



KOD FX Neo

→本誌p.1~3に詳細記事がございます。

## Brand-New item

- 1 高効率・高成功率PCR酵素  
KOD FX Neo キャンペーン

## HOT ITEM

- 4 高正確・高効率・高速PCR酵素  
KOD -Plus- Neo キャンペーン
- 5 KOD用高効率TAクローニングキット  
TArget Clone™ -Plus-

## 千種万様 USER'S NOTE

- 6 製品KOD FXを用いた実施例  
KOD FXを用いた麹菌*Aspergillus oryzae*の  
遺伝子破壊の確認
- 7 製品KOD FXを用いた実施例  
KOD FXを用いた植物葉からの迅速DNA増幅

## TECHNICAL REVIEW

- 9 免疫反応促進試薬Can Get Signal® immunostainを用いた  
免疫染色における固定法の検討

## CAMPAIGN

- 12 Cell Applications, Inc. 製品お試しキャンペーン!!

## INFORMATION

- 13 学会出展のご案内
- 13 実施例集のご案内
- 13 メールマガジン配信のご案内

## みんなの広場

- 14 実験川柳特集12



# Brand-New item

## 高効率・高成功率PCR酵素 KOD FX Neo

難配列・Long PCR・  
クルードサンプルにお薦め

発売記念  
キャンペーン  
**40%off**

NEW

■期間：2010年10月20日～2011年3月31日(ご注文分)

伸長性、及びクルードサンプルからの増幅効率が格段にアップしました。

KOD DNA polymerase\*は、優れた伸長性を有し、また比較的クルード成分の阻害に強いといった特長を持っています。「KOD FX」は、この酵素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においてご好評いただいております。

しかし、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」が生じるため、PCR機能が完全には発揮できていないと考えられていました。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、長鎖ターゲット・難配列ターゲットの増幅やクルードサンプルからの増幅の効率をさらに向上させることに成功しました。

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

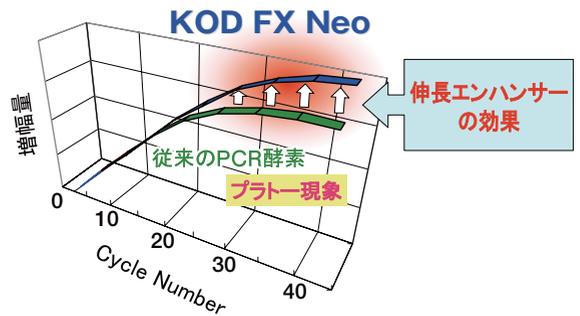


図1. 伸長エンハンサーの効果

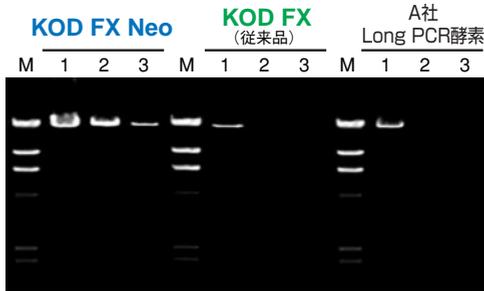


### 特長1 伸長性アップ

- ・ゲノムDNAを鋳型として最大40kbの増幅が可能
- ・30sec./kbの高速サイクルを実現(クルードサンプルでは1min./kbをお薦めしております)
- ・高GCターゲットなどの難配列の増幅に最適

### 実施例1 ヒトゲノムDNAを用いた増幅長の比較

従来困難であった、40kbの遺伝子の増幅が可能でした。また、従来品に比べ約半分の時間で増幅が完了しました。



<伸長時間> 30sec./ kb      60sec./ kb      ≤30sec./ kb

M: λHind III Marker  
1: tPA 24kb  
2: HBg 32kb  
3: HBg 40kb

Template: ヒトゲノムDNA 200ng/50μl

#### 【サイクル条件】

#### KOD FX Neo

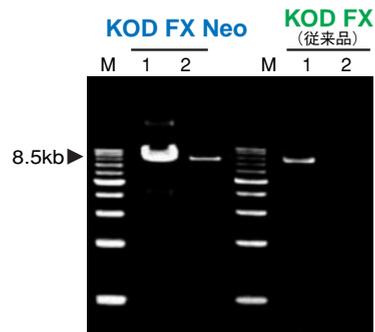
94℃, 2min.  
98℃, 10sec. ← 5 cycles  
74℃, 30sec./kb  
98℃, 10sec. ← 5 cycles  
72℃, 30sec./kb  
98℃, 10sec. ← 5 cycles  
70℃, 30sec./kb  
98℃, 10sec. ← 5 cycles  
68℃, 30sec./kb ← 20 cycles  
68℃, 7min.  
4℃, Hold

#### KOD FX

94℃, 2min.  
98℃, 10sec. ← 5 cycles  
74℃, 60sec./kb  
98℃, 10sec. ← 5 cycles  
72℃, 60sec./kb  
98℃, 10sec. ← 5 cycles  
70℃, 60sec./kb  
98℃, 10sec. ← 5 cycles  
68℃, 60sec./kb ← 20 cycles  
68℃, 7min.  
4℃, Hold

### 実施例2 検出感度の比較

ヒトゲノムDNAを鋳型として検出感度の比較を行いました。その結果、KOD FX Neoは、従来品に比べ約一桁感度の向上を認めました。



<伸長時間> 30sec./ kb      60sec./ kb

M: 1kb DNAラダー  
1: 0.1ng  
2: 0.01ng

Template: ヒトゲノムDNA  
Target: Human β-globin 8.5kb

#### 【サイクル条件】

#### KOD FX Neo

94℃, 2min.  
98℃, 10sec. ← 40 cycles  
68℃, 4.5min.  
4℃, Hold

#### KOD FX

94℃, 2min.  
98℃, 10sec. ← 40 cycles  
68℃, 9min.  
4℃, Hold

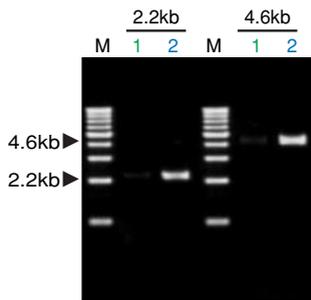
## 特長2 クールドサンプルからの増幅性能アップ

- ・植物ライセートやマウステールなどからの増幅効率を向上
- ・土壌成分や食品成分などのPCR阻害効果を低減

- ・従来品同様、グラム陽性菌や酵母、カビなどからの直接PCRが可能

### 実施例3 植物のライセートを用いた増幅

ワンステップ法で調製したタバコの葉のライセートをサンプルとして検討を行いました。今回は、今までの検討で、35サイクルの条件ではあまり増幅の良くなかった2.2kb及び4.6kbのターゲットを増幅しました。その結果、KOD FX Neoを用いることで、明瞭な増幅を確認することができました。



