

U P L O A D

T O Y O B O B I O C H E M I C A L S

2008 December

VOL. 92



Quick Taq™ HS DyeMix

→本誌p.1に詳細記事がございます。

Brand-New item

- 1 ホットスタート法対応・色素入り Taq Master Mix
Quick Taq™ HS DyeMix
- 3 100bp DNA Ladder
Loading Quick® 100bp DNA Ladder

CAMPAIGN

- 4 CELL APPLICATIONS, INC.
ヒト皮膚系細胞、頭髪毛乳頭細胞30%OFFキャンペーン

HOT ITEM

- 5 部位特異的変異導入キット
KOD -Plus- Mutagenesis Kit

私にも
できた!

ライフサイエンス実験シリーズ Vol.7

- 6 PCR実戦技術編 (3)

HOT ITEM

- 14 siRNA / shRNA Gene Silencers

TECHNICAL REVIEW

- 15 『KOD FXを用いた植物ライセートからの直接PCR』

みんなの広場

- 17 実験のコツ、失敗・成功談
「ベレットバラバラ法」
- 17 実験川柳特集8

INFORMATION

- 18 BMB2008 バイオテクノロジーセミナーのご案内
- 18 カルナバイオサイエンス社製品お取り扱い中止のご案内



ホットスタート法対応・色素入り Taq Master Mix Quick Taq™ HS DyeMix

NEW

Taqマスターミックス (ホットスタート法対応) です。色素入りで、そのまま電気泳動可能。

Quick Taq™ HS DyeMixは、Taq DNA polymeraseを含む2×マスターミックス (ホットスタート法対応、電気泳動色素入り) です。鋳型DNAとプライマーを入れるだけで直ちにPCRを実施することができ、反応溶液をそのまま電気泳動解析に供することができます。抗Taq抗体がマスターミックスにあらかじめ混合されており、ホットスタート効果により、特異性の高い、高効率な増幅が期待できます。コロニーダイレクトPCR解析などに最適です。

特長1 ▶ 2×プレミックス (色素入り)

- ・2×マスターミックスであり、プライマーを加えるだけで便利にご使用いただけます。色素 (BPB) 入りなので、PCR後にそのままゲルにアプライ可能です。

特長2 ▶ 優れたPCR性能

- ・最適化されたバッファー組成により、従来のTaq DNA polymeraseに比べPCR性能が向上しています。

特長3 ▶ ホットスタートPCR対応

- ・抗Taq DNA polymerase抗体によるホットスタート法を採用しており、高い感度と特異性を示します。

特長4 ▶ 高い保存安定性

- ・凍結融解30回、4℃保存3ヶ月間において安定性を確認しています。

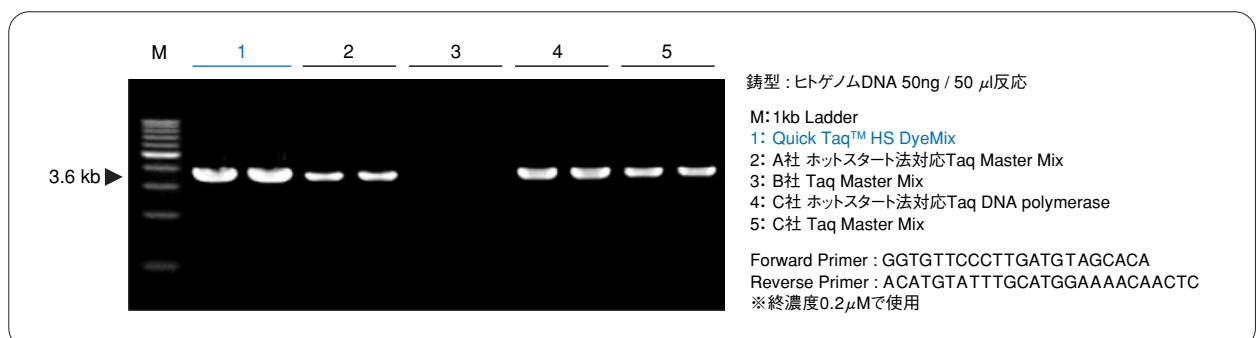
特長5 ▶ コストパフォーマンス良好

- ・安価な価格帯に設定されていることから、気軽に高効率なPCRを行うことができます。



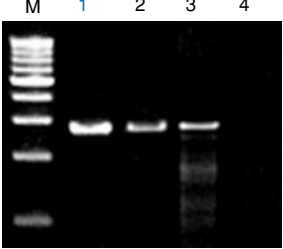
実施例1 ▶ ヒトβ-globin (3.6kb) の増幅

ヒトゲノムDNA (50 ng) を鋳型として、β-globin 3.6 kbをターゲットに増幅を行いました。反応は、それぞれの試薬の至適条件に従って実施しました。その結果、3を除くすべての試薬において、増幅が認められましたが、Quick Taq™ HS DyeMixにて増幅を行ったものが最も増幅量が多く、良好な結果でした。



実施例2 ヒトp53遺伝子 (2.9 kb) の増幅

ヒトゲノムDNA (50 ng) を鋳型として、比較的増幅の難しいとされるヒトp53遺伝子 (2.9 kb) の増幅を実施しました。その結果、Quick Taq™ HS DyeMixを用いた場合、最も高効率、かつ特異性の高い結果を得ることができました。また、ホットスタート法を用いなかった場合 (レーン3および4)、特異性及び感度の低下が見られました (Quick Taq™ HS DyeMixはホットスタート法に対応しています)。



M 1 2 3 4

2.9 kb

鑄型: ヒトゲノムDNA 50ng / 50 μl反応

M: 1kb Ladder
 1: Quick Taq™ HS DyeMix
 2: ホットスタート法対応rTaq DNA polymerase
 3: rTaq DNA polymerase
 4: C社 Taq Master Mix

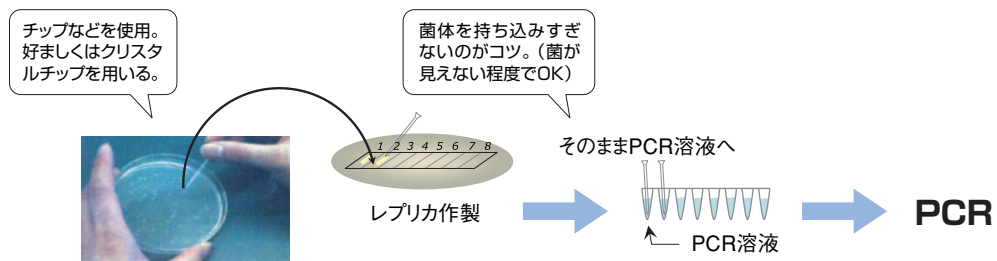
Forward Primer : AATGGATGATTTGATGCTGTCCC
 Reverse Primer : ATAAGAGCTCCCAAGACTTAG
 ※終濃度0.2μMで使用

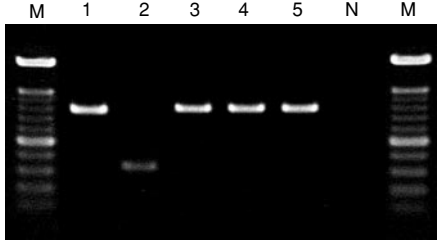
<増幅条件>

94℃ 2 min.
 94℃ 30 sec. ←
 60℃ 30 sec. 40 cycles
 68℃ 3 min.

実施例3 コロニーダイレクトPCRを用いたインサートチェック

500 bpのインサートを有するプラスミドpTA2を形質転換した大腸菌DH5αのコロニーをサンプルとして、ベクター上に設計したプライマーを用いてPCRを行いました。その結果、インサートサイズに応じた明瞭なバンドを得ることができました。本試薬は、コロニーダイレクトPCRにおいても、力を発揮することが分かりました。





M 1 2 3 4 5 N M

800 bp

300 bp

M: 100bp DNA Ladder
 1: コロニー (インサート+)
 2: コロニー (インサート-)
 3: コロニー (インサート+)
 4: コロニー (インサート+)
 5: コロニー (インサート+)
 N: ネガティブコントロール
 M: 100 bp DNA Ladder

Forward Primer : CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
 Reverse Primer : AGCGGATAACAATTTACACAGGAAAC
 ※終濃度0.2μMで使用

<増幅条件>

94℃ 2 min.
 94℃ 30 sec. ←
 62℃ 30 sec. 25 cycles
 68℃ 1 min.

