。



製品の概要および特長

高い正確性・増幅効率をもつ改変型KOD DNA Polymerase (UKOD) に、改良型伸長アクセラレーターを添加することで、高い正確性を維持したまま、高速 PCR を実現しています。本製品は2×Master Mixで、テンプレート・プライマーを混合するだけでご使用になれます。また、Loading Dye入りもご用意しております。従来のPCRをより簡便に、短時間で実施可能です。

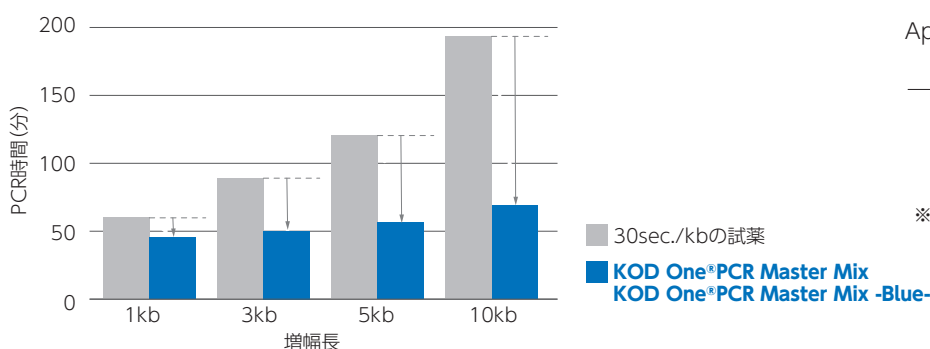


Dye-free 2×PCR Master Mix
KOD One® PCR Master Mix



Dye-containing 2×PCR Master Mix
KOD One® PCR Master Mix -Blue-

■ 伸長速度は最速1sec./kbを実現！

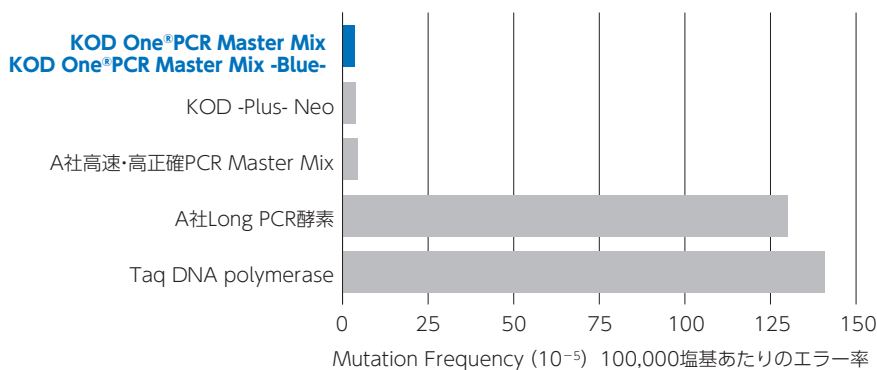


Applied Biosystems 9700の場合

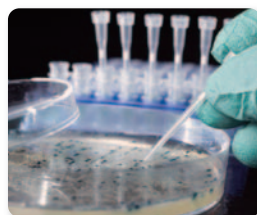
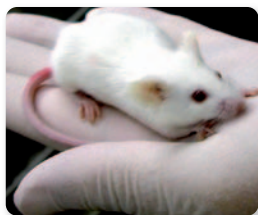
| 増幅長 | 伸長時間 |
|--------|-----------|
| ~1kb | 1sec. |
| 1~10kb | 5sec./kb |
| 10kb~ | 10sec./kb |

※ヒトゲノムDNAをテンプレートとして40kbの増幅を確認しています。

■ KODシリーズ最高レベルの正確性！



■ クロードサンプルも精製なしで効率よく増幅！



■ イノシン (dI) ・ウラシル (dU) を含むプライマー・テンプレートに対応！

こちらからサンプルを
請求できます→





基本反応条件

1) 反応液の調製

反応液を調製する前に試薬を完全に融解し、十分に攪拌してからご使用ください。またすべての試薬を混合後、反応液をボルテックス等で十分に攪拌してサーマルサイクラーにセットしてください。

| 試薬 | 容量 (μL) | 終濃度 |
|------------------------------|---------|---------------|
| 滅菌蒸留水 | X | |
| KOD One® PCR Master Mix (2×) | 25 | 1× |
| Primer (10 μM each) | 1.5 | 0.3 μM*1 each |
| Template*2 | Y | |
| Total Volume | 50 | |

*1: プライマー濃度は、0.3 μM (終濃度) を推奨しますが、10kb以上の長鎖を増幅する場合、プライマー濃度を0.15 μM (終濃度) に下げること増幅量が向上することがあります。また検出感度が悪い場合は、プライマー濃度を0.5 μMや1.0 μM (終濃度) に上げることで検出感度が改善する場合があります。

*2: テンプレートの添加量は以下を参照してください。

①精製されたテンプレート、cDNAをご使用の場合 (PCR反応液: 50 μL)

| テンプレート例 | 添加可能範囲 | 標準添加量 |
|----------|------------------|---------------|
| ゲノムDNA | 真核生物由来DNA | 1~200ng |
| | 原核生物由来DNA | 0.1~200ng |
| プラスミドDNA | 1pg~50ng | 10ng |
| cDNA | 1~750ng (RNA相当量) | 50ng (RNA相当量) |
| λ DNA | 10pg~10ng | 1ng |

②生体組織サンプルなど (PCR反応液: 50 μL)

サンプルの調製方法は、取扱説明書および本実施例をご確認ください。

| テンプレート例 | 標準添加量 | テンプレート例 | 標準添加量 |
|----------------------|--|------------|----------|
| 大腸菌 | チップに付いた少量 | 髪 | 1~2cm |
| 酵母 | チップに付いた少量 | 植物葉 | 2mm角 |
| 糸状菌 | チップに付いた少量 | 精米 | 米粒1/5程度 |
| 培養細胞 | 10 ¹ ~10 ⁵ cells | マウステール | 1mm程度 |
| 血液 (EDTA採血管・クエン酸採血管) | 1~2 μL | 植物組織ライセート* | 0.5~2 μL |
| 爪 | 米粒1/3程度 | 動物組織ライセート* | 0.5~2 μL |

*動植物ライセートの調製方法は、実施例7、8をご確認ください。

2) サイクル条件

| 3ステップサイクル | | |
|--------------|-----------|-------------|
| Denaturation | 98°C, | 10sec. |
| Annealing | (Tm-5)°C, | 5sec. |
| Extension | 68°C, | 1~10sec./kb |

← 25~45cycles

伸長時間は、ターゲット鎖長に応じて以下のように設定してください。

1kb以下: 1sec.
 1~10kb: 5sec./kb
 10kb~: 10sec./kb

PCR機器によって1sec.の制御ができない場合があります。増幅量が少ない場合は、5sec.に設定してください。

ターゲットのコピー数が少ない場合やクルードサンプルからの増幅の場合などで増幅量が少ない場合は、伸長時間を10~30sec./kbに伸ばすことで改善する場合があります。