M: 1kb DNAラダー  
1: KOD FX (従来品)  
2: KOD FX Neo

Template: タバコ葉ライセート(ワンステップ法)  
1μl  
Target: rbcmt1

【サイクル条件】  
94°C, 2min.  
98°C, 10sec. ◀ 35 cycles  
68°C, 1min./kb  
4°C, Hold

#### ●前処理法(ワンステップ法)

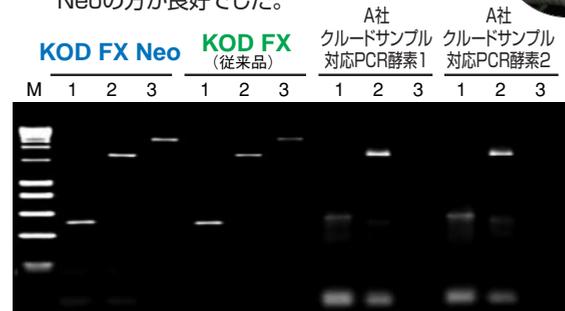
- ① 葉(3mm角) 精米(1粒) / マイクロチューブへ
- ② Buffer A 100μl添加し、Vortexにて良く攪拌  
Buffer A: 100mM Tris-HCl (pH9.5)  
1M KCl  
10mM EDTA
- ③ 95°C・10 min. / Vortexにて良く攪拌
- ④ 上清1 μlをPCR反応液に添加(植物組織は完全には溶解しません) / 左:葉 右:精米

【参考文献】  
*Bio Techniques*, **19** : 394 (1995)

▶ p.7 User's Noteもご参照ください

### 実施例4 マウステールライセートを用いた増幅の比較

アルカリ溶解法を用いて調製したマウステールライセートをサンプルとして、3種類のマウス遺伝子の増幅を行いました。その結果、KOD FXとKOD FX Neoでのみ全ターゲットについて良好な増幅が認められました。また、増幅効率はKOD FX Neoの方が良好でした。



M: 100 bp DNA ラダー, 1 kb DNA ラダー  
1: Mouse TATA box binding protein (TBP) 0.5 kb  
2: Mouse transferrin receptor (Tfr) 1.5 kb  
3: Mouse membrane glycoprotein (Thy-1) 2.6 kb

Template: マウステールライセート(アルカリ溶解法) 0.5μl

【サイクル条件】  
94°C, 2min.  
98°C, 10sec. ◀ 30 cycles  
68°C, 1min./kb  
4°C, Hold

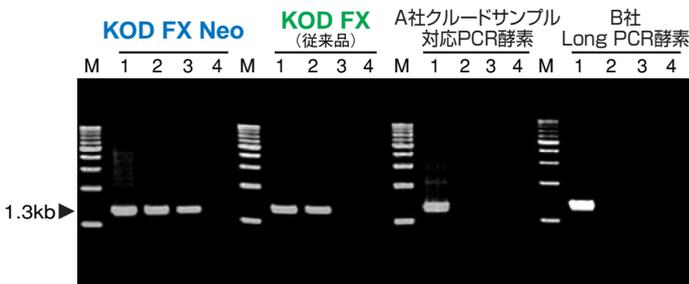
#### 96ウェルPCRプレートを用いるマウステール処理法(アルカリ溶解法)

- マウステール(3mm程度)を96穴プレートに入れる
- ↓ ←50mM NaOH 180μlを加え、蓋をしてVortexにて良く攪拌する
- ↓ スピンダウン(軽く振って液を下に落とす程度でも問題ありません)
- ↓ 95°C, 10min.インキュベーター(サーマルサイクラーを使用)
- ↓ ←1M Tris-HCl (pH 8.0) 20μlを加え、蓋をしてVortexにて良く攪拌する
- ↓ スピンダウン(軽く振って液を下に落とす程度でも問題ありません)
- 上清(テンプレート)⇒0.5~2μlをPCR反応液50μlに添加

※マウステール切片は、液に浸るようにカットしてください。 ※熱アルカリにご注意ください。  
※処理後、マウステールは完全には溶解しません。マウステールの表面が溶ける程度です。  
※本方法は、1.5mlマイクロチューブなどを用いても可能です。

### 実施例5 ジャム(食品)添加実験

加工食品の一例として、ジャムの懸濁液をPCR反応液に添加してPCRの阻害の検討を行いました。果物には、多糖をはじめとするPCRを阻害する物質が含まれています。その結果、KOD FX Neoが最も阻害に強いことが明らかとなりました。



M: 1kb DNAラダー  
1: ジャム上清0μl  
2: ジャム上清2μl  
3: ジャム上清4μl  
4: ジャム上清6μl

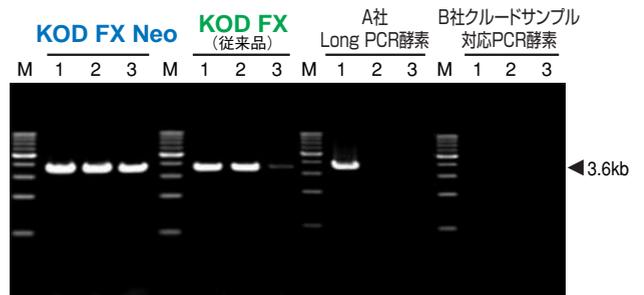
添加PCR阻害物質:  
イチゴジャム0.3gに100μlのTEバッファーを添加し遠心上清を添加

Template: 10ng ヒトゲノムDNA  
Target: Human β-globin 1.3kb

【サイクル条件】  
94°C, 2min.  
98°C, 10sec. ◀ 30 cycles  
68°C, 1.5min.  
4°C, Hold

### 実施例6 フミン酸添加実験

フミン酸(humic acid)は、植物などの成分が腐植土や土壌などにおいて微生物などによって形成されるアルカリに可溶で、酸で沈殿する赤褐色ないし黒褐色を呈する、有機物であり、PCRを阻害することが知られています。ここでは、例としてヒトゲノムDNAにフミン酸を混合し、PCRの阻害に関する評価を行いました。その結果、KOD FX Neoが最もフミン酸の阻害に強い傾向があることが分かりました。



M: 1kb DNAラダー  
1: フミン酸添加量\* 0μl  
2: フミン酸添加量\* 2μl  
3: フミン酸添加量\* 4μl  
\*フミン酸: OD280=1の溶液を使用