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
Quick Taq™ HS DyeMix	1.25ml×2本 (100回用)*	-20℃	DTM-101	¥9,800

*50 μlで反応した場合の反応回数を記載しています。

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 TARget Clone™	10回用	-20℃	TAK-101	¥12,000
rTaq DNA Polymerase (Mg別添タイプ)	250U×1本	-20℃	TAP-201	¥9,500
ホットスタート用抗Taq抗体 anti-Taq high	100μl×1本	-20℃	TCP-101	¥16,000

100bp DNA Ladder Loading Quick® 100bp DNA Ladder



NEW

■期間:2008年12月1日~2009年2月27日【ご注文分】

ご好評の100bp DNA Ladder がリニューアルして、よりバンドが明瞭になりました。

本製品は、電気泳動用の100bp ラダーマーカーです。色素別添タイプと泳動用色素 (BPB、Orange G) があらかじめ混合された Ready-to-useタイプ (Loading Quick®) から、選択いただけます。

特長1 ▶ 明瞭なバンド

- ・薄くなりがちな100bp、200bpのバンドまで確実に視認できるようになりました。また、全体のバンド強度のバランスを整えることにより、従来品に比べより判別しやすくなりました。

特長2 ▶ DNA濃度の推定が容易

- ・各バンドのDNA量が厳密に調整されているので、バンド強度の比較により、サンプルのDNA量をおおむね推定することが可能です。

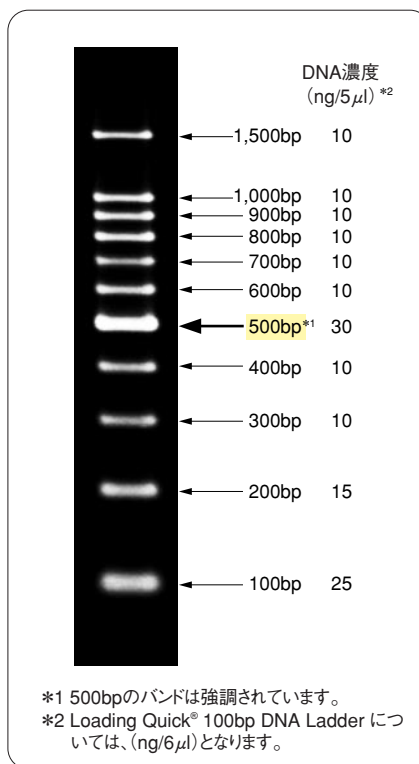
特長3 ▶ 高いコストパフォーマンス

- ・100回用14,000円と大変お買い得です。

特長4 ▶ 色素別添、色素入りから選択可能

- ・通常の色素別添タイプと色素混合タイプ (Loading Quick®) から、選択いただけます。

本リニューアルに伴い、従来品 (Code No.DNA-030X、DNA-030XX5、DNA-130、DNA-130X5) は、終売となります。



品名	包装	保存温度	Code No.	通常価格	キャンペーン価格
100bp DNA Ladder*	100回用×1本	-20℃	DNA-035	¥14,000	¥8,400
	(100回用×1本)×5	-20℃	DNA-035X5	¥56,000	対象外
Loading Quick® 100bp DNA Ladder**	100回用×1本	-20℃	DNA-135	¥14,000	¥8,400
	(100回用×1本)×5	-20℃	DNA-135X5	¥56,000	対象外

*6×Loading Dye (BPB、Orange G) が添付されている色素別添タイプです。

**色素 (BPB、Orange G) があらかじめ混合されている色素混合タイプです。

関連商品

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
200bp DNA Ladder	100回用×1本	-20℃	DNA-031	¥20,000
1kb DNA Ladder	300回用×1本	-20℃	DNA-032	¥22,000
Loading Quick® 50bp DNA Ladder	100回用×1本	-20℃	DNA-133	¥19,000
Loading Quick® 200bp DNA Ladder	100回用×1本	-20℃	DNA-131	¥15,000

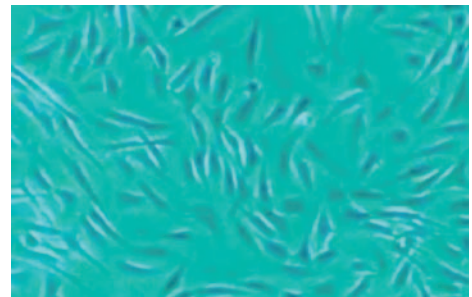
CELL APPLICATIONS, INC. ヒト皮膚系細胞、頭髪毛乳頭細胞 30%OFFキャンペーン

ヒト皮膚系細胞と頭髪毛乳頭細胞、及び培地を対象に30%OFFにてご提供します。

期間：2008年12月1日～2009年2月27日（ご注文分）

CELL APPLICATIONS, INC. は、様々な正常細胞、Total RNA、抗体をご提供しております。今回、キャンペーンとして、ヒト皮膚系細胞、頭髪毛乳頭細胞、及び関連商品を30%OFFにてご提供させていただきます。これらの細胞は、皮膚の発生・分化、皮膚疾患、紫外線の影響、及び発毛・育毛等の実験にご利用いただける初代細胞です。

CELL APPLICATIONS, INC.のWeb Siteがリニューアルされ、見やすくなりました。ぜひご覧ください。 < <http://cellapplications.com/> >



ヒト頭髪毛乳頭細胞

品名	包装	CodeNo.	通常価格	キャンペーン価格
ヒト表皮角化細胞 (HEK) 凍結細胞 adult	1vial	CA10205a	¥88,000	¥61,600
ヒト表皮角化細胞 (HEK) 凍結細胞 fetal	1vial	CA10205f	¥88,000	¥61,600
ヒト表皮角化細胞 (HEK) 凍結細胞 neonatal	1vial	CA10205n	¥72,000	¥50,400
ヒト表皮角化細胞 (HEK) Total Kit adult	1kit	CA102K05a	¥120,000	¥84,000
ヒト表皮角化細胞 (HEK) Total Kit fetal	1kit	CA102K05f	¥120,000	¥84,000
ヒト表皮角化細胞 (HEK) Total Kit neonatal	1kit	CA102K05n	¥104,000	¥72,800
ヒト表皮メラニン細胞 (HEM) 凍結細胞 neonatal	1vial	CA10405n	¥87,000	¥60,900
ヒト表皮メラニン細胞 (HEM) 凍結細胞 neonatal, blackdonor	1vial	CA104B05n	¥94,000	¥65,800
ヒト表皮メラニン細胞 (HEM) Total Kit neonatal	1kit	CA104K05n	¥122,000	¥85,400
ヒト表皮メラニン細胞 (HEM) Total Kit neonatal, blackdonor	1kit	CA104BK05n	¥129,000	¥90,300
ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) 凍結細胞 adult	1vial	CA10605a	¥47,000	¥32,900
ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) 凍結細胞 fetal	1vial	CA10605f	¥85,000	¥59,500
ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) 凍結細胞 neonatal	1vial	CA10605n	¥70,000	¥49,000
ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) Total Kit adult	1kit	CA106K05a	¥83,000	¥58,100
ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) Total Kit fetal	1kit	CA106K05f	¥122,000	¥85,400
ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) Total Kit neonatal	1kit	CA106K05n	¥106,000	¥74,200
ヒト頭髪毛乳頭細胞 (HFDPC) 凍結細胞 adult	1vial	CA60205a	¥137,000	¥95,900
ヒト表皮角化細胞基本培地	500ml	CA130500	¥14,000	¥9,800
ヒト表皮角化細胞増殖培地 (基本培地+添加剤)	500ml	CA131500	¥20,000	¥14,000
ヒト表皮角化細胞カルシウムフリー基本培地	500ml	CA132500	¥14,000	¥9,800
ヒト表皮角化細胞カルシウムフリー増殖培地 (基本培地+添加剤)	500ml	CA133500	¥21,000	¥14,700
ヒト表皮メラニン細胞基本培地	500ml	CA134500	¥14,000	¥9,800
ヒト表皮メラニン細胞増殖培地 (基本培地+添加剤)	500ml	CA135500	¥23,000	¥16,100
ヒト皮膚線維芽細胞基本培地	500ml	CA115500	¥12,000	¥8,400
ヒト皮膚線維芽細胞増殖培地 (基本培地+添加剤)	500ml	CA116500	¥23,000	¥16,100
ヒト頭髪毛乳頭細胞増殖培地 (基本培地+添加剤)	250ml	TMTPGM-250	¥18,000	¥12,600

※1.Total Kitには、各細胞1vial,各細胞用増殖培地、サブカルチャー試薬セット(A) (CA090K)が含まれます。細胞1vialには、 5×10^5 cellsが含まれます。サブカルチャー試薬セット(A)には、ハンクス緩衝液、トリプシン-EDTA溶液、トリプシン中和液が各100ml含まれます。

※2.保存温度は、細胞:液体窒素、培地、サブカルチャー試薬セット(A): -20°C です。TMTPGM-250は、 4°C と -20°C になります。

※3.本細胞は、HIV、HBV、HCV、マイコプラズマ、酵母、真菌陰性が確認されています。

部位特異的変異導入キット

KOD -Plus- Mutagenesis Kit

コンピテントセル
とセットで
さらにお得に!

KOD -Plus- を用いたInverse PCR法に基づく部位特異的変異導入キットです。幅広い変異導入が可能です。

本製品は、KOD -Plus-の高い正確性を活かした、Inverse PCR法に基づく部位特異的変異導入キットです。Inverse PCR法では、プラスミドを鋳型として、逆向きに設定したプライマーを用いてPCRを行い、プラスミド全周の増幅を行います。その際、導入したい変異や挿入配列を付加したプライマーを用いることにより、様々な変異を導入することができます。本製品には、形質転換までに必要な全ての試薬および詳細なプロトコールが含まれています。

特長1 幅広い変異導入に対応

- ・Inverse PCR法の採用により、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の欠失等にも対応可能です。また、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酸点変異ライブラリーの作製 (Saturation Mutagenesis) も可能です。

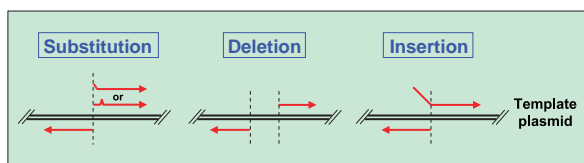


図1. 置換、欠失、及び挿入の各変異導入プライマー設計例

特長2 確実な変異導入

- ・最大95%の変異導入効率が見られます。また、KOD -Plus-の採用、およびPCRサイクル数を最小限に設定するなど条件の最適化により、2nd-site mutation (目的とする変異以外の変異) が入る可能性を最小限にしています。最長約11kbのプラスミドで変異導入を確認済みです。