エキストラバンドが認められる場合は、取扱説明書記載の2ステップ、ステップダウンサイクルをお試しください。

◆取扱説明書はこちらからダウンロードできます→



実施例

1

高速PCRによる200bp~10kbのターゲットの増幅

ヒトゲノムDNAをテンプレートとして伸長時間の短い高速PCRサイクルで増幅を実施しました。

その結果、本製品では1 kb以下のターゲットは伸長時間1 sec.で、1~10 kbのターゲットは、5 sec./ kbで明確なバンドを確認することができました。

反応液組成

| | (μ L) |
|---------------------------|------------|
| 滅菌蒸留水 | 21 |
| KOD One® PCR Master Mix | 25 |
| 10pmol / μ L Primer F | 1.5 |
| 10pmol / μ L Primer R | 1.5 |
| 10ng/ μ L ヒトゲノムDNA | 1 |
| Total Volume | 50 |

PCRサイクル

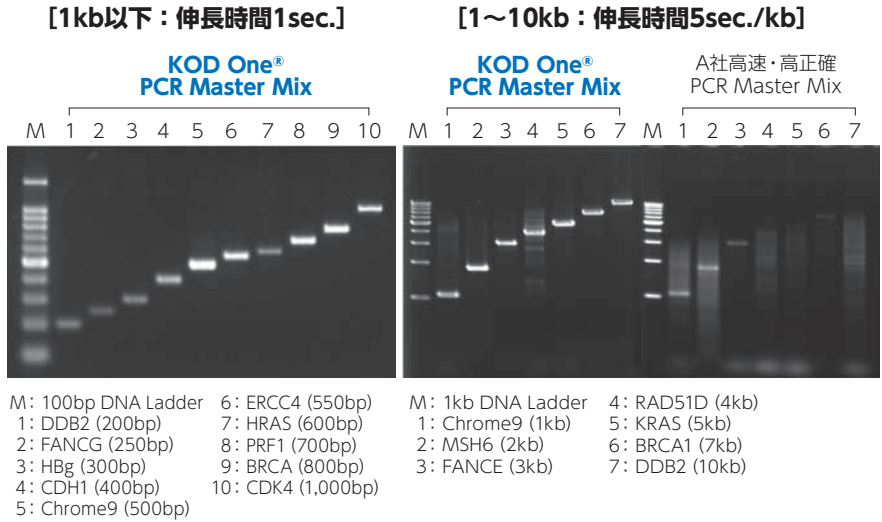
1kb以下のターゲット

98°C, 10sec. ←
60°C, 5sec. } 30cycles
68°C, 1sec. }

1~10kbのターゲット

98°C, 10sec. ←
60°C, 5sec. } 30cycles
68°C, 5sec./kb }

結果



実施例

2

高速PCRによる17.5~40kbの長鎖ターゲットの増幅

ヒトゲノムDNAをテンプレートとして長鎖ターゲットの増幅を行いました。KOD One® PCR Master Mixを用いた場合、17.5~40kbまで増幅が確認できました。

反応液組成

| | (μ L) | (μ L) |
|---------------------------|------------|------------|
| | Lane 1-3 | Lane 4-8 |
| 滅菌蒸留水 | 7.8 | 3.8 |
| KOD One® PCR Master Mix | 10 | 10 |
| 10pmol / μ L Primer F | 0.6 | 0.6 |
| 10pmol / μ L Primer R | 0.6 | 0.6 |
| 10ng/ μ L ヒトゲノムDNA | 1 | 5 |
| Total Volume | 20 | 20 |

PCRサイクル

98°C, 10sec. ←
60°C, 5sec. } 30cycles
68°C, 10sec./kb }

※他社PCR酵素は、メーカー推奨の条件にて実施しています。

プライマー配列

ターゲット 17.5kb Hbg

Forward Primer : TGCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC
Reverse Primer : ACATGATTAGCAAAAGGGCCTAGCTTGGACTCAGA

ターゲット 24kb tPA

Forward Primer : CCTTCACTGTCTGCCTAACTCCTTCGTGTGTTCC
Reverse Primer : TGTCTCCAGCACACAGCATGTTGTCGGTGAC

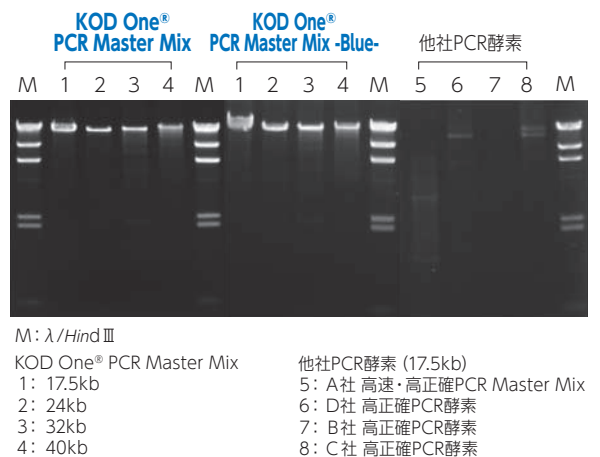
ターゲット 32kb Hbg

Forward Primer : AGACTTCACATGCTGCTCTGTGCATCCGAGTG
Reverse Primer : ACATGATTAGCAAAAGGGCCTAGCTTGGACTCAGA

ターゲット 40kb Hbg

Forward Primer : GTTCTCCTCTGCATATCTCCCCACCGCATCTCTTT
Reverse Primer : CCTCAGTGCCCATGATGTAGGAAAGTGTGGCATA

結果



実施例

3

GC含量70%以上の領域を含むターゲットの増幅

GC含量が多い領域を含む、TGFb、ACE、CASP3、ATCB、BRAFをターゲットとして増幅を行いました。KOD One® PCR Master Mixでは、いずれのターゲットにおいても増幅が見られましたが、A社 Long PCR酵素では増幅は確認できませんでした。

反応液組成

| | (μ L) |
|---------------------------|------------|
| 滅菌蒸留水 | 21 |
| KOD One® PCR Master Mix | 25 |
| 10pmol / μ L Primer F | 1.5 |
| 10pmol / μ L Primer R | 1.5 |
| 10ng/ μ L ヒトゲノムDNA | 1 |
| Total Volume | 50 |

PCRサイクル

98°C, 10sec.
 60°C, 5sec.
 68°C, 50sec.
 (5sec./kb)
 } 30cycles

※A社Long PCR酵素は、メーカー推奨の条件にて実施しています。

プライマー配列

TGFb

Forward Primer : TCCACCTTGGTCAGTCTCCTATAAC
Reverse Primer : GCTGTGTGACTCTGCTTGAAGCTG

ACE

Forward Primer : CCTCAGGCTCTTCTCCTCTCTACTC
Reverse Primer : GGTCATATTCTCCACAAACTTG

CASP3

Forward Primer : CTGGCTTTGTCTCCCTTCTAGGTAC
Reverse Primer : TGACCTTCTCCACTCTAGAAACC