Template: 10ngヒトゲノムDNA  
Target: Human β-globin 3.6kb

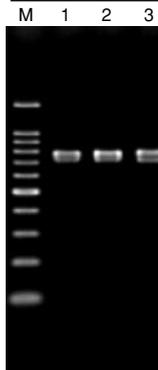
【サイクル条件】  
94°C, 2min.  
98°C, 10sec. ◀ 30 cycles  
68°C, 4min.  
4°C, Hold

## 実施例7 コンポスト(堆肥)を用いたメタゲノム解析

コンポスト(堆肥)から、様々な方法を用いて粗抽出したDNA溶液(処理上清)をサンプルとして、原核生物共通プライマーを用いてrDNAの増幅を行いました。その結果、アルカリ溶解法とワンステップ法で調製したサンプルを用いた検討において、一般的に広く行われているCTAB法と同程度の増幅を確認することができました(右図)。続いて、KOD FX NeoのPCRプロダクトは末端が平滑化されているため、専用のTAクローニング試薬「TArget Clone™ -Plus-」を用いてクローニングし、シーケンス解析を行いました。その結果、解析した各96クローンにおいて、良好なシーケンス解析を行うことができました。また解析結果より、それぞれの粗抽出法によって得られた配列は、ほぼ同様の傾向を示しました(アルカリ溶解法やワンステップ法は大変簡便な方法ですが、はじめて使用される場合は、検出される菌の傾向等について、従来の方法と比較などの事前検討をお薦めします)。

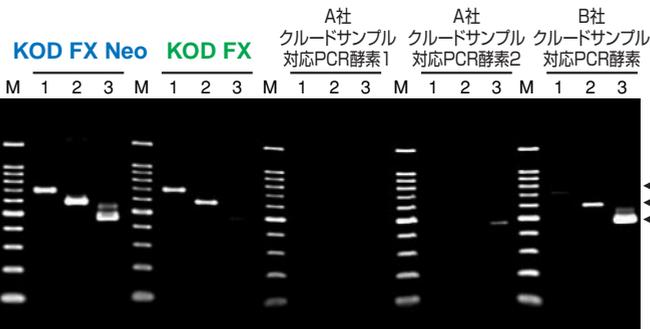
また、アルカリ溶解法によって調製した上清を用いて、様々な増幅試薬を用いて、3種類の共通プライマーを用いてrDNAの増幅を行った結果、KOD FX Neoが最も良好な結果を示すことが分かりました(下図)。

### KOD FX Neo



M: 100bp DNA ラダー  
1: アルカリ溶解法  
2: ワンステップ法  
3: CTAB法(従来法)

【ターゲット】 16s rDNA  
【プライマー】  
Fwd GTTTGATCCTGGCTCA  
Rev TACCAGGGTATCTAATCC  
【サイクル条件】  
94°C, 2min.  
98°C, 10sec. ←  
55°C, 30sec. ← 24~26 cycles  
68°C, 1min./kb  
4°C, Hold  
1 アルカリ溶解法×24 cycles  
2 ワンステップ法×24 cycles  
3 CTAB法×26 cycles



M: 100bp DNAラダー  
1: 原核生物由来rDNA (700 bp)  
2: *Bacillus* sp. 由来rDNA (600 bp)  
3: High G/C グラム陽性菌由来rDNA (550 bp)

【ターゲット】 16s rDNA  
【プライマー】  
1: Fwd ATTAGATACCTDGTAGTCC  
Rev TACCTTGTTACGACTT  
2: Fwd AGGGTCATTGGAAACTGGG  
Rev CGTGTGTAGCCCAGGTCATA  
3: Fwd GGCCTTCGGGTTGTAAACC  
Rev CTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGC

【サイクル条件】  
94°C, 2min.  
98°C, 10sec. ←  
X°C, 30sec. ← Y cycles  
68°C, 30sec. ←  
4°C, Hold  
1 X: 50°C Y: 23 cycles  
2 X: 60°C Y: 33 cycles  
3 X: 65°C Y: 33 cycles

### アルカリ溶解法

土壌100mg  
↓ ←50mM NaOH 180μl  
↓ Vortexにて良く攪拌  
↓ 95°C, 10min.インキュベート  
↓ ←1M Tris-HCl (pH8.0) 20μl  
↓ Vortexにて良く攪拌  
↓ 遠心12,000rpm, 5min.  
上清  
↓  
滅菌水で10倍に希釈し、1μlをPCR反応液50μlに添加

### ワンステップ法

土壌100 mg  
↓ ←Buffer A\* 100μl  
↓ Vortexにて良く攪拌  
↓ 95°C, 10 min.インキュベート  
↓ 遠心12,000rpm, 5min.  
上清  
↓  
滅菌水で10倍に希釈し、1μlをPCR反応液50μlに添加  
\*Buffer A: 100mM Tris-HCl (pH9.5)  
1M KCl  
10mM EDTA

### CTAB法

下記論文に従って実施しました。

J. Zhou *et al.*, DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 316-322 (1996)



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

\*50μl反応を行ったときの反応回数で表示しています。

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) <b>TArget Clone™ -Plus-</b>	10回用	-20°C	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。

## 高正確・高効率・高速PCR酵素 KOD -Plus- Neo

高正確性PCRにお勧め



■期間：2010年11月25日～2011年3月31日(ご注文分)

サイクル後半での増幅の鈍化を改善。伸長時間短縮(30sec./kb)で理想的なクローニング用PCRを実現。

KOD DNA polymeraseは、強い3' → 5' エクソヌクレアーゼ活性(校正活性)を有し、正確にターゲット配列を増幅することができるため、クローニング用のPCR酵素として好評いただいております。しかし、高正確性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」が出やすいと言われていました。KOD -Plus- Neoは、高正確性PCR酵素: KOD -Plus- シリーズの技術に、弊社で新たに開発した「伸長エンハンサー」を応用することでTaqの約80倍というKOD -Plus- シリーズの高い正確性を保持しつつ、〈プラトー現象〉を抑えることにより、微量な鋳型DNAからの増幅や長いターゲットの増幅効率を格段に向上させることに成功しました。