特長3 簡単プロトコール*

- ・本製品では、PCR産物のSelf-ligationを、KinaseとLigaseを同時に反応させて行います。従って、PCR Primerのリン酸化は不要です。また、形質転換まで3ステップの簡単なプロトコールとなっています (図2)。

*特許出願中

一口メモ

- KOD -Plus-は、KOD DNA polymeraseに、常温で活性を抑える2種類の抗体を加えたホットスタート対応型高正確性PCR用酵素です。Taq DNA polymeraseの約80倍の正確性 (fidelity) を有し、正確性を要するPCRに最適です。
- 制限酵素 *Dpn* IIは、メチル化されたDNAを基質として切断します。通常メチラーゼを発現している大腸菌 (JM109 やDH5 α) から得られたプラスミドは、*Dpn* Iサイトがメチル化されており、本酵素を用いて選択的に分解することができます。

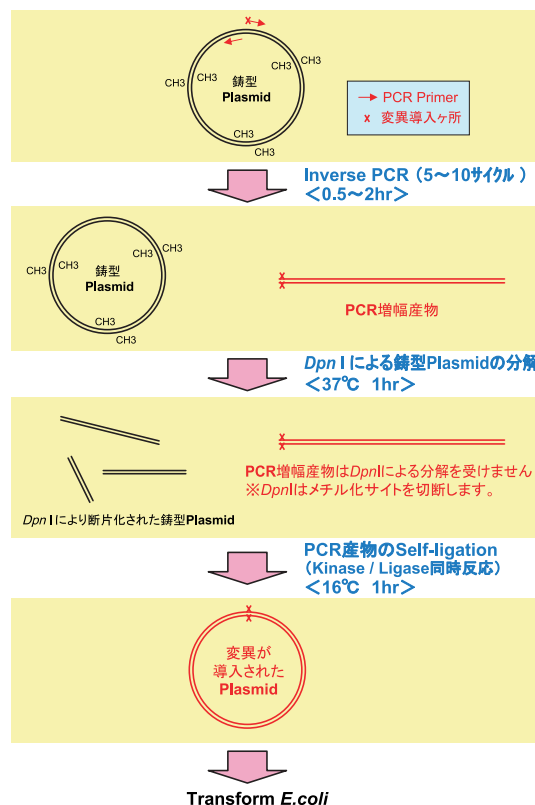


図2. KOD -Plus- Mutagenesis Kitを用いたInverse PCR法による変異導入フロー

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD -Plus- Mutagenesis Kit*	20回用	-20 $^\circ\text{C}$	SMK-101	¥38,000
Competent high DH5 α <small>関連商品</small>	100 μl ×10本	液体窒素、-20 $^\circ\text{C}$	DNA-903	¥17,000
NEW KOD -Plus- Mutagenesis DH5 α Set**	1セット	液体窒素、-20 $^\circ\text{C}$	SMK101/DNA903	¥52,250 5%OFF

* 本製品には、以下の試薬が含まれています。KOD -Plus-, 10x Buffer for iPCR, 2mM dNTPs, *Dpn* I, T4 Polynucleotide Kinase, Ligation high, Control Plasmid, Control Primer #1, Control Primer #2.

**KOD -Plus- Mutagenesis DH5 α Set (Code No.SMK101/DNA903) は、KOD -Plus- Mutagenesis Kit (¥38,000→¥36,100) と Competent high DH5 α (¥17,000→¥16,150) のセット販売です。

LIFE SCIENCE SERIES

ライフサイエンス実験シリーズ Vol.7

PCR実戦技術編 (3)

本シリーズは、市販のノウハウ本や実施例集ではカバーできなかったようなライフサイエンス実験のコツなどについて、弊社研究員の実験ノートなども参考に、生の事例を交えながら紹介させていただいています。前々号から、最もリクエストの多かったPCR関連技術を更に深くご紹介する目的で、「PCR実戦技術編」をお届けしています。

前号では、Sリーダーから難問が出題され、その問題をめぐって、A子さんとライバルのN代さんの間でバトルの予感が漂っていましたが…。

皆さんも、是非、前号で2人の考えた解答を確認してから、本号を読み進めてください。



前号の課題
ダイジェスト

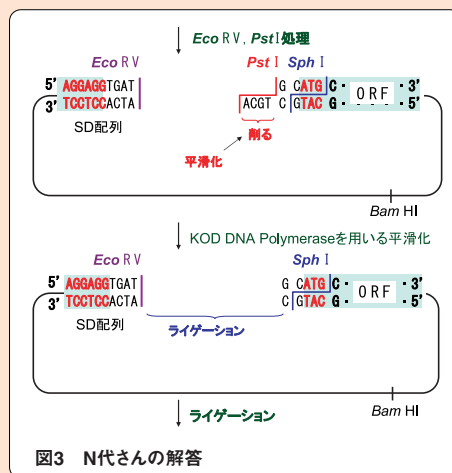
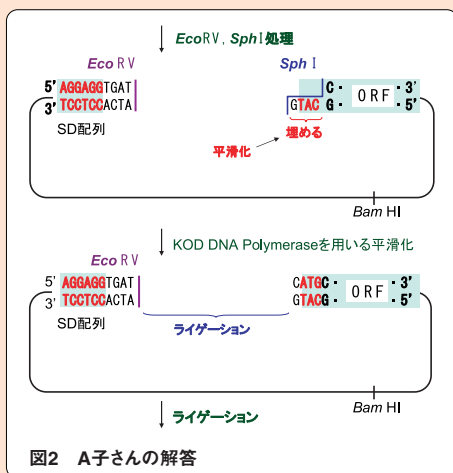
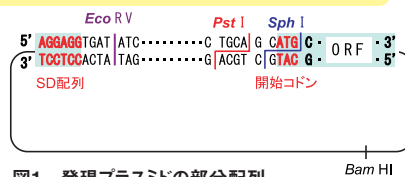
●課題: 次に示す発現ベクターのSD (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンの間にある余分な塩基を、なるべく簡単な方法を用いて取り除き、連結してください。

〈条件〉

- SD配列と開始コドン(ATG)の間の塩基数を5~6塩基にすること。
- 使用できる方法は以下のとおり。
 - ・各制限酵素での切断
 - ・KOD DNA polymerase*を用いる平滑化
 - ・T4 DNA Ligase†による結合
 - ・PCR(任意の場所にプライマーを設計可能)
 - ・T4 Polynucleotide Kinaseを用いるDNAのリン酸化

- 本プラスミド中には、この図に示したEcoRV, PstI, SphI, BamHIの配列はここに示したサイト以外には存在しません。

*5'→3' DNA polymerase活性と
3'→5' Exonuclease活性を有しています。



注意!!

上の二人の解答には間違いが含まれている可能性があります。

今までの
登場人物



Sリーダー
冷静沈着なライフ
サイエンスグルー
プのリーダー



A子さん
今年入社4年目
になる研究員



N代さん
今年入社3年目
になる研究員
(A子さんのライバル)



S本さん
アシスタント

本シリーズは、弊社ウェブサイト(<http://www.toyobo.co.jp/bio/>)の「実験お助けコーナー」でご覧いただけます。

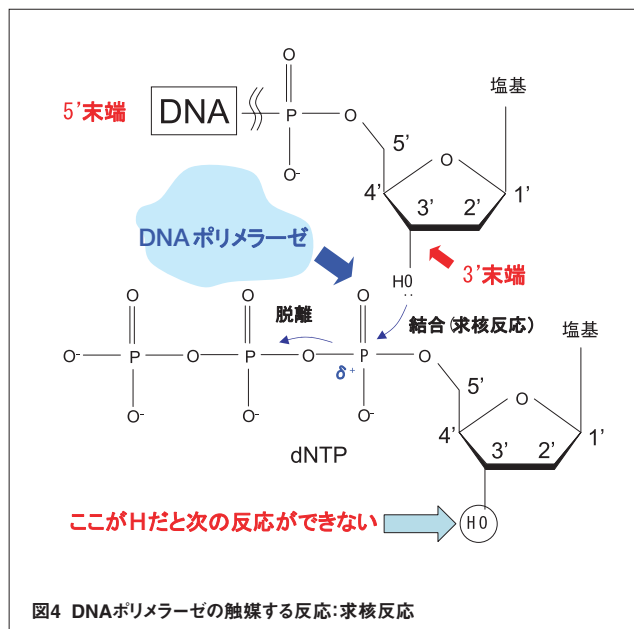
様々な実験に用いられるDNAポリメラーゼですが、意外とその性質をよく理解せずに使われている方もいらっしゃるのではないのでしょうか？今回は、DNAポリメラーゼを中心に、その原理と応用について解説いたします。

1-1 DNA配列の末端によく付いている5'や3'って何の数字？

ポリメラーゼ関連の説明を読んでいると5'や3'などという数字が頻繁にでてきます。この数字に何の意味があるのかと思われた方も多いのではないのでしょうか？

この数字は主に核酸の方向性を示すために付けられています。核酸は、塩基、糖（[デオキシ]リボース、及びリン酸が長く繋がった構造を持ちます。その中で、ヌクレオチド間の結合の方向性に大きく関与しているのは、（デオキシ）リボースであり、その結合を仲介しているのがリン酸基です。RNAに用いられているリボースを例に挙げると、この糖は5単糖（ペントース）であり、それら5つの炭素には1'から5'という番号（塩基にも番号が付いているため、区別するために「'」をつけて表現します）が振られています。リボースは、その2'、3'、5'の位置にOH基を有していると表現されます。DNAに用いられているデオキシリボースでは、2'のOHがH（[デ]無い[オキシ]酸素）になっています。どちらの糖においても3'と5'のOH基が連結に用いられています。