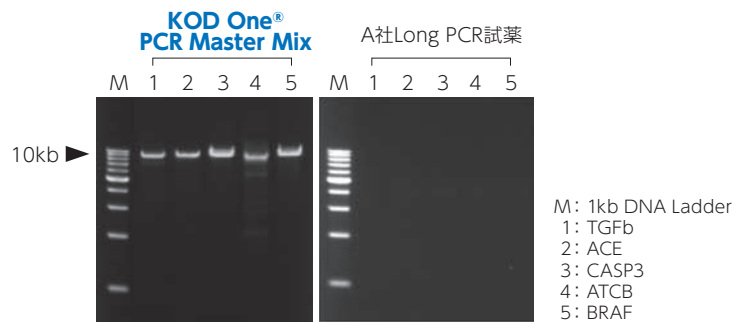
ATCB

Forward Primer : AACACCACACTCTACCTCTCAAGC
Reverse Primer : TTTAATTACAGGTGGCTCATACGTG

BRAF

Forward Primer : CCTTTACCTGAGAGTAAGCATCAGC
Reverse Primer : AACAAAAGTGAACGATACTCCTTG

結果



実施例

4

イノシンを含むプライマーを用いた増幅

イノシンを含む縮重プライマーを用いて、従来品との増幅を比較しました。その結果、KOD One® PCR Master Mix (色素なし、入り) でのみ明確なバンドを確認することができました。

反応液組成

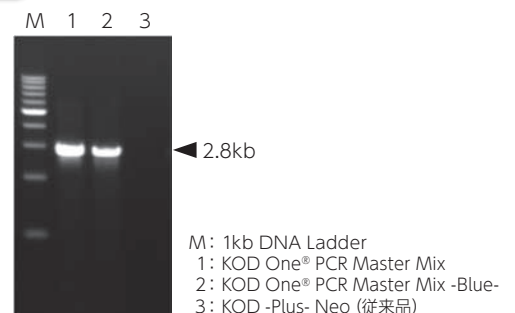
| | (μ L) |
|-------------------------------------|------------|
| 滅菌蒸留水 | 17 |
| KOD One® PCR Master Mix/-Blue- | 25 |
| 100pmol / μ L Primer F | 1.5* |
| 100pmol / μ L Primer R | 1.5* |
| 50ng/ μ L <i>E. coli</i> ゲノムDNA | 5 |
| Total Volume | 50 |

*縮重プライマーを使用する場合、縮重度が高くなるとプライマー1種類あたりのモル濃度が少なくなります。縮重度に合わせてプライマー濃度を上げることで感度を向上させることができます。

プライマー配列

Forward Primer : ATGGTICARATHCCICARAAY
Reverse Primer : RTGIGCYTGRGCCARTTYTC

結果



PCRサイクル

98°C, 10sec.
 60°C, 5sec.
 68°C, 15sec.
 (5sec./kb)
 } 30cycles

実施例

5

プラスミドDNA、cDNAをテンプレートとした検出感度の比較

プラスミドDNA、cDNAを用いて、約3.5kbのターゲットを伸長時間5sec./kbで増幅し、検出感度を比較しました。反応はそれぞれのPCR酵素の推奨条件に従って実施しました。

その結果、KOD One® PCR Master Mixは他社試薬と比較して、より低コピーの領域まで増幅することができました。

反応液組成

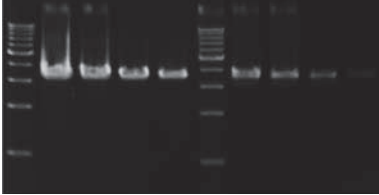
| | (μ L) |
|---------------------------|------------|
| 滅菌蒸留水 | 21 |
| KOD One® PCR Master Mix | 25 |
| 10pmol / μ L Primer F | 1.5 |
| 10pmol / μ L Primer R | 1.5 |
| Template(プラスミド DNA, cDNA) | 1 |
| Total Volume | 50 |

結果

[プラスミドDNA]

Template: プラスミドDNA
Target: Polymerase遺伝子

KOD One® PCR Master Mix A社高速・高正確 PCR Master Mix

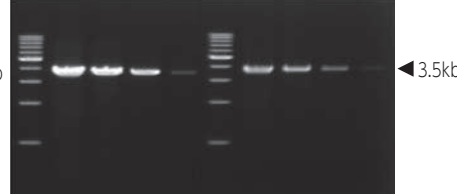


M: 1kb DNA Ladder
1: 25pg
2: 6.3pg
3: 1.6pg
4: 0.4pg

[cDNA]

Template: HeLa細胞 total RNA由来のcDNA
Target: TFR

KOD One® PCR Master Mix A社高速・高正確 PCR Master Mix



M: 1kb DNA Ladder
1: 25ng (RNA相当量)
2: 5ng (RNA相当量)
3: 1ng (RNA相当量)
4: 0.7ng (RNA相当量)

PCRサイクル

98°C, 10sec. ←
60°C, 5sec. ← 30cycles
68°C, 18sec. ←
(5sec./kb)

※A社高速・高正確PCR Master Mixは、メーカー推奨条件に従って実施しています。

実施例

6

逆転写反応液の持ち込み可能量の確認

逆転写反応液 (cDNA) に含まれるRNAはPCRに対して阻害的に働くため、大量のcDNAの添加は反応阻害につながります。そこで、cDNAの持ち込み可能量を確認するためcDNAの添加量をふり、TFR遺伝子の検出を行いました。

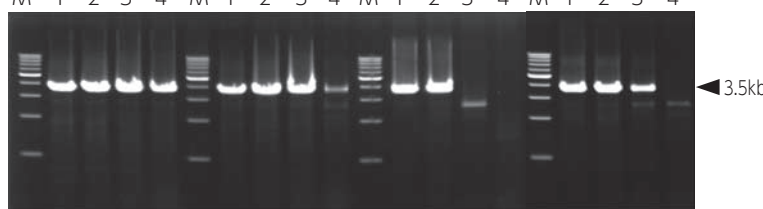
その結果、KOD One® PCR Master MixはRNAによる阻害を受けにくく、従来品や他社品では増幅困難な多量のcDNAを添加した条件においても良好な増幅を行うことができました。

反応液組成

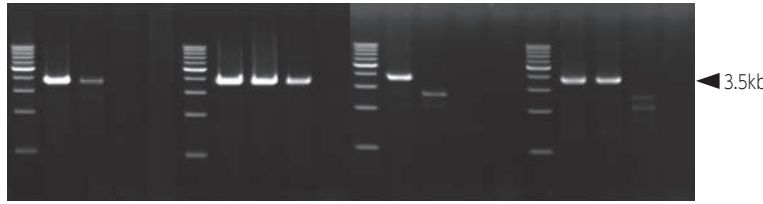
| | (μ L) |
|--------------------------------|------------|
| 滅菌蒸留水 | 17 |
| KOD One® PCR Master Mix/-Blue- | 25 |
| 10pmol / μ L Primer F | 1.5 |
| 10pmol / μ L Primer R | 1.5 |
| cDNA | 5 |
| Total Volume | 50 |

結果

KOD One® PCR Master Mix **KOD One® PCR Master Mix -Blue-** KOD -Plus- Neo KOD FX Neo



A社高速・高正確 PCR Master Mix A社高正確・高効率 PCR酵素 B社高正確 PCR酵素 C社高正確 PCR酵素



M: 1kb DNA Ladder
1: 125ng (RNA相当量)
2: 250ng (RNA相当量)
3: 500ng (RNA相当量)
4: 1,000ng (RNA相当量)
Template: HeLa細胞 total RNA由来のcDNA
Target: TFR