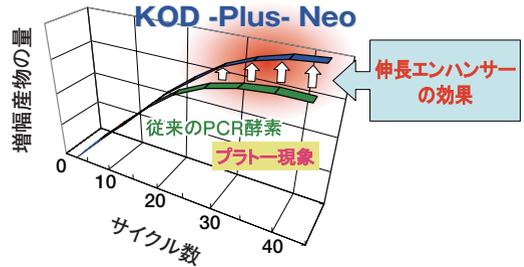
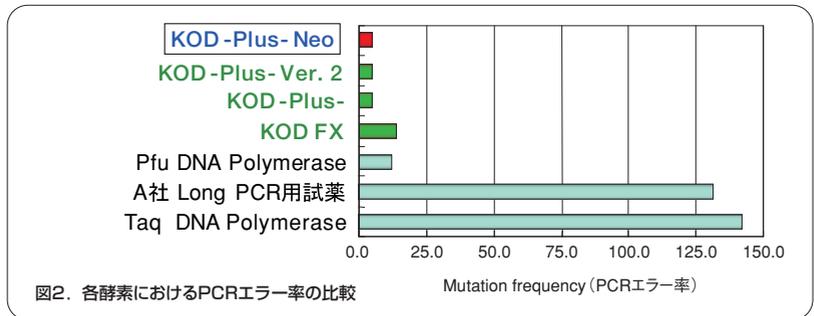


図1. 伸長エンハンサーの効果

### 特長1 微量な鋳型DNAから正確・効率的な増幅が可能

- 伸長エンハンサーを応用することによって、微量な鋳型DNAからでも高正確・高効率に目的遺伝子を増幅することができます。本酵素は高い正確性(Taqの約80倍)を示し、低コピー数の鋳型からも正確に目的遺伝子を増幅することができます。

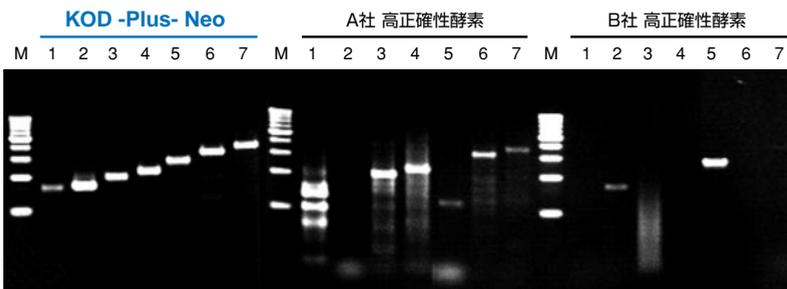


サンプル：Total RNAから逆転写したcDNA (約50ng)

【KOD -Plus- Neoのサイクル条件】

94℃, 2min.  
98℃, 10sec. ← 40 cycles  
68℃, 30sec./kb

20mer以上のプライマー (Tm値>63℃) においては、まず2ステップサイクルをお試しください。検討いらずで、簡単です。



- M: 1kb DNAラダー
- Human brk Tyrosine kinase (1.6kb)
  - Human rac protein kinase-alpha (1.7kb)
  - Human 63kDa protein kinase (2.0kb)
  - Human c-syn protooncogene (2.2kb)
  - Human FER Tyrosine kinase (2.7kb)
  - Human cell adhesion kinase beta (3.2kb)
  - Human Jak2 kinase (3.6kb)

図3. 様々なプロテインキナーゼ遺伝子の増幅

### 特長2 増幅時間を短縮<30sec./kb>(長いターゲットでより便利になりました)

### 特長3 幅広いターゲットの増幅

- 従来品より伸長性が向上し、様々な長さのターゲットを増幅できます。ゲノムDNAで24kbまでの増幅を確認しています。

### 特長4 様々なプライマーで同一温度サイクル条件を実現

- 検討不要のサイクル条件を実現しました。20mer以上のプライマー (Tm値>63℃) \*においては、まずは2ステップサイクルをお試しください。検討要らずで簡単です。  
\* Tm値は最近接塩基対法(Nearest Neighbor method)を用いて計算した値を利用しています。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格	キャンペーン価格
高正確・高効率・高速PCR酵素 KOD -Plus- Neo KOD -Plus- Neo (1.0U/μl) 10×PCR Buffer for KOD -Plus- Neo 25mM MgSO <sub>4</sub> 2mM dNTP	200U×1本 [200回用]*	-20℃	KOD-401	¥30,000	¥18,000
	(200U×1本)×5 [1,000回用]*	-20℃	KOD-401X5	¥120,000	対象外

\*50μl反応を行ったときの反応回数で表示しています。

## KOD用高効率TAクローニングキット TArget Clone™ -Plus-

**KOD専用のTAクローニングキットです。10×A-attachment Mixの別売りもございます。**

KOD -Plus- Neo (p.4)をはじめとする高正確性PCR酵素「KOD -Plus-シリーズ」、及びKOD FX Neo (p.1)をはじめとする高成功率PCR酵素「KOD FXシリーズ」などによって増幅されたDNA断片の末端は平滑化されており、通常の方法ではTAクローニングすることはできません。TArget Clone™ -Plus-はそのようなKOD系酵素で増幅されたPCR産物を直接用いて、高効率にTAクローニングすることができます。

また、KOD PCR産物にdAを付加するための試薬パーツ「10×A-attachment Mix」の別売りもございます。この試薬を用いることにより、付属のpTA2ベクター以外の任意のTベクターへのクローニングが可能になります。

### 特長1 KODのPCR産物に対応

- 平滑末端を生じるKODのPCR産物を直接用いてTAクローニングすることができます。

### 特長2 様々なベクターに対応可能

- 別売りの10×A-attachment Mixを用いることにより、任意のTベクターを用いてTAクローニングを行うことが可能です。

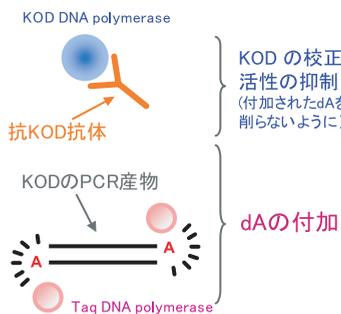


図1. 10×A-attachment Mixの反応原理

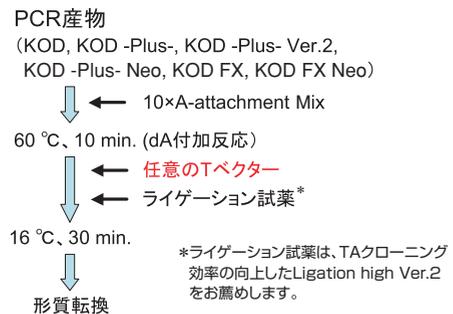


図2. 任意のTベクターへのTAクローニングフロー

**■キャンペーン期間：2010年11月25日～2011年3月31日(ご注文分)**

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格	キャンペーン価格
TArget Clone™ -Plus- (pTA2 Vector, 2×Ligation Buffer, T4 DNA Ligase, 10×A-attachment Mix)	10回用	-20℃	TAK-201	¥16,000	対象外
10×A-attachment Mix	25回用 (25μl)	-20℃	TAK-301	¥12,000	¥7,200