この連結反応を触媒する酵素がDNAポリメラーゼです。図4に、DNAの連結反応を示します。基本的にこの反応は、DNAの3'末端に存在するOH基の酸素の電子が、dNTPの5'OHに結合した α 位のリン酸基を攻撃する、いわゆる「求核反応」です。その反応によって、DNAは5'から3'末端側に向かって伸長します。この反応は原理上、逆へは決して進行することはありません。



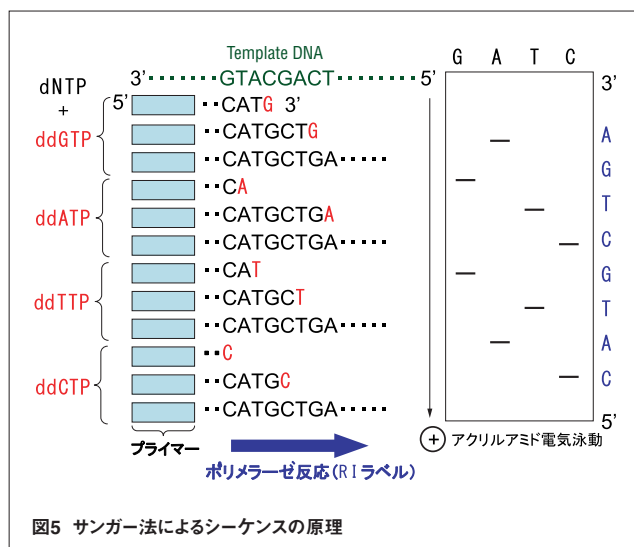
1-2 サンガー法（ジデオキシ法）を用いるシーケンス法はポリメラーゼの性質を利用している

dNTPの3'のOHがHになったddNTP（ジデオキシNTP）は、多くのDNAポリメラーゼによって通常のdNTPと区別無くDNAの3'末端に取り込まれます。しかし、このddNTPが取り込まれたDNAの3'末端はOH基を持たないため、伸長反応はこの段階でストップしてしまいます。よって古くから、ddNTPはDNAポリメラーゼの阻害剤として知られていました。

この阻害剤の利用方法をいち早く見出したのが、Frederic Sangerでした。DNAポリメラーゼの反応溶液に微量のddNTPを添加すると、ddNTPはランダムに取り込まれ、様々な所で伸長の止まった産物が生じます。この反応をそれぞれの塩基種について行い、1 baseの違いが見分けられる電気泳動法を用いて分離し、ラジオアイソトープなど指標にして検出することにより、DNA配列を知ることができます（図5）。これがいわゆるサンガー法（ジデオキシ法）¹⁾の原理であり、この方法は現在一般的に用いられているシーケンサーにも使われています。

現在のシーケンス解析では、4種類の蛍光色素で標識されたddNTPを用いて一度に反応させることができるようになったため、以前のように巨大なゲル板を作る必要もなくなったため、とても便利になりました。また自動で分析した結果がコンピューターに出力されるため、全くこの原理を意識せずにシーケンス解析を行うことが可能です。皆さんはいかがでしょうか？

ところで、Sanger博士は「核酸の塩基配列の決定」に関して、1980年に2度目のノーベル化学賞を受賞しています（1度目は「インスリンの構造研究（ペプチドの配列決定）」1958年）。Sanger博士は1918年生まれですので、有名なシーケンス法の



論文¹⁾が発表された1977年当時、既に60歳に近かったことになります。ちなみに、この論文の筆頭著者はSanger博士です。見習いたいものです。

1) F. Sanger, S. Nicklen and A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-5467 (1977)

1-3 DNAを削る活性いろいろ

通常DNAポリメラーゼには、DNAを末端から削る活性を有しているものが多く存在します。この削る活性（エキソヌクレアーゼ活性）は5'→3'の活性と3'→5'の活性の2種類が知られています。これらの活性のうち、5'→3'活性はDNA複製時のラギング鎖の合成に用いられた岡崎フラグメントなどのRNAプライマーを分解する活性として、3'→5'活性はDNA合成時の塩基の取り込みエラーの修復に関わる活性として進化してきたものと考えられています。

これらの原理はDNA合成の機構（図4）を考えると良く理解できます。例えば、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性によって削られ

1-4 制限酵素消化末端の平滑化

3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを用いて制限酵素切断末端の平滑化が可能です。この用途には従来、T4 DNA polymeraseを用いることが多かったのですが、KOD DNA polymeraseも強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有しており、効率よくDNA末端を平滑化することができるため、最近頻繁に用いられるようになりました。

平滑化には、図6に示すようにポリメラーゼ活性と3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が関与します。しかしここで、「では、平滑化された後の末端は3'→5'エキソヌクレアーゼ活性で削られないの?」という疑問が湧き上がってくるかも知れません。確かにその通りで、平滑化された後も多少ですが末端は削られているようです。ただし、dNTPが存在する限りにおいてポリメラーゼ活性と平衡状態が成立しているため、それほど大きく削られることはなく、ほとんどの末端は平均して平滑化されていると考えられます。

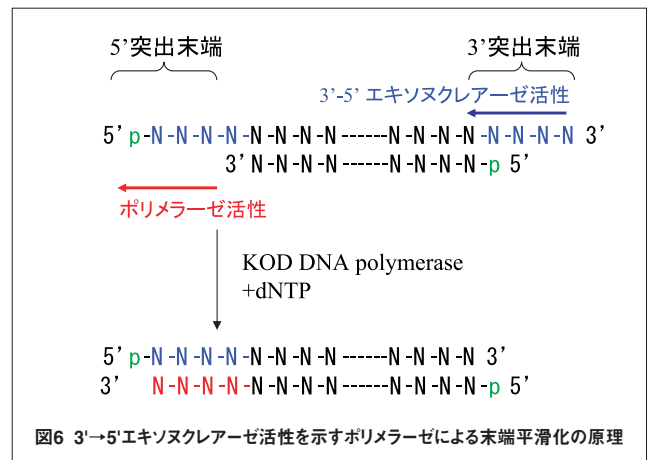
逆に、dNTPが存在しない場合は、大きく末端が削られるということになりますので注意が必要です。ですから、T4やKOD DNA polymeraseを用いて末端平滑化を行う場合、dNTPsを最初に入れることを忘れないようにしなくてはなりません。時々、3'突出部分を削るだけなのでdNTPは入れなくても良いのでは

た部分は、ポリメラーゼ活性によって埋めることができませんので、細かい修復には使えない活性であるといえます。

5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するPCR酵素としてはTaq DNA polymeraseなどがあります。Taq DNA polymeraseのこの活性は、リアルタイムPCRで用いられるTaqMan®プローブを分解する用途などに応用されています。一方、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するPCR酵素としてはKOD DNA polymeraseなどがあり、この活性のおかげでこの酵素はTaqの数十倍という高い正確性を発揮することが可能になっています。

ないかなどと思いがちですので、気をつけてください。

また、制限酵素処理した5'末端にはリン酸基が残っていますが、時々、このリン酸基がポリメラーゼを用いる平滑化によってどのようになるのか心配される方がいるようです。図6を見ていただくと一目瞭然ですが、5'のリン酸基は全く影響を受けませんので、ご安心ください。



1-5 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の無いポリメラーゼでは?

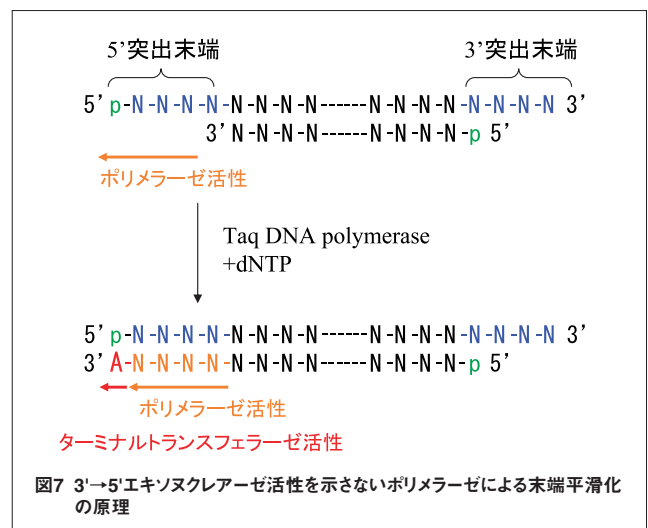
1-4に示したように、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼによってDNA末端を平滑化することができます。

それなら、5'突出末端を埋めるだけであれば、「Taq DNA polymeraseなどの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の無い酵素も使用できるのでは?」と思われる方もいらっしゃるかも知れません。しかし、そうまわはいきません。多くのDNAポリメラーゼはターミナルトランスフェラーゼ活性を有しているため、3'末端に1塩基（多くの場合アデニン）の付加が起こってしまいます。この活性を逆手に取ったのが、いわゆるTACローニング法です。

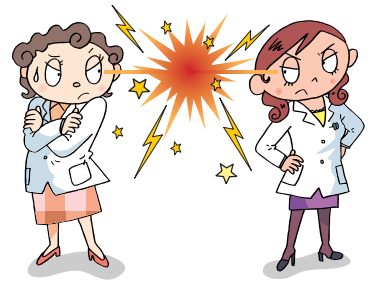
このターミナルトランスフェラーゼ活性は、当然、KOD DNA polymeraseなどにも存在するのですが、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性によって平滑化されるため、見かけ上は、この活性が無いようにみえます。