PCRサイクル

98°C, 10sec. ←
60°C, 5sec. ← 30cycles
68°C, 18sec. ←
(5sec./kb)

※KOD One® PCR Master Mix以外のPCR酵素は、それぞれの推奨条件に従って実施しています。

プライマー配列

Forward Primer : CCACCATCTCGGTCATCAGGATTGCCT
Reverse Primer : TACTCCTTAACGAGAAGACATCTCAAGAC

実施例

7

マウステールライセートからの増幅

アルカリ溶解法にて調製したマウステールライセートを用いて、マウスThy-1遺伝子の増幅を行いました。反応はそれぞれのPCR酵素の推奨条件に従って5sec./kbの伸長時間で実施しました。その結果、KOD One® PCR Master Mixのみ明確なバンドを確認することができました。

■アルカリ溶解法

- マウステール (約3mm)
- マイクロチューブに移す
- 50mM NaOH 180 μL添加
Vortexにて良く攪拌
- 95°C・10min.
1M Tris-HCl (pH8.0) 20 μL添加
Vortexにて良く攪拌
12,000rpm, 5min. [optional]
- 50 μL反応系に上清1~8 μL添加 (マウステールは完全に溶解しません)

反応液組成

| | (μL) |
|-------------------------|------|
| 滅菌蒸留水 | Y |
| KOD One® PCR Master Mix | 25 |
| 10pmol / μL Primer F | 1.5 |
| 10pmol / μL Primer R | 1.5 |
| ライセート | X |
| Total Volume | 50 |

PCRサイクル

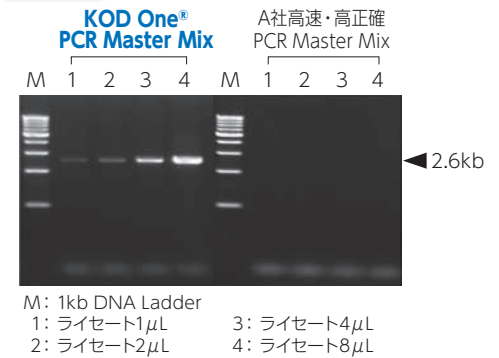
98°C, 10sec. ←
60°C, 5sec. ← 30cycles
68°C, 13sec. ←
(5sec./kb)

※A社高速・高正確PCR Master Mixは、その推奨条件に従って実施しています。

プライマー配列

Forward Primer :
CCACAGAATCCAAGTCGGAACCTTTG
Reverse Primer :
GTAGCAGTGGTGGTATTATACATGGTG

結果



実施例

8

植物ライセートからの増幅

ワンステップ法にて調製したタバコ葉ライセートを用いて、KOD One® PCR Master Mix (色素なし、入り) および従来品でrbcL遺伝子の増幅比較を行いました。KOD One® PCR Master Mixでは良好な増幅が得られました。KOD FX Neoでは、同様の増幅が見られましたが、KOD -Plus- Neoは、ライセート1 μLの場合には増幅が見られず、植物成分による阻害がかかったものと思われる。

■ワンステップ法

- 葉 (3mm角)
- マイクロチューブに移す
- Buffer A 100 μL添加
Vortexにて良く攪拌
Buffer A: 100mM Tris-HCl (pH9.5), 1M KCl, 10mM EDTA
- 95°C・10min.
Vortexにて良く攪拌
- 20 μL反応系に0.5~2 μL添加

反応液組成

| | (μL) |
|--------------------------------|------|
| 滅菌蒸留水 | Y |
| KOD One® PCR Master Mix/-Blue- | 10 |
| 10pmol / μL Primer F | 0.6 |
| 10pmol / μL Primer R | 0.6 |
| ライセート | X |
| Total Volume | 20 |

PCRサイクル

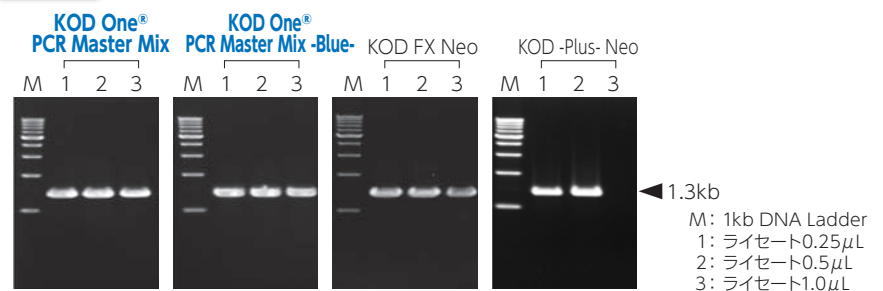
98°C, 10sec. ←
60°C, 5sec. ← 30cycles
68°C, 7sec. ←
(5sec./kb)

※従来品PCR酵素は、それぞれの推奨の条件にて実施しています。

プライマー配列

Forward Primer : ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC
Reverse Primer : AAGCAGCAGCTAGTTCGGGCTCCA

結果



【参考文献】
Bio Techniques, 19: 394 (1995)

実施例

9

血液のダイレクトPCR

血液を精製せずにそのまま用いて、ヒトβ-globin遺伝子の増幅を行いました。反応はそれぞれのPCR酵素の推奨条件に従って5sec./kbの伸長時間で実施しました。その結果、KOD One® PCR Master Mixのみ明確なバンドを確認することができました。

反応液組成

| | (μL) |
|-------------------------|------|
| 滅菌蒸留水 | Y |
| KOD One® PCR Master Mix | 25 |
| 10pmol / μL Primer F | 1.5 |
| 10pmol / μL Primer R | 1.5 |
| 血液 | X |
| Total Volume | 50 |

PCRサイクル

98°C, 10sec. ←
60°C, 5sec. ← 30cycles
68°C, 18sec. ←
(5sec./kb)

※A社高速・高正確PCR Master Mixは、その推奨条件に従って実施しています。

結果



M: 1kb DNA Ladder
1: 血液1μL
2: 血液2μL
3: 血液4μL
4: 血液8μL

プライマー配列

Forward Primer : GGTGTTCCCTTGATGTAGCACA
Reverse Primer : ACATGTATTTGCATGGAAAACAACCTC

実施例

10

フミン酸耐性の確認

フミン酸 (humic acid) とは、腐植土や土壌などに存在する赤褐色または黒褐色の有機物であり、PCRを阻害することが知られています。通常行われるDNAの精製ではこのフミン酸は除くことはできません。そのため、環境・生態系サンプルを鋳型としたPCRはとても難しいとされています。そこでKOD One® PCR Master Mixおよび各種PCR酵素を用い、フミン酸含有下でヒトゲノムからHBg遺伝子の増幅確認を行いました。

KOD One® PCR Master Mixを用いた場合は、フミン酸の量にかかわらず増幅が見られ、高速PCR条件下においても高いフミン酸耐性を示す結果となりました。