### 関連商品

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格	キャンペーン価格
高正確・高効率・高速PCR酵素 KOD -Plus- Neo	200U×1本	-20℃	KOD-401	¥30,000	¥18,000
高効率・高成功率PCR酵素 KOD FX Neo	200U×1本	-20℃	KFX-201	¥35,000	¥21,000
高効率ライゲーションキット Ligation high Ver.2	750μl×1本	-20℃	LGK-201	¥22,000	¥13,200
高効率TAクローニングキット TArget Clone™	10回用	-20℃	TAK-101	¥12,000	対象外
高効率大腸菌コンピテントセル Competent high DH5α	0.1ml×10本	液体窒素	DNA-903	¥17,000	対象外
サブクローニング用コンピテントセル Competent Quick DH5α	0.1ml×20本	-80℃	DNA-913	¥29,000	¥17,400

製品 KOD FX を用いた実施例

## KOD FXを用いた麹菌 *Aspergillus oryzae* の遺伝子破壊の確認

データご提供 白鶴酒造株式会社 研究開発室 山下伸雄様

※本実施例は、第61回 日本生物工学会大会(2009)にて発表されたものです。

麹菌の遺伝子破壊を行った際の確認は、従来、DNAの抽出を伴った煩雑なものであった。今回、KOD FXを用い、麹菌の分生胞子を溶液中で加熱しただけのサンプルを用いて増幅を行い遺伝子型の判定を行った。

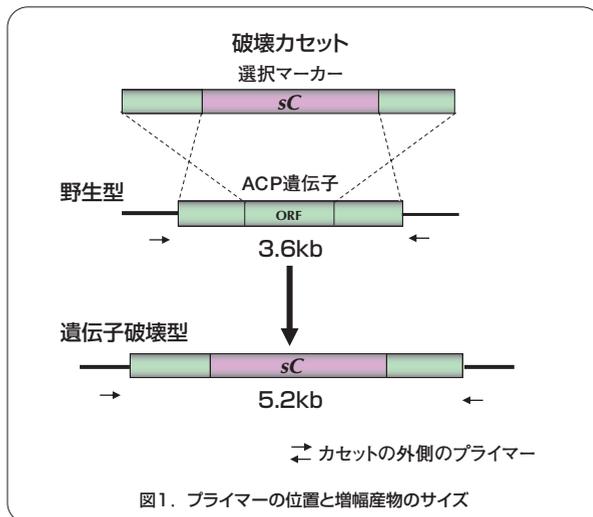
### 実験方法

**サンプル** 麹菌の遺伝子破壊候補株の分生胞子

- サンプルの処理**
- ① 胞子を微量かぎとりBuffer\* (50  $\mu$ l) に懸濁  
\*Buffer: 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 1 M KCl, 10 mM EDTA
  - ② 95°C 10分 → Vortex → 上清1  $\mu$ l / 50  $\mu$ l PCR反応液

**遺伝子名** 推定酸性カルボキシペプチダーゼ (ACP) 遺伝子

**ターゲット長** 3.6~5.2 kb



### 結果

遺伝子破壊株を明瞭に判定でき、酵素活性が低下していたことから遺伝子の機能を特定できた。

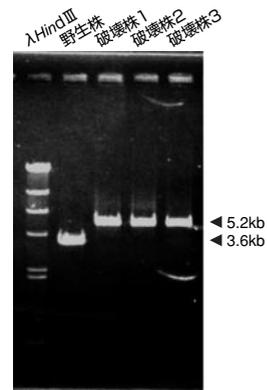


図2. 麹菌を用いて行ったPCRの電気泳動結果

### お客様からのコメント

従来、麹菌等、糸状菌はコロニーPCRが困難で、遺伝子破壊株を判定する際、ゲノムDNAを抽出精製する必要があったが本製品を用いることで、その作業が不要となり、容易に多検体のクローンの遺伝子型を調べることが可能になった。

反応液組成	滅菌水	10 ( $\mu$ l)
	2x PCR Buffer for KOD FX	25
	2mM dNTPs	10 (final 0.4 $\mu$ M)
	10pmol / $\mu$ l Primer F	1.5 (final 0.3 $\mu$ M)
	10pmol / $\mu$ l Primer R	1.5 (final 0.3 $\mu$ M)
	KOD FX (1.0U/ $\mu$ l)	1 (1U)
	前処理サンプル溶液	1
	<b>Total</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

**サイクル** 94°C, 2 min.  
↓  
98°C, 10 sec. ←  
68°C, 5 min. ← } 35 cycles

製品 KOD FX を用いた実施例

## KOD FXを用いた植物葉からの迅速DNA増幅

データご提供 京都大学大学院 農学研究科 地域環境科学専攻 生物環境科学講座 森林生化学分野 坂本正弘先生

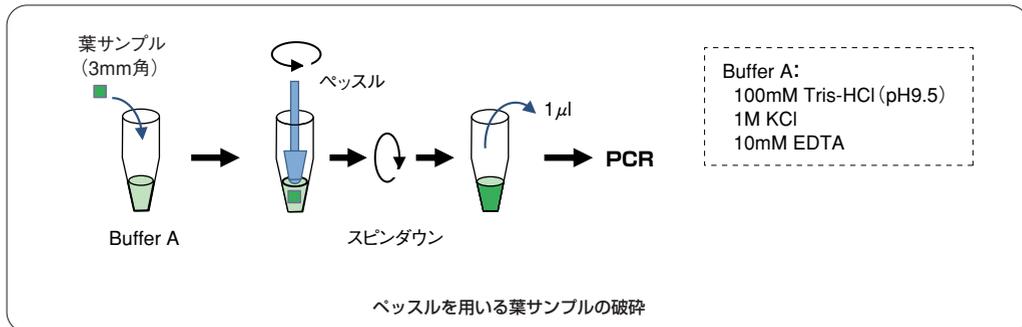
KOD FX実施例集に植物の前処理方法として記載されていた、95℃10分間の加熱によるワンステップ法では、目的とするDNAの増幅が見られませんでした。そこで、ペッスルを用いて葉を破碎する少量多サンプルからのDNA簡易抽出法と、その抽出液を用いる高効率PCRの検討を実験の目的としました。