さらに、Taqなどの酵素は5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有していますが、この活性はそれほど高くないため、大きな問題とはならないようです。しかし、シーケンス解析などを行う際には、

ノイズの原因となるため、一般的にこの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失させた酵素が用いられているようです。



A子さんとN代さんはT社バイオ研究所のライフサイエンス試薬開発グループの연구원です。先ほどからなにやら、Sリーダーの前で火花を散らしているようです。実は、つい先ほど2人に問題が出され、その解答がSリーダーに提出されたところなのです(表紙参照)。



2-1 A子さんの落とし穴



2人の解答を見終わったSリーダーは、まずA子さんに向かって、DNA鎖の伸長反応を化学式で書いてみるよう指示しました。最初から自信がなかったのかAさんはビクビクしているようです。そして、反応式を描いていたAさんは自分のミスにハタと気づきました(図4参照)。DNA鎖が3'側から5'側へ向かって伸長することはまずありません。よって、A子さんのような実験(図2)を行うと、逆に頭の部分が削られてしまうことになります。

Aさんは、いつもDNAの方向性を考えると頭が混乱してしまいます。しかし、今回のように化学反応を頭の中で考えることで方向性について理解しやすくなることに気づきました。

隣で、N代さんは涼しい顔でやり取りをしています。

2-2 N代さんの落とし穴

次はN代さんの番です。N代さんの平滑化の考え方には特に問題は無いようです(図3)。

しかし、Sリーダーからは、「この前の失敗の反省が生かされていないのでは?」という言葉が投げかけられました。前回、N代さんは、考え方は正しかったのですが、クローニングしたORF中に致命的な制限酵素サイトが含まれていたのです。クローニングされた後の断片の配列を確認しなかったN代さんのケアレスミスでした。

その時、「もしかして、まさか!…」という思いがN代さんの脳裏をかすめました。そして、恐る恐る出来上がった配列を確認してみました。

そして気づきました。あろうことか、SD配列の直下にライゲーションによって予期せぬ開始コドン(ATG)ができてはなりません! 確かに、その下流には今回のORFに由来する開始コドンはありますが、SD配列直下の開始コドンの方が優先的に用いられ、フレームのずれたタンパク質が主にできてしまうことになります(図8)。

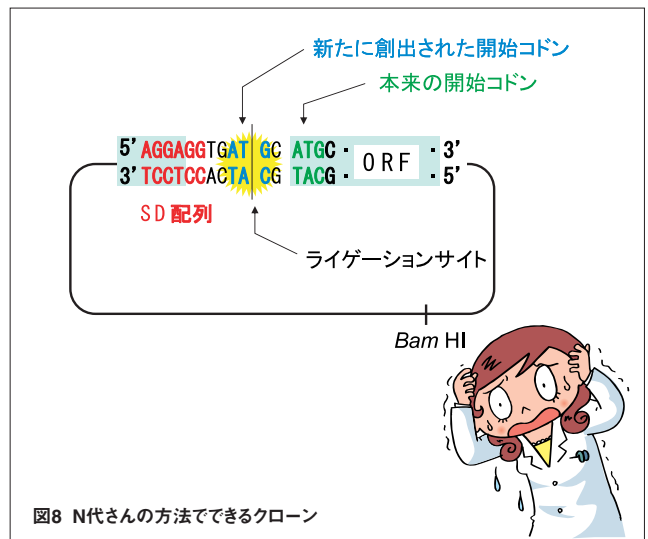


図8 N代さんの方法でできるクローン

ワンポイントアドバイス ①

今回の例では、思わぬところに開始コドンが生じてしまうというミスでしたが、その他にも気づいてみたら思わぬサイトが生じてしまっていたという話もよく聞きます。以下に、ありがちなミスを列举します。

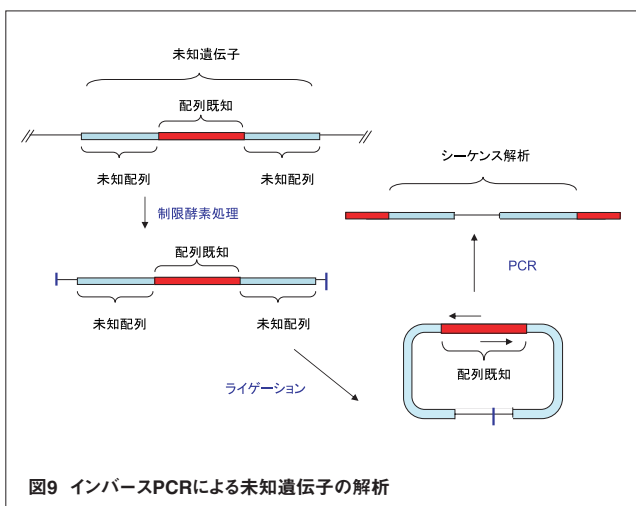
- 1 $\dots AT + G \dots ATG \dots (ORF) \dots$ 予期せぬ開始コドンの創出
ライゲーション 本当の開始コドン
- 2 $\dots ORF \dots + \dots (\text{タグ配列など}) \dots$ 終止コドン忘れ(N末端の場合、開始コドンを忘れることもあります)
終止コドンを除いたORFのC末端
- 3 $\dots ORF \dots + \text{リンカー配列} \dots (\text{タグ配列など})$
リンカー配列中、接合部での予期せぬ配列の創出
(1) システインなどの特殊アミノの挿入
(2) プロテアーゼ切断配列、リン酸化配列、糖鎖付加配列などの創出

①は今回のN代さんの失敗、②はC末端にタグなどを付加した場合に起きがちな失敗、③は様々な予期せぬ機能を持ったサイトができてしまうという失敗です。この③は、タンパク質にリンカーを介してタグ配列を付加するような場合には特に注意が必要です。システインサイトができて、発現させたタンパク質が2量体化したという笑い話などもあるようですので、ご注意ください!

2-3 種明かし

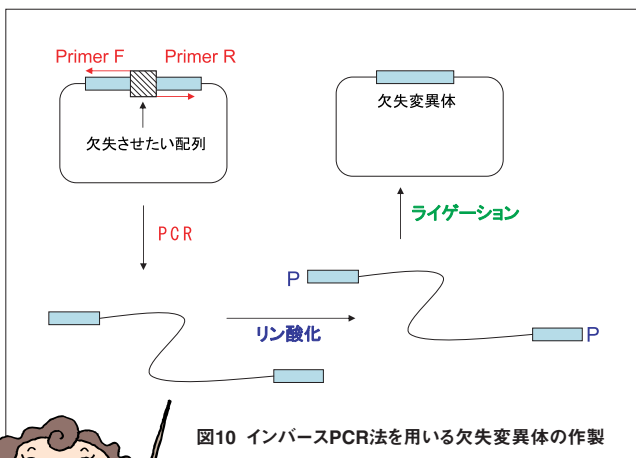
さて、今回の解析例ですが、どのようなものだったのでしょうか？ 以下、リーダーの示した一例です。

最も簡単な方法の一つはインバースPCRを用いる方法です。インバースPCRとは本来図9に示すように、部分配列しか分かっていないようなDNAの周辺配列を解析する方法の一つです。具体的には、環状DNAの一領域から外に向かってプライマーを設計し、環状化したDNA全体を増幅するのが特徴です。そのPCR産物を解析することで遺伝子全体の配列が分かるという仕組みです。



この方法の、環状化DNAから先の工程を応用することによって、変異導入実験を容易に行うことが可能なのです。以下、インバースPCR法を用いるデリベーション mutant (欠失変異体) の作製方法について説明します。

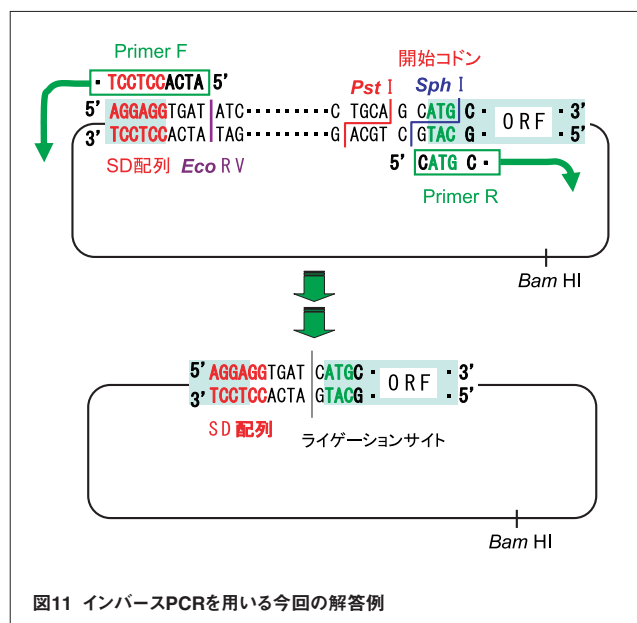
まず、図10に示すように、プラスミド上の欠失させたい配列を挟んで背中合わせにプライマーを設計します。その後、KOD-Plus-(Code No. KOD-201)などの高正確性PCR酵素を用い



てプラスミド全体を増幅します。その後、増幅産物をリン酸化した後に(最初にプライマーをリン酸化しておくことも可能)、ライゲーション反応(環状化)を行い、その環状化したプラスミドDNAを用いて大腸菌を形質転換します。この方法を用いると、比較的簡単に欠失変異体を作製することができます。ポイントは、高正確性PCR酵素を用いることです。でないと、当然予期せぬ変異(PCRエラー)が導入されますし、増幅末端にAが付加されるため、環状化させることができません。