反応液組成

| | (μL) |
|---------------------------|------|
| 滅菌蒸留水 | Y |
| KOD One® PCR Master Mix | 10 |
| 10pmol / μL Primer F | 0.6 |
| 10pmol / μL Primer R | 0.6 |
| OD ₂₈₀ =1 フミン酸 | X |
| 4ng / μL ヒトゲノム DNA | 1 |
| Total Volume | 20 |

PCRサイクル

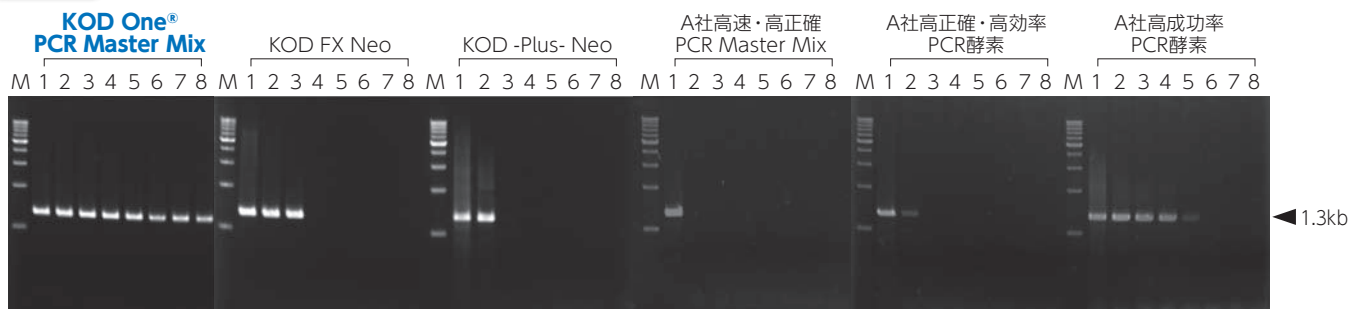
98°C, 10sec. ←
60°C, 5sec. ← 30cycles
68°C, 7sec. ←
(5sec./kb)

※KOD One® PCR Master Mix以外のPCR酵素は、それぞれ推奨の条件にて実施しています。

プライマー配列

Forward Primer :
TTAGGCCTTAGCGGGCTTAGAC
Reverse Primer :
CCAGGATTTTTGATGGGACACG

結果



M: 1kb DNA Ladder

フミン酸添加量 (X) 1: 0μL 5: 4μL
2: 1μL 6: 5μL
3: 2μL 7: 6μL
4: 3μL 8: 7μL

実施例

11

糸状菌・酵母のダイレクトPCR

実験の目的

糸状菌・酵母の菌体から抽出、精製なしでDNAを増幅する。

実験方法

サンプルの種類

Aspergillus oryzae および *Saccharomyces cerevisiae* 菌体

サンプルの調製方法

糸状菌・酵母を生育させたプレートから、爪楊枝で菌体を取り、以下をテンプレートとして用いました。

1. 50 μ Lの滅菌水に懸濁したうちの5 μ L
2. 20 μ Lの滅菌水に懸濁したうちの5 μ L
3. そのまま

ターゲット遺伝子名と長さ

18S rRNA内 ITS1領域

Aspergillus oryzae : 約180bp

Saccharomyces cerevisiae : 約450bp

プライマー配列

ITS1 Forward Primer : GTAACAAGGTYTCCGT

ITS1 Reverse Primer : CGTTCTTCATCGATG

※ターゲット領域が短いため、この実験では推奨の長さ (22~35mer) よりも短いPrimerを用いました。



回収した *Aspergillus oryzae* の菌体

反応液組成

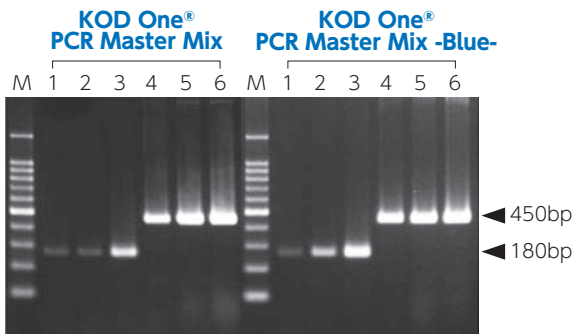
| | (μ L) |
|-------------------------|-------------|
| 滅菌蒸留水 | 3.8 または 8.8 |
| KOD One® PCR Master Mix | 10 |
| 10 μ M Primer F | 0.6 |
| 10 μ M Primer R | 0.6 |
| 菌体懸濁液または菌体 | 5 または 0 |
| Total Volume | 20 |

PCRサイクル

| | |
|--------------|----------|
| 98°C, 10sec. | 30cycles |
| 45°C, 5sec. | |
| 68°C, 10sec. | |

結果・考察

*Saccharomyces cerevisiae*では、サンプル調製法による増幅量の差はそれほど見られませんでした。また、*Aspergillus oryzae*では、菌体をPCR反応液に直接懸濁した方がよく増幅しました。また、KOD One® PCR Master MixとKOD One® PCR Master Mix -Blue-では、結果に差はありませんでした。



M: 100bp DNA Ladder

Aspergillus oryzae

- 1: 菌体を50 μ L滅菌水に懸濁 5 μ L使用
- 2: 菌体を20 μ L滅菌水に懸濁 5 μ L使用
- 3: 菌体をdirect

Saccharomyces cerevisiae

- 4: 菌体を50 μ L滅菌水に懸濁 5 μ L使用
- 5: 菌体を20 μ L滅菌水に懸濁 5 μ L使用
- 6: 菌体をdirect

※菌体からのダイレクトPCRは、菌体量が多いと阻害がかかり増幅がうまくいかない場合がありますが、一方でカビなどは細胞が固いため、ある程度の量を入れないと増幅できないこともあります。あらかじめ、菌体量の検討をお勧めします。

菌体量を検討してうまく増幅できない場合は、伸長時間を10sec./kbに設定することで増幅できることがあります。

また、KOD One® PCR Master Mixは、推奨のPCRサイクルに初期変性のステップがないため、サンプル調製を行う際に、滅菌水に懸濁後、95°C, 5min.程度の熱処理を行うことで、菌種によってはPCR効率が改善される場合があります。

実施例

12

酵母の遺伝子破壊の確認

データご提供 大阪大学大学院 歯学研究科 口腔科学フロンティアセンター 先端口腔生物学教室 荒木 保弘 先生

実験の目的

染色体上の標的遺伝子をマーカー遺伝子により破壊できたことを確認する。

実験方法

サンプルの種類

酵母から抽出したゲノムDNA

サンプルの調製方法

イエローチップの先にマッチの頭ほどのコロニーをかき取り、0.02M NaOH 50 μ LへPCRチューブ内で懸濁した。酵母懸濁液をPCRで95度10分熱処理した。

ターゲット遺伝子名と長さ

PIB2/ 2,345bp pib2::natNT2/ 1,783bp
GTR1/ 1,128bp gtr1::kanMX4/ 1,679bp

プライマー配列

PIB2

Forward Primer : CGGATGCTATGTCACGTTG
Reverse Primer : TCTTACTGCTGTTGTGTC

GTR1

Forward Primer : ACCCTAAATTGTGATTATGG
Reverse Primer : TTCTCCTCTTATGTTTCTC

反応液組成

| | (μ L) |
|--------------------------------|------------|
| 滅菌蒸留水 | 3.9 |
| KOD One® PCR Master Mix -Blue- | 5 |
| 10 μ M Primer F | 0.3 |
| 10 μ M Primer R | 0.3 |
| 酵母懸濁液 | 0.5 |
| Total Volume | 10 |

