

## 『KOD FXを用いた植物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、本酵素では、クールドなサンプルを鋳型に用いた場合においても、高いPCR成功率を示し、確実な結果を期待することができます。

今回は、このクールドサンプルに強い特長を活かして、植物サンプルのライセート（抽出液）から直接ターゲットの増幅を行った実施例をご紹介します。

### 方 法

#### 1. 植物ライセート(抽出液)の調製

植物サンプルからのライセートは、文献[*Biotechniques*, **19**:394 (1994)]に従って、図1に示す方法にて調製しました。本方法では、植物組織は完全に溶解しませんが、緑葉を用いた場合には、溶液が緑色となり、植物由来成分が抽出されていることが確認できます(図2)。但し、抽出液の核酸濃度は吸光度からは測定できませんでした。

植物葉 (3 mm角程度1枚)、精米1粒

↓ ←Buffer A 100  $\mu$ l

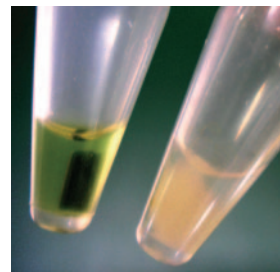
↓ 95°C 10 min.

↓ Vortexにて良く攪拌

上清1  $\mu$ lをPCR反応液に添加

<Buffer A : 100mM Tris-HCl (pH9.5) / 1M KCl / 10mM EDTA>

図1. ワンステップ法による植物ライセートの調製方法



左:イネ葉  
右:精米

図2. ワンステップ法で処理した植物サンプル

#### 2. PCR反応

##### (1) 各種植物サンプルライセートからの直接PCR

PCR反応は、1.で調製したライセートを鋳型に、KOD FXを用いて、以下の条件にて実施しました。また、イネ葉から MagExtractor™ -Plant Genome- (Code No.:NPK-501) を用いて調製した精製DNAも同様にPCRに供しました。

Template: 抽出液 1  $\mu$ l あるいは精製DNA 10 ng / 50  $\mu$ l Reaction  
 Target: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase large subunit (rbcL) の1.3kb  
 Primer seq.: Primer#1 :5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' (トマト&タバコ用)  
 Primer#2 :5'-AAGCAGCAGCTAGTTCGGGCTCCA-3' (トマト&タバコ用)  
 Primer#1 :5'-ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGC-3' (イネ用)  
 Primer#2 :5'-AAGCTGCGGCTAGTTCAGGACTCCA-3' (イネ用)

##### ・反応液組成

Autoclaved, distilled water	10 $\mu$ l
2×PCR buffer for KOD FX	25 $\mu$ l
2mM dNTPs	10 $\mu$ l
10pmol / $\mu$ l Primer #1	1.5 $\mu$ l
10pmol / $\mu$ l Primer #2	1.5 $\mu$ l
ライセートあるいは精製DNA	1 $\mu$ l
KOD FX (1.0U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

##### ・PCRサイクル<sup>\*1</sup>

94°C, 2 min.  
 98°C, 10 sec.  $\leftarrow$   
 68°C, 1.5 min.<sup>\*2</sup>  $\rightarrow$  30 cycles

※1 プライマーのTm値が73°C未満の場合は、3ステップのサイクルをお勧めします。

※2 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を実施しました。

##### (2) タバコ葉ライセートからの直接PCR (Long Target)

次に、本方法とKOD FXを用いて長鎖のターゲットの増幅を試みました。反応液組成は、(1)と同様で、以下のPrimerを用

いました。PCRサイクルは、94℃ 2min.→(98℃ 10sec. 65℃ 30sec. 68℃ 1min./kb)×35cyclesで行いました。

Template: タバコ葉抽出液 1 μl / 50 μl Reaction  
 Target: Nicotiana tabacum ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase / oxygenase large subunit N-methyltransferase (rbcmtT) <U35619.1> の2.2kb及び4.6kb  
 Prime: Primer#1 :5'-TCCCCTTTGCTGACCTGGTAAGATTC-3' (2.2kb)  
 Primer#2 :5'-GATAAAAGCCACCTCTCAAGCCCAAG-3' (2.2kb)  
 Primer#1 :5'-CGGTAAAGCCAGGAATTGTACCAGAAGG-3' (4.6kb)  
 Primer#2 :5'-GGAAGATAATGGTGGCCTCAATCAAAGG-3' (4.6kb)