※ワンステップ法: Buffer A(下記参照)中で葉を95℃, 10min.処理した後、その上清をPCRのサンプルとする方法です。(p.2ご参照)

### 実験方法

**サンプル** イネおよびタケ類の葉

**サンプルの処理** 抽出液は実施例集に記載されていたBuffer Aと同じです。実施例集に記載されていたように、植物の葉を約3mm角にハサミで切断し、マイクロチューブに入れ、これにBuffer Aを100μl加えました。ペッスルによってBufferが緑色になる程度まで葉を砕きました。その後、簡単にスピンドウンし、上清を1μl用いてPCR(50μl)を行いました。



**遺伝子名** gibberellin 20-oxidase gene

**ターゲット長** 1686 bp

<b>反応液組成</b>	滅菌水	10 (μl)
	2x PCR Buffer for KOD FX	25
	2mM dNTPs	10 (final 0.4μM)
	10pmol / μl Primer F	1.5 (final 0.3μM)
	10pmol / μl Primer R	1.5 (final 0.3μM)
	KOD FX (1.0U/μl)	1 (1U)
	葉の破碎上清	1
	Total	50 μl

**サイクル** [3 Step cycle]

94℃	2 min.	35 cycles
98℃	10 sec.	
60℃	30 sec.	
68℃	1 min.	
68℃	7 min.	

[2 Step cycle]

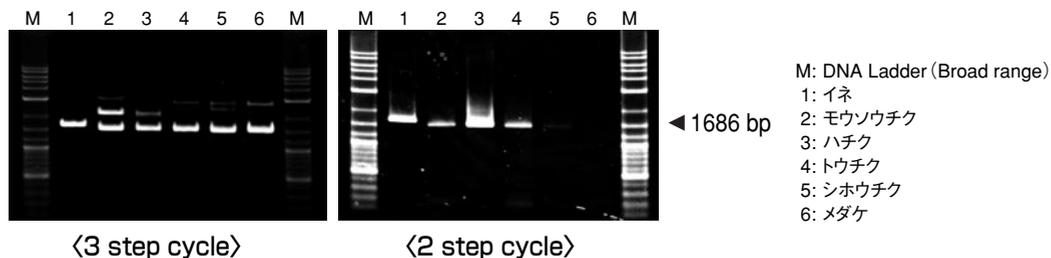
94℃	2 min.	35 cycles
98℃	10 sec.	
68℃	1 min.	
68℃	7 min.	

**プライマー配列** Primer F: 5'-ATGCGGTGCAACTGCTACCC-3'

Primer R: 5'-TATACCTCCCGTTCGACAGC-3'

※イネの遺伝子のDNA配列を基に作成

## 結果



ベッスルで粉砕した方法では、いずれのサンプルにおいてもDNAの増幅が見られました。PCR反応を3ステップで行った場合（アニール温度60℃）と2ステップでおこなった場合を比較すると、2ステップでも増幅効率が若干落ちるもののDNAの増幅が見られました。

実施例集では葉緑体DNAからの増幅であり、コピー数が多いため加熱処理による方法でも増幅が可能であると思われましたが、ゲノムDNAからの増幅には適しませんでした。今回のベッスルによって粉砕した粗抽出液からは問題なくゲノムDNAからの増幅が行えました。また、実施例集にはプライマー長を長めに設定した方がよい、と記載されていましたが、今回は上述した20-merのプライマー長でもPCR反応が問題なく行えました。

## 先生からのコメント

従来、PCR反応の鑄型に使用するDNAは、サンプルを液体窒素によって粉砕し、その後に抽出処理を行わねばならず、操作が煩雑で時間もかかりました。そのため、多数のサンプルを調製するにはかなりの労力を強いられました。今回のベッスルによる粉砕法では1サンプルに要するのは、ほんの数秒であり、サンプル数が多くても簡単にPCRできる利点があります。PCRを行うだけであれば、今回の簡易抽出法によって得た抽出液を鑄型としてKOD FXによる反応で十分です。従来のDNAの抽出操作をすることを考えると時間と労力が大幅に節約できます。

今回のUSER'S NOTEにご紹介しました記事は「KOD FX」を用いたものですが、新商品「KOD FX Neo (p1)」にも充分応用できるものと考えられます。今後の、先生方の研究に広くお役立てください。

**40%off**  
 ウィンターキャンペーン  
 対象品

■期間：2010年11月25日～2011年3月31日（ご注文分）

高成功率PCR酵素 **KOD FX**

包装	Code No.	価格	キャンペーン価格
200U × 1本	KFX-101	¥35,000	¥21,000
(200U × 1本) × 5	KFX-101X5	¥140,000	対象外
(200U × 1本) × 10	KFX-101X10	¥260,000	対象外

KOD FXは、マウステールライセート、植物ライセート、血液など様々なクールドサンプルから直接、高効率なPCRを行うことができます。

実施例は弊社ウェブサイト (<http://www.toyobo.co.jp/bio>) KOD FXコーナーで公開しております。是非一度ご覧ください。

## 免疫反応促進試薬 *Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain を用いた免疫染色における固定法の検討

京都大学大学院 薬学研究科 生体情報制御学分野 高橋 千絵 先生

### はじめに

Rab11は、細胞表面からのエンドサイトーシスやその後のリサイクリングに重要な役割を果たす低分子量GTPaseであり、主としてリサイクリングエンドソームに局在します。しかしながら、蛍光免疫染色法に適した有用な抗体がなく、内在性Rab11の局在や、細胞内での機能を詳しく調べることが阻まれてきました。前回、本誌 (vol.95 p11-12 Technical Reviewの項) において報告したように、免疫染色用「*Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain」を用いることによって、従来法では検出が難しかったRab11のシグナルを検出することが可能になりました。

一方、exocyst複合体は、エキソサイトーシスにおける細胞内小胞の細胞膜への繫留 (tethering) や融合 (fusion) に関与することが知られており、構成サブユニットにsec15やExo70などがあります。sec15やExo70などの細胞内局在は、その機能から主に細胞膜近傍にあると考えられてきましたが、蛍光免疫染色法に適したexocystサブユニットに対する有用な抗体はなく、不明瞭でした。生化学的解析からはRab11とsec15の直接結合が報告されています。

今回私たちは、Exo70のシグナル検出に免疫染色用「*Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain」が有用であることを確認しました。さらに、複数の固定法との組み合わせにも免疫染色用「*Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain」は有効であり、これにより、Rab11とExo70が核周辺とそこから伸びたチューブル様構造で共局在することを初めて見いだしました。

### 方 法

#### 1. 細胞

カバーガラス上でHeLa細胞を培養し、48時間後固定しました。(3.へ続く)