PCRサイクル

98°C, 10sec. ←
53°C, 5sec. — 35cycles
68°C, 10sec. —

PCR反応液の半量(5 μ L)を用いて、電気泳動を行った。

サイクラー機種

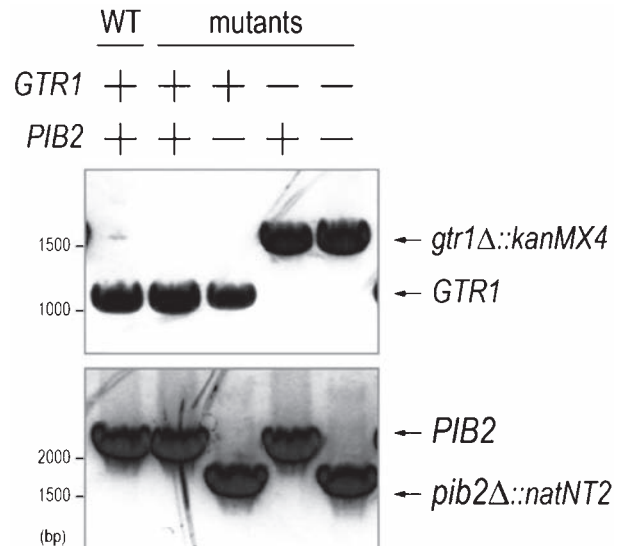
Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700

結果・考察

- ・ PCRの時間が大幅に短縮された。
- ・ 目的遺伝子の増幅効率が改善された。
- ・ All in oneなのでPCR反応液の調製が容易になった。

感想・ご意見等

普段から大量のPCRをやる機会が多く、負担となっていました。しかし、KOD One®を使うようになってから、この負担が大きく軽減しました。以前は御社のKOD製品を目的別に数種類使っていましたが、反応速度、正確性を鑑みて現在はKOD One®のみを用いており、経済的な観点からも助かっています。



実施例

13

A. fumigatus flbC欠損株のPCRジェノタイピング

データご提供 東北医科薬科大学 薬学科 感染生体防御学教室 田中 大 様

実験の目的

PCR法を用いてA. fumigatus flbC遺伝子組換え体を選別する。

実験方法

サンプルの種類

Aspergillus fumigatus 孢子

サンプルの調製方法

極微量 (チップの先に付いたか付かないくらい) のAspergillus fumigatus孢子をTE buffer 100 μLに懸濁し、電子レンジ処理 (500W、2分) して上清を得た。

ターゲット遺伝子名と長さ

flbC (Afu2g13770) 1,500bp
ptrA 2,600bp

プライマー配列

Forward Primer : TCTCATCTGCTCCCTTCATCT
Reverse Primer : ATTGTACAAGGGACGAGAGCC

サイクラー機種

T100 サーマルサイクラー (Bio-Rad)

●KOD One® PCR Master Mix

反応液組成

| | (μL) |
|--------------------------------|-------|
| 滅菌蒸留水 | 8.8 |
| KOD One® PCR Master Mix | 10 |
| 10 μM Forward / Reverse Primer | 各 0.1 |
| 電子レンジ処理 孢子懸濁液 | 1 |
| Total Volume | 20 |

PCRサイクル

98°C, 10sec. ↺
68°C, 20sec. ↺ 40cycles

●KOD FX Neo

反応液組成

| | (μL) |
|--------------------------------|-------|
| 滅菌蒸留水 | 7.4 |
| 2×PCR Buffer | 10 |
| 10 μM Forward / Reverse Primer | 各 0.1 |
| KOD FX Neo | 0.4 |
| 電子レンジ処理 孢子懸濁液 | 1 |
| Total Volume | 20 |

PCRサイクル

98°C, 10sec. ↺
68°C, 240sec. ↺ 40cycles

結果・考察

Aspergillus fumigatus A1159株を親株とし、flbC遺伝子のコード領域上流・下流にそれぞれ相同な配列、及びピリチアミン耐性遺伝子ptrAの配列を含むDNA断片を挿入した組換え体 (flbC遺伝子欠損株 #1~3) を取得した。

これら組換え体および親株の孢子を電子レンジ処理して得られた溶液を鋳型とし、KOD One®とKOD FX Neoをそれぞれ用いてコロニーPCRを行った。その後、アガロース電気泳動法にて遺伝子組換えの成否および両酵素の性能比較を行った。

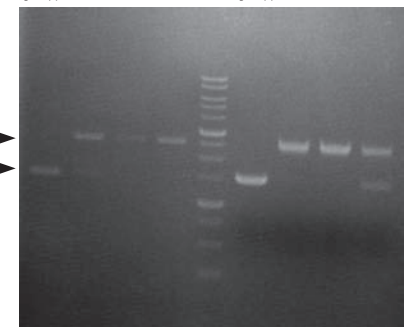
その結果、いずれの酵素を用いた場合でも、遺伝子組換え体・親株のどちらでも問題なくPCR生成物が得られた。すなわち、どちらの酵素も、コロニーPCR法による遺伝子組換えの成否観察に用いることができた。一方、PCRに要した時間は、KOD One®はおおよそ55分、KOD FX Neoは200分であった。

これらのことから、KOD One®はクルードサンプルに強い酵素でありながら、コロニーPCRに要する時間を短縮できる「使える酵素」であることが分かった。

感想・ご意見等

同僚に「カビ孢子のコロニーPCRにはKOD FX Neoを使うといいよ」と教わって以来、遺伝子組換えカビのジェノタイピングにはKOD FX Neoばかり使ってきました。しかしこのKOD One®は、伸長に要する時間が大幅に短縮されているにも関わらず、KOD FX Neo並みにクルードサンプルに強いということで驚かされました。今後もKOD One®を使い続けると思います。

KOD FX Neo 組換え体 野生株 #1 #2 #3
KOD One® 組換え体 野生株 #1 #2 #3



マーカー: 1kb DNA Ladder

実施例

14

高GC配列 mouse c-Maf cDNA 全長配列の増幅

データご提供 福島県立医科大学 医学部 放射性同位素研究施設 関亦 正幸 先生

実験の目的

動物細胞発現ベクター構築のための mouse c-Maf cDNA 全長配列を増幅する。

実験方法

サンプルの種類

マウスT細胞から抽出したtotal RNA

サンプルの調製方法

ISOGEN (ニッポンジーン) によりtotal RNAを調製し、その後PrimeScript RT Master mix (Perfect Real Time) (タカラバイオ) にてcDNA合成したものを鋳型に用いた。

ターゲット遺伝子名と長さ

mouse c-Maf cDNA / 1.2 kb

プライマー配列

Forward Primer : GGGATCCGATGGCTTCAGAACTGGCAA
 長さ : 27mer Tm : 65.1℃
 Reverse Primer : GGTCGACCATGAAAAATTCGGGAGAGG
 長さ : 27mer Tm : 63.5℃