ところで、インバースPCRはかなり単純な方法なのですが、様々な試薬を用いる必要があるため、弊社ではインバースPCR法を用いる部位特異的変異導入キット『KOD-Plus-Mutagenesis Kit (Code No. SMK-101)』を開発しました。このキットには、図10にはない、鑄型プラスミドを消去する仕組みなども組み込まれているため、簡便に変異導入実験を行うことができます。この方法については、次号で詳しく説明する予定ですが、この方法は配列置換や配列挿入などにおいても力を発揮する方法です。

図11にインバースPCR法を用いる今回の解答例を示します。方法は、欠損させたい領域を挟んで背中合わせにプライマーを



設計し、図10のように増幅した後、再環状化します。今回の場合、SD配列と開始コドンの間を5~6塩基にするということでしたので、図11のPrimer FとRに示すようなプライマーを設計すると良いと考えられます。この場合も、接合部に開始コドンができないように気をつけてください。

プライマーの設計法は、通常のPCRプライマーの設計方法に従えば問題ありません。注意点としては、ベクターの大きさによってはPCR効率が低くなってしまいます。ですから、あまりにも大きなベクターを用いなくてはならないときは、まずは目的遺伝子を小さなベクターにサブクローニングしておいて、変異導入を行った後に、大きなベクターに移し変えるような対策が必要な場合もできます。

(⇒ 配列置換と挿入については、次号にてご紹介いたします)



KOD FXは、難しい配列のPCRや、クールドサンプルからのPCRなどにおいて力を発揮する高成功率PCR酵素です。

先月は、血液を直接サンプルとして用いるPCR法ご紹介しました。そこで今回は、最近、トランスジェニックマウスなどの解析で頻繁に行われるマウステールをサンプルとしたPCRについて検討を行いました。この方法を用いることによって、煩雑なDNAの精製なしで、高効率にマウステールからのPCRが可能になります。また今回、増幅産物の制限酵素処理についても検討を行いました。

●マウステールの前処理方法

アルカリ溶解法

① マウステール (約3mm) / マイクロチューブへ

② 50 mM NaOH 180 μ l添加
Vortexにて良く攪拌

③ 95 $^{\circ}$ C \cdot 10 min.
1M Tris-HCl (pH8.0) 20 μ l添加
Vortexにて良く攪拌
遠心 (12,000 rpm, 10 min.)

④ 上清0.5~2 μ lをPCR反応液に添加
(マウステールは完全には溶解しません)

※熱アルカリ溶液の取り扱いに十分ご注意ください。

図12 アルカリ溶解法フロー

●結果

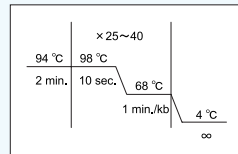
従来、マウステールを用いる遺伝子解析では、Proteinase K処理、及びエタノール沈殿などを用いて精製したDNAを用いることが多く、サンプルの調製に大変な時間を要していました。しかし、今回の検討によって、KOD FXを用いることでアルカリ溶解法などの簡便な方法で調製したクールドなサンプルを用いても効率よく増幅できることが示されました。また、本方法によって増幅したPCR産物は、少なくとも今回試した制限酵素においては精製なしでそのまま制限酵素によって切断可能であることが分かりました。

KOD FXは、夾雑物による阻害に大変強いという特性を有しており、今回の例以外に、植物ライセートや酵母などのサンプルにおいても良好な増幅結果が得られています。

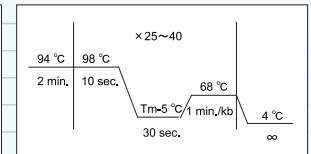
【プロトコル#1】 KOD FXの基本反応条件

試薬	添加量(μ l)	終濃度
2 \times PCR buffer for KOD FX	25	1 \times
2mM dNTPs	10	0.4 mM each
10 μ mol/ μ l Primer #1	1.5	0.3 μ M
10 μ mol/ μ l Primer #2	1.5	0.3 μ M
Template DNA	X	Genomic DNA : ~200 ng/50 μ l Plasmid DNA : ~50 ng/50 μ l cDNA : ~200 ng (RNA相当量)/50 μ l クールドサンプル : ~2 μ l
PCR grade water	Y	
KOD FX (1.0 U/ μ l)	1	1.0 U / 50 μ l
Total	50 (μ l)	

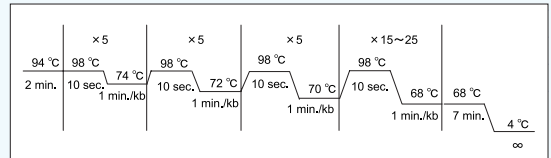
2ステップサイクル



3ステップサイクル



ステップダウンサイクル



※プライマーのTm値が73 $^{\circ}$ C未満の場合は、3ステップサイクルで行います。

【PCR、制限酵素切断条件】

Primer F :5'-CCACAGAATCCAAGTCGGAAGTCTTG-3' (26 mer)
Primer R :5'-GTAGCAGTGGTGGTATTATACATGGTG-3' (27 mer)
ターゲット :Mouse membrane glycoprotein (Thy-1) gene (M10246) (約2.6kb)

上記プライマーを用い、2ステップサイクル(伸長時間2.5min、30サイクル、サンプル0.5 μ l使用)にてPCRを実施しました。また、増幅された溶液(未精製)10 μ lに様々な制限酵素を1 μ l (約10 U)添加し、37 $^{\circ}$ C、1時間の条件で切断を行いました。

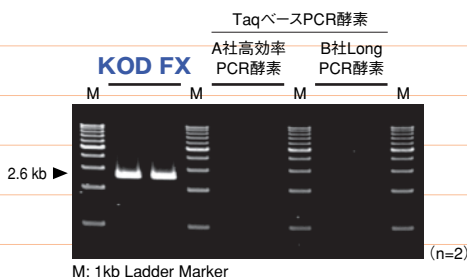
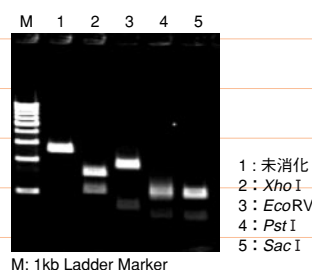


図13 マウステールライセートを用いたPCRの結果



【PCR産物(未精製の)制限酵素処理】

PCR産物 10 μ l
制限酵素 1 μ l (約10 U)
Total 11 μ l \Rightarrow 37 $^{\circ}$ C、60 min

- 1 : 未消化
- 2 : Xho I
- 3 : EcoRV
- 4 : Pst I
- 5 : Sac I

図14 PCR産物の制限酵素消化結果

2-4 次なるSリーダーからの課題

それにしても、今回の課題も2人にとってかなり勉強になったようです。今まであまり意識せずに行ってきた実験も、今回のことで原理を考えてから実行するようになるはずですよ。と、そこへSリーダーから次なる課題のメールが届いたようです。

●大腸菌のDHFR (ジヒドロ葉酸還元酵素) を発現するベクターがあります。そのDHFRのN末端にタグ配列を付加するにはどのようなプライマーを設計すれば良いですか？

- 〈条件〉
- インバースPCR法を用いること。
 - タグのアミノ酸配列は以下のとおり。
Leu-Ile-Arg-Arg-Ile (L-I-R-R-I)
タグは開始コドンの隣りに挿入すること。
 - 発現は大腸菌で行います。



図15 DHFR発現ベクター

この課題を見て、A子さんは、インバースPCR法の原理を忠実に頭の中で再現しつつ、プライマーを思い浮かべているようです。一方、N代さんは、タグのアミノ酸配列を、真剣に見つめています。

悩んだ結果、A子さんは、図16のようなプライマーを設計しました。タグの部分は、コドン表を眺めつつ適当に対応する配列を入れたようです。一方、N代さんはコドン表と何やらインターネットの画面をにらみながら、タグのアミノ酸配列に相当する部分の配列を念りに決定しているようです。結局、N代さんは図17のようなプライマーを設計しました。N代さんのプライマーはA子さんのプライマーとは何やら少し異なるコンセプトで設計されているようです。

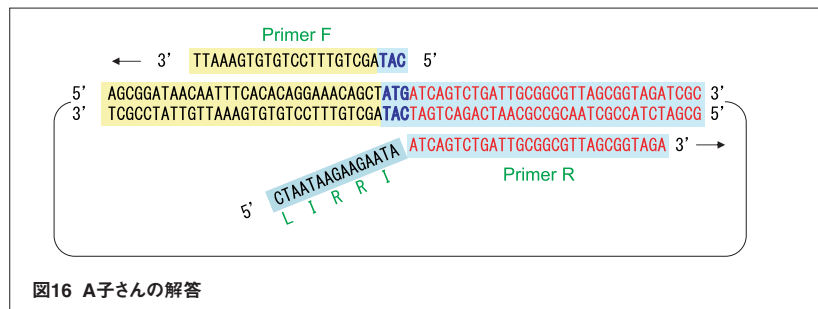


図16 A子さんの解答

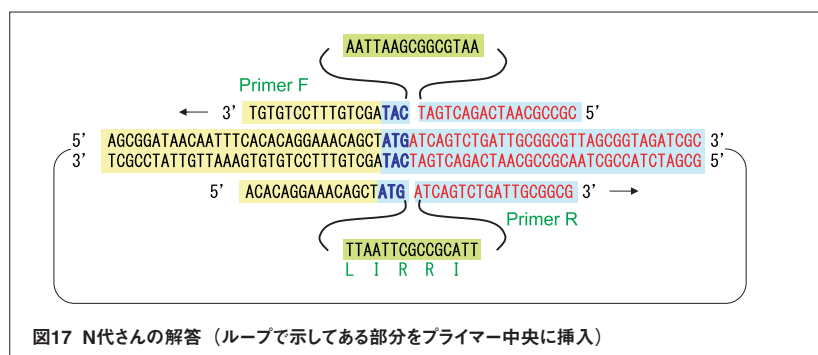
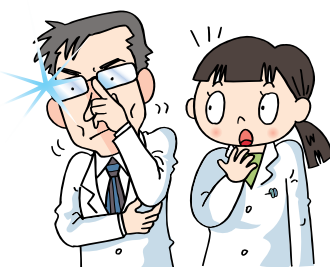