結果及び考察

(1) 各種植物サンプルライセートからの直接PCR

増幅後、PCR産物を1%アガロースゲルに3 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、トマト、タバコ、イネの葉、および精米の全てのライセートサンプル及び精製DNAから、明瞭な1.3kbの増幅を認めることができました。一方、比較に用いたTaqベースの他社PCR酵素では、精製DNAを用いた場合には増幅がみられましたが、ライセートをサンプルとした場合は全く増幅が認められませんでした。

なお、KOD FXを用いるPCRにおいて、サンプルとしてPCR反応へ添加するライセート量としては、1 μlが最適で、2 μl以上添加すると阻害を受ける傾向がみられました。

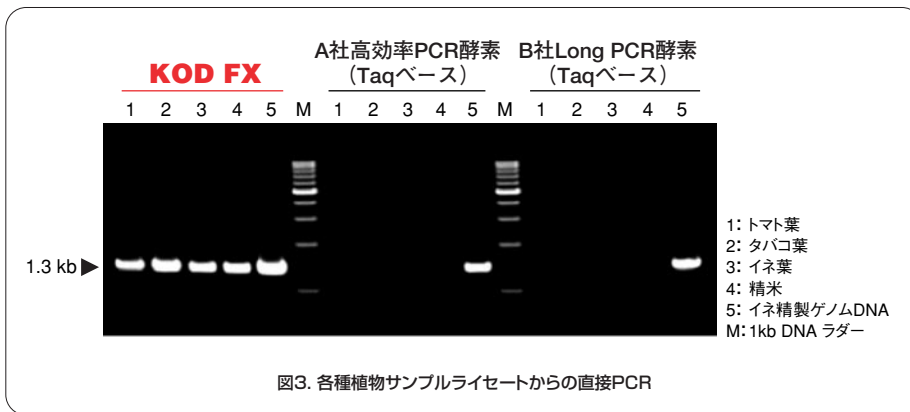


図3. 各種植物サンプルライセートからの直接PCR

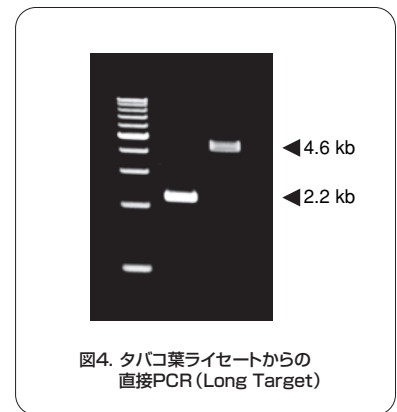


図4. タバコ葉ライセートからの直接PCR (Long Target)

(2) タバコ葉ライセートからの直接PCR (Long Target)

増幅後、PCR産物を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4)。その結果、2.2kb 及び4.6kbの比較的大きなターゲットにおいても明瞭なバンドを得ることができました。

なお、本増幅では、30サイクルでは不十分で、35サイクルが必要でした。増幅効率に優れたKOD FXでは、通常、30サイクルで十分な増幅が得られますが、クールドサンプルを用いた長鎖の増幅で増幅産物が得られない場合は、35~40サイクル程度までサイクル数を増やすことが有効であると考えられました。

まとめ

以上の検討から、クールドサンプルでのPCR増幅に向くKOD FXを用いることで植物サンプルの遺伝子解析が簡便化できることが示されました。

一般的に、植物組織にはポリサッカライドやポリフェノールが多く含まれるため、組織を粉碎した後、CTAB/フェノクロにて処理する等、DNA抽出には大変煩雑なステップが伴います。今回の検討でご紹介した簡易抽出法と、KOD FXを組み合わせることにより、それらの作業を省略することができ、特にサンプル数が多い場合などにおいては、格段の効率化が期待できます。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
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	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