●KOD One® PCR Master Mix -Blue-, A社高速・高正確 PCR Master Mix 共通

反応液組成

| | (μ L) |
|---------------------|------------|
| 各 PCR Master Mix | 3 |
| 10 μ M Primer F | 1 |
| 10 μ M Primer R | 1 |
| cDNA | 1 |
| Total Volume | 6 |

PCRサイクル

| | |
|-------------|------------|
| 94℃, 2min. | } 30cycles |
| 98℃, 10sec. | |
| 55℃, 5sec. | |
| 68℃, 15sec. | |

※A社 高速・高正確 PCR Master Mixの条件でPCRを行っています。

サイクラー機種

Bioer Technology LifeECO ver 2.0

結果・考察

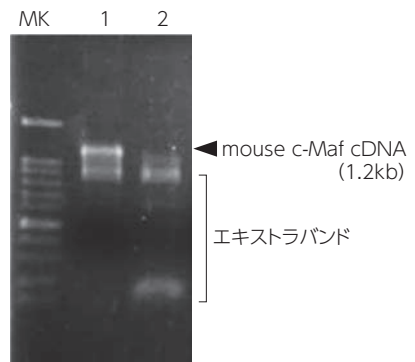
KOD One®はGC含量の多いc-Maf cDNAの1.2 kbを増幅することができた。A社高速・高正確PCR Master Mixは増幅できるがGC含量の多い領域を欠失した産物ができる。

感想・ご意見等

増幅配列はGC含量が70%と高く、局所的に94%を超えてGCが連続する配列が存在している。そのため、通常のTaqポリメラーゼでは増幅できないか、できたとしても高連続GC配列を欠失した短鎖として増幅されてしまう。DMSOを添加することでPCR反応が改善されることはあるが、常に安定した結果が得られるかは不明である。

比較のA社高速・高正確PCR Master Mixも、その中においては増幅能力の高い正確性の高い酵素であるが、図(レーン2)にあるように高連続GC配列を欠失した短鎖として増幅されている。これに対して、KOD One® PCR Master Mix -Blue- (レーン1) では、全長の1.2kbの増幅がメインのバンドとして検出されている。このメインバンドをクローニングし、シークエンスしたところ塩基配列が正しいことが確認できた。

このことから、KOD One® PCR Master Mix -Blue-は、高連続GC配列の正確な増幅にも適していることが判明した。



MK : 100bp DNA Ladder
 1 : KOD One® PCR Master Mix -Blue-
 2 : A社高速・高正確PCR Master Mix

実施例

15

遺伝子の発現ベクター間の移し替え

データご提供 慶應義塾大学 理工学部 生命分子工学研究室 藤原 慶 様

実験の目的

別々にクローン化した遺伝子を、別の発現ベクターに移し替える。

実験方法

サンプルの種類

プラスミドDNA

サンプルの調製方法

キットで精製したDNA

ターゲット遺伝子名と長さ

ベクターA (pET15由来) 6,050bp
大腸菌遺伝子A-H 1,000~2,000bp

プライマー配列

ベクター用 Forward Primer : 長さ : 20nt Tm : 55.4°C
Reverse Primer : 長さ : 18nt Tm : 56.9°C

遺伝子用 Forward Primer : 長さ : 23nt Tm : 58.8°C
Reverse Primer : 長さ : 21nt Tm : 53.8°C

相同領域

Forward側 : 81nt
Reverse側 : 117nt

※今回の実験では、移し替えるplasmid自体に相同配列があるため、相同領域にプライマー配列が含まれます。

反応液組成

| | (μL) |
|------------------------------|-------------------|
| 滅菌蒸留水 | 1.4 |
| KOD One® PCR Master Mix | 2.5 |
| 3 μM Primer F | 0.5 |
| 3 μM Primer R | 0.5 |
| 50ng/ μL Template | 0.1 |
| Total Volume | 5.0 |

PCRサイクル

98°C, 1min.
96°C, 10sec. ← 25cycles
55°C, 10sec.
72°C, 10-35sec.

測定機器

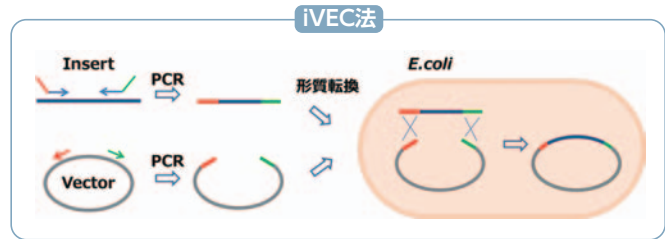
ChemiDoc MP (Bio-Rad)

結果・考察

各遺伝子につき1コロニーをつついたところ、8コロニー中7コロニーが当たり。

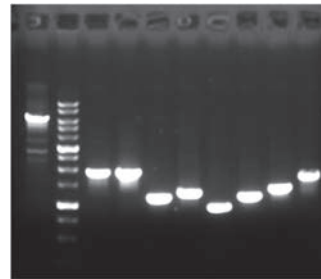
感想・ご意見等

他社の高速PCR酵素から切り替えたところ、ベクターの増幅効率が倍以上になり、なおかつベクターPCRの失敗がほとんどなくなりました。また、iVEC3法での形質転換を活用することで、PCRからプレATINGまで2時間で終わることができるようになりました。



PCR後、反応液5 μL に対し *Dpn*I (NEB) を0.1 μL 添加
↓
37°C 40分 (この間に電気泳動)

1 M 2 3 4 5 6 7 8 9



1: vector (約6kbp)
M: 1kbpラダーマーカー
2~9: insert (8種類の大腸菌遺伝子、1kbp~2kbp)
1 μL を泳動

↓
Vector 1.5 μL 、遺伝子 1 μL を混合し、12 μL のiVEC3株のコピテントセルと混合
(資源研より供与された株を凍結保存プロトコールによりコピテントセル化したものを使用)

↓
On ice 20分

↓
LB培地400 μL を添加し、37°Cで60分静置

↓
遠心 (12,000xg 30秒) により菌体を回収し、上清を捨てる

↓
10 μL の10mM Tris-HCl (pH8.0) で懸濁し、即座にプレートへまく

↓
翌日、生えたコロニーに対するコロニーPCRもKOD One®で行った (1サンプルあたり合計3 μL の系)

実施例

16

相補的なプライマーを用いる変異導入

実験の目的

相補的なプライマーを用いた変異導入法による、約5kbのプラスミドへ変異導入（3塩基置換、3塩基欠損、3塩基挿入）を行う。

実験方法

サンプルの種類

プラスミドDNA

サンプルの調製方法

組換え大腸菌からミニプレップにて精製しました。

プライマー設計

*Forward : Fwd, Reverse : Rev

①導入したい変異、位置を決定する。

プラスミド配列

5'-ATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGC**ATG**CATGCATGCATGCATGCATGC-3

導入したい変異

置換例 ATG→TGC 5'-ATGCATGCATGCATGCATGCATGC**TGC**CATGCATGCATGCATGCATGC-3

欠損例 ATGを除去 5'-ATGCATGCATGCATGCATGCATGC.....CATGCATGCATGCATGCATGC-3

挿入例 ATGの前にAAA 5'-ATGCATGCATGCATGCATGCATGC**AAA**ATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3