図17 N代さんの解答 (ループで示してある部分をプライマー中央に挿入)

2人の解答を見た瞬間、またしてもSリーダーのメガネが突然ざらりと輝きました。その横で、アシスタントのS本さんはなにやら胸騒ぎがしています。「もしかして…また思わぬ罠が仕掛けてあるのではないかと。さて、皆さんならば、どのようなプライマーを設計しますか？

研究所の周りは、既に晩秋から初冬の気配が漂い始めています。では、次回お会いしましょう。



みなさんも2人の解答が正しいかどうかを、吟味してみてください。【注意:2人の解答には間違いが含まれている可能性がありますので、上の図を実験の参考にはしないでください。】

2人の解答の解説は、次号「PCR実戦技術編(4)」でお届けする予定です。

次回、どうぞ期待!!

Q & A

A子さん

KOD FXでクルードサンプルを鋳型に用いる場合、何かコツや注意点はありますか？

KOD FXは、クルードサンプルに対し高い耐性を示しますが、増幅が見られない場合はサンプル量を少なくする方向で検討します。また、2ステップサイクルよりも3ステップサイクルの方が安定した結果が得られる場合があります。

また、サイクル数は通常30サイクルで十分増幅が得られますが、ターゲット長やサンプルによっては、増幅が低下する場合があります。このような場合には、35~40サイクル程度までサイクル数を増やすことで良好な結果が得られることがあります。

さらに、今回ご紹介したようにクルードサンプルを直接PCR反応に持ち込む場合、Proteinase KやSDSなどが含まれる処理液を用いないように注意してください。これらの成分の活性が残っていると、PCR酵素などが不活性化されてしまいます。

SJ-ダー

A子さん

インバースPCRを用いる変異導入に向くPCR酵素はどのようなものですか？

この方法に必要なPCR酵素の特性として、①高正確であること、②平滑末端産物を生成すること、及び③高効率であることを挙げるができます。この観点から最も適している酵素として、KOD -Plus- (Code No. KOD-201) やKOD -Plus- Ver.2 (Code No. KOD-211) を挙げるができます。

「KOD -Plus- Mutagenesis (Code No. SMK-101)」は、KOD -Plus-を用いる部位特異的変異導入キットで、変異導入に必要な試薬がすべて添付してあるため、とても簡単に変異導入実験を行うことができます。

また、KOD FX (Code No. KFX-101)もKOD -Plus-に比べて正確性は低い(KOD -Plus-及びKOD -Plus-Ver.2はTaq DNA polymeraseの約80倍、KOD FXは約10倍)ですが、上記すべての条件は満たしていますので、本用途に用いることが可能です。

SJ-ダー

A子さん

KOD FXをマルチプレックスPCRに応用したいのですが、コツはありますか？

プライマーを等モルで添加した場合、どちらかの増幅産物が増幅しすぎてしまうことがあります。その場合、添加するプライマー量の比を検討してください。一般的には、増幅の悪かった方のプライマー量を1.5倍程度に増やし、サイクル数を少なくする方向で検討することで良好な結果が得られることがあります。

SJ-ダー



関連製品紹介

品名	用途	包装	Code No.	価格
KOD -Plus-	高正確PCR	200U×1本	KOD-201	¥30,000
KOD -Plus- Ver.2	" (さらに高効率)	200U×1本	KOD-211	¥32,000
KOD FX	高成功率PCR	200U×1本	KFX-101	¥35,000
KOD Dash	インサートチェック	250U×1本	LDP-101	¥25,000
Blend Taq®	正確性の不要なPCR全般	250U×1本	BTQ-101	¥19,000
Blend Taq® -Plus-	" (Hot start可能)	250U×1本	BTQ-201	¥21,000
ReverTra Ace -α-®	高効率逆転写	100回用	FSK-101	¥53,000
Ligation high Ver.2	高効率Ligation	750µl×1本	LGK-201	¥22,000
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-	DNA断片の精製	200回用	NPK-601	¥28,000
MagExtractor™ -mRNA-	Poly (A) ⁺ RNAの精製	5回用	NPK-801F	¥43,000
T4 Polynucleotide kinase	DNAのリン酸化	1,500U×1本	PNK-111	¥15,000
rATP	リン酸化の基質	50µmoles/0.5ml	ATP-111	¥15,000
<i>E. coli</i> Alkaline Phosphatase	脱リン酸化	100U×1本	BAP-111	¥15,000
MagExtractor™ -Plasmid-	プラスミドの精製	500回用	NPK-301	¥33,000
<i>Magical Trapper</i>	磁性分離 (磁性スタンド)	1個	MGs-101	¥38,000
TArget Clone™	TA Cloning vector	10回用	TAK-101	¥12,000
TArget Clone™ -Plus-	" (KOD専用)	10回用	TAK-201	¥16,000
Competent high JM109	高効率形質転換	0.1ml×10本	DNA-900	¥17,000
Competent high DH5α	高効率形質転換	0.1ml×10本	DNA-903	¥17,000
Competent Quick DH5α	サブクロニング用	0.1ml×20本	DNA-913	¥29,000

siRNA / shRNA Gene Silencers

本製品はすでに販売を中止しております。

ヒト、マウスそれぞれ2万種類以上そろえております。この度、shRNAが加わりました。

Santa Cruz Biotechnology 社では、ヒト、マウスそれぞれ2万種類以上のプリメイドsiRNA (small interfering RNA) をご提供しております。これらは推定されている、タンパク質をコードする遺伝子の約99%に相当します。また、ターゲット遺伝子発現抑制を確認するための抗体、RT-PCR Primer Set、トランスフェクション試薬、コントロールsiRNAなど、実験をサポートする試薬類も取りそろえております。

更に、この度、shRNA (short hairpin RNA) の販売を開始いたしました。ぜひ、遺伝子抑制実験にSanta Cruz Biotechnology 社のsiRNA、及びshRNAをお役立てください。

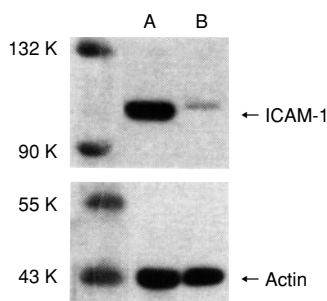


図1. ICAM-1 siRNA (m) (Code No.SASC29355) 実施例

<ウェスタンブロット法にて解析>

Lane A : トランスフェクションを行っていないRAW 264.7細胞
Lane B : ICAM-1 siRNA (m) をトランスフェクションしたRAW 264.7細胞
抗ICAM-1抗体 (SASC1511), 抗Actin 抗体 (SASC1616) で検出

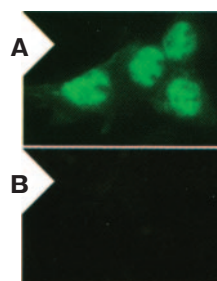


図2. p53 siRNA (h) (Code No. SASC29435) 実施例

<蛍光免疫法にて解析>

A : トランスフェクションを行っていないHeLa細胞
B : p53 siRNA (h) をトランスフェクションしたHeLa細胞
抗p53 抗体 (SASC6243) で検出

●Santa Cruz Biotechnology社製品検索コーナーにて様々な検索ができるようになりました。

- 1 弊社ウェブサイト (www.toyo.co.jp/bio)
- 2 「Santa Cruz Biotechnology」 パナー
- 3 製品検索

製品名、カタログ番号だけでなく、遺伝子名、NCBI GENE ID などでも検索可能です。是非、お試しください。

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
siRNA Gene Silencer [10 μ M]	50~100回用	-20 $^{\circ}$ C	各種	¥47,000
Control siRNA-A [10 μ M]	10~20回用	-20 $^{\circ}$ C	SASC37007	¥14,000
Control siRNA (Fluorescein Conjugate)-A [10 μ M]	10~20回用	-20 $^{\circ}$ C	SASC36869	¥20,000
siRNA Transfection Reagent	0.3ml	4 $^{\circ}$ C	SASC29528	¥26,000
siRNA Dilution Buffer	1.5ml	4 $^{\circ}$ C	SASC29527	¥1,000
siRNA Transfection Medium	20ml	4 $^{\circ}$ C	SASC36868	¥2,000
shRNA Plasmid	20 μ g	-20 $^{\circ}$ C	各種	¥97,000
Control shRNA Plasmid-A	20 μ g	-20 $^{\circ}$ C	SASC108060	¥16,000
shRNA Plasmid Transfection Reagent	0.2ml	4 $^{\circ}$ C	SASC108061	¥14,000
shRNA Plasmid Transfection Medium	20ml	4 $^{\circ}$ C	SASC108062	¥2,000
Control Antibody [200 μ g/ml]*	1ml*	4 $^{\circ}$ C (一部-20 $^{\circ}$ C)	各種	¥49,000*
RT-PCR Primer [10 μ M]	20 μ l	-20 $^{\circ}$ C	各種	¥5,000

*一部例外がございます。カタログ、Web siteにてご確認くださいませよう、お願いします。

『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 μ l

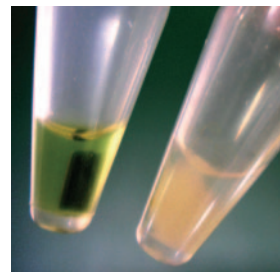
↓ 95°C 10 min.