#### 2. Rab11のノックダウン (siRNA)

35×35 mmディッシュでHeLa細胞を培養し、24時間後にRab11aおよびRab11bに対するsiRNA、または、Exo70に対するsiRNAをトランスフェクションしました。その24時間後に細胞をカバーガラス上にまき直し、さらに48時間後 (トランスフェクションの72時間後) に細胞を固定しました。(3.へ続く)

#### 3. 固定

##### 〈PFA固定〉

培地を除き、37°Cに温めた4%パラホルムアルデヒド溶液で10分間浸して固定しました。PBSで3回洗浄後、50 mM塩化アンモニウム溶液で20分間クエンチングし、PBSで3回洗浄し、0.1% TritonX-100/PBSで5分間処理した後、さらにPBSで3回洗浄し、2% BSA/PBSで4°C一晩ブロッキングしました。

##### 〈TCA固定〉

培地を除き、氷冷した10%トリクロロ酢酸で15分間浸して直ちに固定しました。PBSで3回洗浄後、0.1% TritonX-100/PBSで5分間処理した後、PBSで3回洗浄し、2% BSA/PBSで4°C一晩ブロッキングしました。

##### 〈PFA固定+TCA固定〉

PFA固定、クエンチングを行った後、氷冷した10%トリクロロ酢酸で15分間浸して固定しました。PBSで3回洗浄後、0.1% TritonX-100/PBSで5分間処理した後、PBSで3回洗浄し、2% BSA/PBSで4°C一晩ブロッキングしました。

#### 4. 1次抗体反応

1次抗体を *Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain (Solution A) あるいはブロッキング液 (2% BSA/PBS) で希釈 (Rab11は200倍、Exo70は10倍) し、サンプルと4°Cで一晩反応させました。反応後、PBSで3回洗浄しました。

##### 〈1次抗体〉

抗Rab11モノクローナル抗体：マウス (BD Biosciences)

抗Exo70モノクローナル抗体：ハイブリドーマ上清 (Dr. Shu-Chan Hsu; Mount Sinai School of Medicine, New Yorkより分与していただきました)

## 5. 2次抗体反応

ブロッキング液で2次抗体を1,000倍希釈し、サンプルと室温で1時間反応させました。反応後、PBSで3回洗浄しました。

〈2次抗体〉

- AlexaFluor® 488標識抗マウスIgG抗体 (Molecular Probes®)
- AlexaFluor® 488標識抗マウスIgG2b抗体 (Molecular Probes®)
- AlexaFluor® 555標識抗マウスIgG2a抗体 (Molecular Probes®)

## 6. 封入・観察

サンプルをFluorescent Mounting Medium (Dako) で封入し、蛍光顕微鏡観察をしました。顕微鏡はCarl Zeiss社製のAxiovert 200 MATを使用しました。

### 結果及び考察

図1は、細胞をPFA固定またはTCA固定し、抗Rab11抗体を2% BSA/PBS (従来法) または *Can Get Signal*® immunostain Solution A で希釈したときのRab11染色像をそれぞれ比較しています。PFA固定サンプルでは、従来法でも *Can Get Signal*® immunostain Solution A を使用した場合でもRab11のシグナルはほとんど検出できませんでした。TCA固定サンプルでは、従来法ではほとんど検出できませんでしたが、*Can Get Signal*® immunostain Solution A を使用することにより、細胞質に散らばったエンドソーム様構造と核周辺およびそこから伸びたチューブル様構造のシグナルが顕著に認められました。また、このシグナルはsiRNAを用いたRab11ノックダウン細胞ではほぼ完全に消失しました (本誌vol.95 p11-12 Technical Reviewの項参照)。

一方、同様な条件でのExo70の染色像を比較しました (図2)。PFA固定サンプルでは、従来法でほとんど検出できなかったExo70のシグナルは、*Can Get Signal*® immunostain Solution A の使用により、細胞質に散らばったエンドソーム様構造と核周辺およびそこから伸びたチューブル様構造などが顕著に認められ、Rab11シグナルと酷似していました。このシグナルはsiRNAを用いたExo70ノックダウン細胞ではほぼ完全に消失しました (data not shown)。TCA固定サンプルでは、*Can Get Signal*® immunostain Solution A によりわずかなシグナルの増加が認められました。