②Fwdプライマーの設計

変異部位を中心に5'側、3'側それぞれに12~20bpのプラスミドにハイブリダイズする領域をつける。

プラスミド配列

5'-ATGCATGCATGCATGCATGCATGC**ATG**CATGCATGCATGCATGCATGC-3

5'- TGCATGCATGCATGC TGC CATGCATGCATGCAT -3' ⇨ 置換用Fwd Primer

5'- TGCATGCATGCATGC CATGCATGCATGCAT -3' ⇨ 欠損用Fwd Primer

5'- TGCATGCATGCATGC AAA ATGCATGCATGCATG -3' ⇨ 挿入用Fwd Primer

③Revプライマーの設計

上記で設計したFwdプライマーと逆相補鎖のプライマーを設計する

5'- TGCATGCATGCATGC**TGC**CATGCATGCATGCAT -3' ⇨ 置換用Rev Primer
3'- ACGTACGTACGTACG**ACG**GTACGTACGTACGTA -5'

5'- TGCATGCATGCATGC.....CATGCATGCATGCAT -3' ⇨ 欠損用Rev Primer
3'- ACGTACGTACGTACG.....GTACGTACGTACGTA -5'

5'- TGCATGCATGCATGC**AAA**ATGCATGCATGCATG -3' ⇨ 挿入用Rev Primer
3'- ACGTACGTACGTACG**TTT**TACGTACGTACGTAC -5'

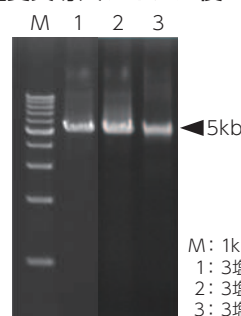
反応液組成

| | (μL) |
|-------------------------|------|
| 滅菌蒸留水 | 21 |
| KOD One® PCR Master Mix | 25 |
| 10pmol / μL Primer F | 1.5 |
| 10pmol / μL Primer R | 1.5 |
| 50ng/μL プラスミドDNA | 1 |
| Total Volume | 50 |

PCRサイクル

98°C, 10sec. ←
60°C, 5sec. ←
68°C, 25sec. ← 15cycles
(5sec./kb)

[変異導入サイクル後の電気泳動確認]



[各8クローンの変異導入率および、目的外変異数]

| | 変異導入率 | 目的外変異数 |
|-------|---------|--------|
| 3塩基置換 | 8/8クローン | 0個 |
| 3塩基欠損 | 8/8クローン | 0個 |
| 3塩基挿入 | 7/8クローン | 0個 |

結果・考察

KOD One® PCR Master Mixを使用することで、5kbのプラスミドでも伸長時間25sec.の高速サイクルで変異導入ができました。得られたコロニーのほとんどで変異導入が確認され、目的外変異(2nd-site mutation)は確認されませんでした。KOD One® PCR Master Mixを用いることで、迅速かつ正確に変異導入が可能です。

哺乳動物細胞用発現ベクターにクローニングされた遺伝子配列への3塩基変異導入

データご提供 広島大学大学院 医歯薬保健学研究院 産科婦人科教室 助教 杉本 潤 様

実験の目的

哺乳動物細胞用発現ベクターにクローニングされた遺伝子Aに対しアミノ酸置換を誘発する3塩基の変異導入を行う。

実験方法

サンプルの種類

プラスミド：哺乳動物細胞用発現ベクター（約7.1kb）に遺伝子A（約1.8kb）をクローニングしたプラスミド

サンプルの調製方法

Qiagen midi kit で抽出、精製したプラスミド DNA

ターゲット遺伝子名と長さ

遺伝子A：1.8kb、ベクター：7.1kb

反応液組成

| | |
|-------------------------|------------|
| | (μ L) |
| 滅菌蒸留水 | 10.5 |
| KOD One® PCR Master Mix | 12.5 |
| 10 μ M Primer F | 0.5 |
| 10 μ M Primer R | 0.5 |
| 50pg/ μ LプラスミドDNA | 1 |
| Total Volume | 25 |

PCRサイクル

| | |
|--------------|------------|
| 98°C, 10sec. | } 30cycles |
| 55°C, 15sec. | |
| 72°C, 40sec. | |

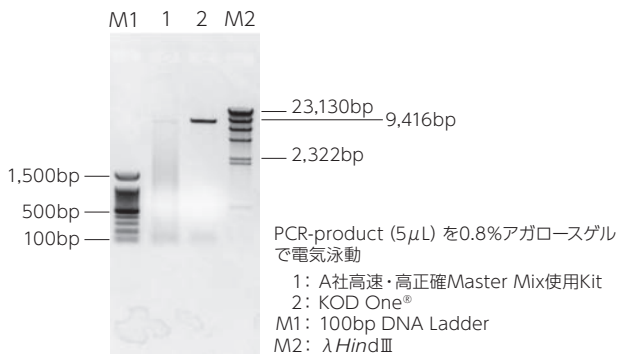
プライマー配列

変異導入用プライマーForward (31base)
変異導入用プライマーReverse (31base)

測定機器

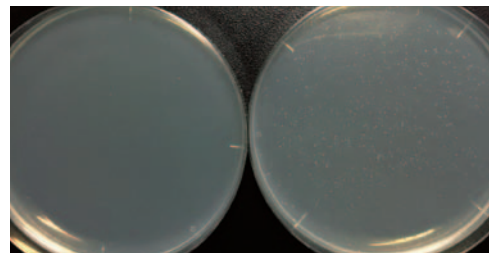
GeneAmp PCR system 9700

結果・考察



A社高速・高正確 PCR Master Mix使用Kit

KOD One®



PCR-product 2 μ Lを直接大腸菌DH5 α に形質転換後のLBプレート像

感想・ご意見等

当研究室で使用している哺乳動物細胞用発現ベクターは、その大きさと特徴的な配列により、クローニングされた遺伝子配列への直接的な変異導入が困難であった。このことから、違うベクター（pGEM-Tなど）にクローニングした遺伝子配列へ変異を導入後、この変異を含むDNA断片を切り出し、哺乳動物細胞用発現ベクターに再クローニングする必要があった。しかし、KOD One®を用いることにより直接変異を導入することが可能となり、時間、労力の短縮につながった。また、変異の導入効率は調べた数クローン中100%であり、近傍の配列にPCRエラーは確認されなかった。



東洋紡株式会社

ライフサイエンス事業部(大阪)
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL.06-6348-3786 FAX.06-6348-3833
(E-mail) order_lifescience@toyobo.jp

ライフサイエンス事業部(東京)
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号
住友商事京橋ビル
TEL.03-6887-8819 FAX.03-6887-8951
(E-mail) order_lifescience@toyobo.jp

Toyoboテクニカルライン
TEL.06-6348-3888 FAX.06-6348-3833
(9:00~12:00 13:00~17:00[土日祝日、休日を除く])
(E-mail) tech_osaka@toyobo.jp

Toyobo Web Site
[http://lifescience.toyobo.co.jp/]



公式Twitter