↓ Vortexにて良く攪拌

上清1 μ 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 μ l あるいは精製DNA 10 ng / 50 μ 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 μ l
2×PCR buffer for KOD FX	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
ライセートあるいは精製DNA	1 μ l
KOD FX (1.0U/ μ l)	1 μ l
Total	50 μ l

・PCRサイクル^{*1}

94°C, 2 min.
 98°C, 10 sec. \leftarrow
 68°C, 1.5 min.^{*2} \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。

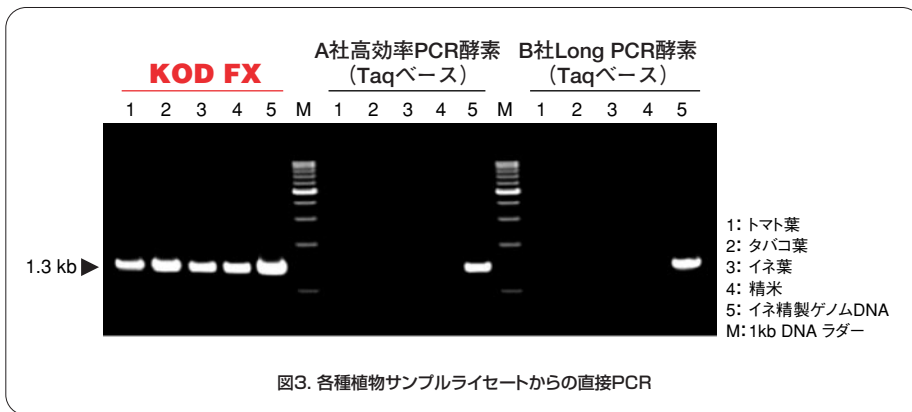


図3. 各種植物サンプルライセートからの直接PCR

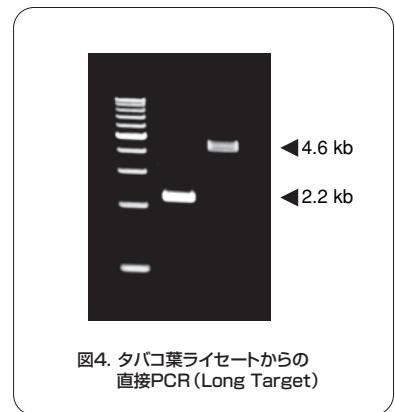


図4. タバコ葉ライセートからの直接PCR (Long Target)

(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

実験のコツ、失敗・成功談



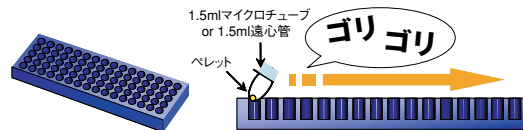
皆様の日々の研究の中で、「こうやったら実験がうまくいった。皆この方法を使えばいいのに…」とか、逆に「あの方法には、実は○○○という欠点が潜んでいる。他の人が失敗しないように、伝えたいのだけれど…」といった思いを他人と共有したいという潜在的な要望をお持ちの方は意外と多くいらっしゃるのではないかと思います。このコーナーは、そのような皆様の事例を掲載させていただくことで、今まで共有できなかった情報を共有することを目的とします。

「ペレットバラバラ法」 — ベンネーム希望: ぼんぼんさん

1.5mLマイクロチューブで細胞やらタンパクやらを回収する手順の中で「崩れにくいペレット」にお目にかかることは多々あることと思います。ピペティングをするのが面倒なとき、ペレットが小さくてピペティングではロスしそうとき、ポルテックスしてもほぐれないとき。この方法は、そんなときに役にたつかも知れません。

準備する物は、チューブ立て(ただし、アルミラックのようなものではなく、一般的に売られているプラスチック製でカラフルなチューブが埋まるような形のチューブ立てです: 図参照)。それと、崩したいペレットの入ったチューブです。方法はいたって簡単! まず、崩したいペレットに各々の実験系で使うbufferを加えて蓋をパチン。しっかり閉まっていることを確認し、洗濯板のイメージでとんがった方を下にしてピペット立ての上で「ゴリゴリ」と動かすだけ! 左から右へ横一回で(5×16のチューブ立ての場合)大抵ほぐれます。ポコポコしたもので色々試してみましたが、チューブ立てが一番きれいに崩れました。「ゴリゴリ」するとき力を入れすぎるとチューブに傷がつくので要注意。それほど押し付けなくてもOKです。

今まで、試したものは色々あります。フローサイトメトリーに伴う細胞の懸濁。ミニプレップのとき、大腸菌をバッファーに懸濁するときにも大活躍しています。ピペティングだとエアロゾルでピペットマンが汚染されそうですが、これならその心配はありません。しっかり崩れてくれますし、サンプルが多いときにはチップの節約になります。少ない細胞サンプルから核タンパクを抽出する際にも使えます。細胞が少ないときはピペティングでもロスしそうで怖いので、ペレットにはなるべく触らずに崩せるとロスがありません。マイクロチューブだけではなく、15mL遠沈管でも応用できます。オートピペッターで混ぜるには量が少なすぎるし、ピペットマンだと奥まで届き難いとき、同じようにゴリゴリするとペレットがきれいに崩れてくれますよ。一度お試しあれ。



編集部からのコメント: 前回のkssxさんの『簡単!細胞バラバラ法』の第2弾という感じの方法ですね。確かに、固まったペレットを、ロスを少なく、きれいにほぐすのは大変な場合があります。この手のチューブ立ては、必ず研究室にいくつかは転がっていると思いますので、皆様、是非一度お試しください。

実験川柳特集 8

本コーナーは、弊社ウェブサイト(www.toyobo.co.jp/bio)「読者のコーナー」で最新の作品を確認いただけます。

流し過ぎ ゲルも頭も 真っ白け

匿名希望 ぼんぼんさん

●ぼんぼんさんのコメント: 時々やっけてしまいます。タイマーは必需品。

大腸菌 その生命力を 私にも

匿名希望 分化全能性? さん

半量系? いや、まだイケるよ クォーター

匿名希望 NR さん

●NRさんのコメント: Sequenceは4分の1量系まで減らせます、経費削減。

【句評】 電気泳動での失敗ですね。私は、翌朝やっけな事になったことに気付いたことがあります。週末でなくて本当に良かったです…。

【句評】 私も最近衰えを感じます。大腸菌の旺盛な生命力にあやかりたいものです。

【句評】 工夫の精神がなければ研究はうまくいかないものです。でも、TOYOBOの試薬は取説どおりバンバンつかってくださいね。

⇒弊社ウェブサイト(読者のコーナー)へご投稿コーナー)からご投稿、投句いただけます。

<http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/lifescience/tech/reader/contribute/index.html>

採用になった方には、図書カード(実験のコツ、失敗・成功談:¥10,000、実験川柳:¥2,000)をご進呈いたします(詳しくはサイトをご覧ください)。奮って投稿・投句ください。

● BMB2008バイオテクノロジーセミナーのご案内

下記の日程で、BMB2008バイオテクノロジーセミナーにて発表を行います。最近得られた、興味深い知見を中心としたセミナーですので、ふるってご参加いただきますよう宜しくお願いいたします。

日時：12月9日（火） 12:00 -13:00
 会場：第3会場（神戸ポートピアホテル 南館 1F 大輪田B）
 セミナー番号：1BT3

「 極限環境微生物、その酵素の用途展開 -PCRへの応用- 」

司会：桂木 信裕（東洋紡績（株）ライフサイエンス事業部）

- 1) 12:00-12:05 ご挨拶
- 2) 12:05-12:35 「極限環境微生物の利用:超好熱菌と南極微生物について」:
 今中 忠行(立命館大学 生命科学部 生物工学科 教授)
- 3) 12:35-12:55 「KOD DNA polymeraseの進化と用途展開」:
 杉山 明生(東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所 リーダー)

● カルナバイオサイエンス社製品お取り扱い中止のご案内

カルナバイオサイエンス社キナーゼ製品について、2008年9月19日（金）のご注文分をもちまして、弊社でのお取り扱いが中止となりました。長らくのご利用、大変ありがとうございました。

NOTICE TO PURCHASER : LIMITED LICENSE

- PCR関連商品のラベルライセンスについての詳細は、弊社ウェブサイト (www.toyobo.co.jp/bio) をご覧ください。

●本ページ掲載の試薬類は全て一般研究用の目的にのみ販売しており、医薬品、診断用医薬品、化粧品、食品用等には使用できませんので、十分ご注意ください。誤用による事故については、当社は一切の責任を負いません。
 ●本ページ掲載商品には消費税は含まれておりません。実際のご購入価格については弊社代理店へお問い合わせください。
 ●本ページ中の略号: 印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外毒物です。
印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外劇物です。
印は消防法に基づく危険物です。