#### Rab11

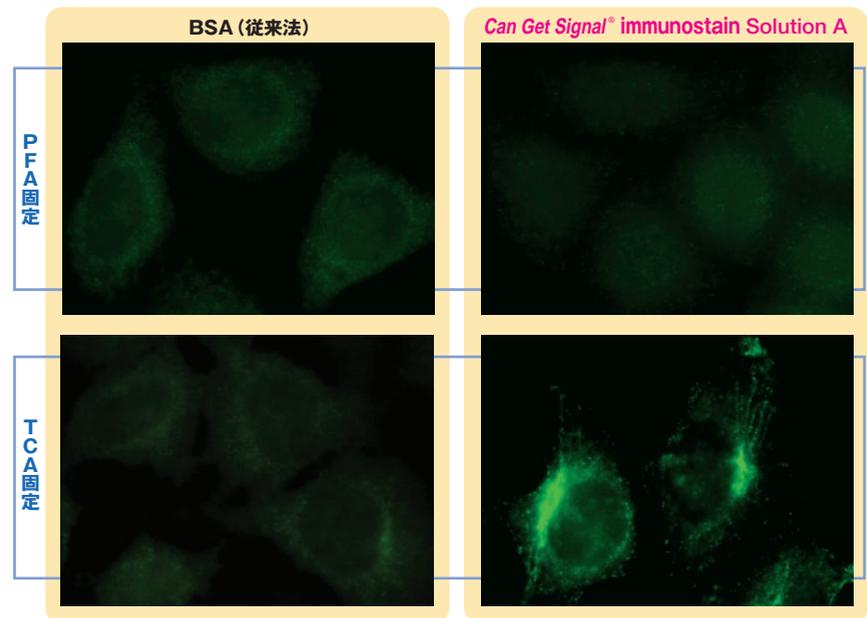


図1. 従来法と *Can Get Signal*® immunostain を用いたときのRab11染色像の比較

#### Exo70

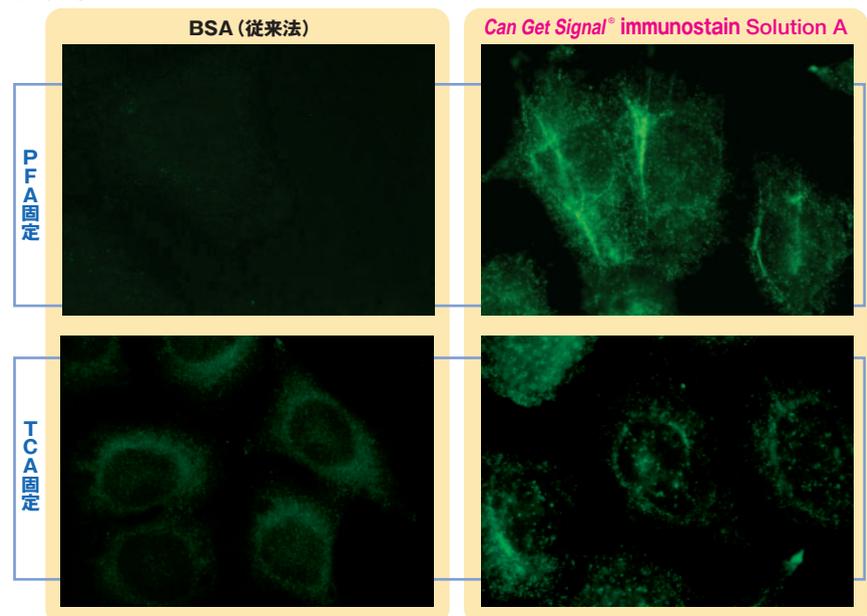


図2. 従来法と *Can Get Signal*® immunostain を用いたときのExo70染色像の比較

このように、Rab11とExo70ともにCan Get Signal® immunostain Solution Aで劇的なシグナル増加を認めることができました。しかしながら、両者の至適固定法が異なるため、同時に検出して共局在の有無を確かめることはできませんでした。そこで、PFA固定に引き続きTCA固定を行い、同時検出が可能かどうかを検討してみました。その結果、Rab11もExo70も顕著にシグナルを検出でき、両者が核周辺とそこから伸びたチューブル様構造で共局在することが確認できました(図3)。

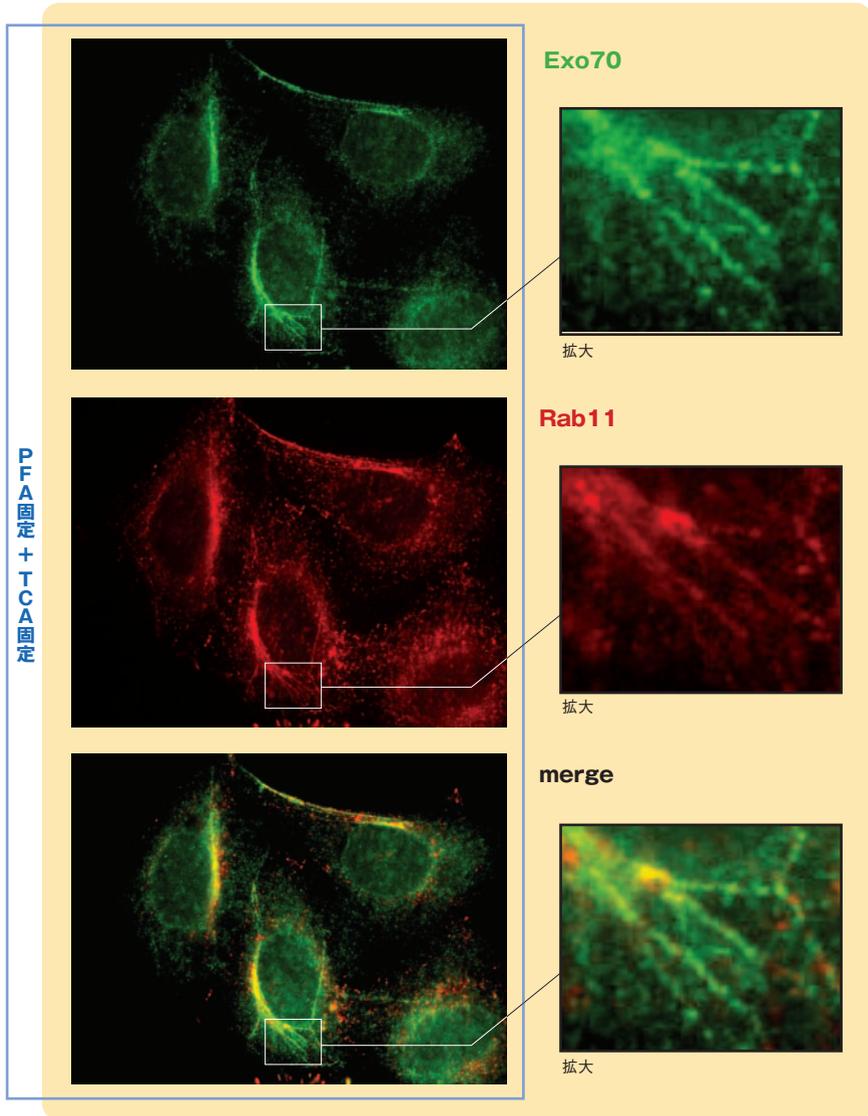


図3. PFA固定+TCA固定を行いCan Get Signal® immunostainを用いたときのRab11とExo70の共局在の検出

以上の結果から、以下のことが明らかとなりました。

- 1) Can Get Signal® immunostainは、従来法では難しかったRab11やExo70のシグナル検出を増強させ、それらの内在性局在を明らかにすることができました。
- 2) Can Get Signal® immunostainは、PFA固定にもTCA固定にも有効であることがわかりました。
- 3) PFA固定、TCA固定のように、抗体によって異なる固定法が有効な場合、PFA固定を行った後にTCA固定を施すことによって、両タンパク質のシグナルを同時に検出することが可能になりました。この場合も、Can Get Signal® immunostainは有効であり、両固定法の利点を生かしながらシグナルを増強させることができました。



■期間：2010年11月25日～2011年3月31日(ご注文分)

## 免疫反応促進試薬 Can Get Signal® immunostain



内容	Code No.	価格	キャンペーン価格
Solution A&B 各5ml×1本	NKB-401	¥12,000	¥8,400
Solution A 20ml×1本	NKB-501	¥30,000	¥21,000
Solution A (20ml×1本)×4	NKB-501x4	¥70,000	対象外
Solution B 20ml×1本	NKB-601	¥30,000	¥21,000
Solution B (20ml×1本)×4	NKB-601x4	¥70,000	対象外

※0.2%以下のノニオン系界面活性剤を含みます。

Can Get Signal® immunostainは、免疫組織・細胞染色などの感度と特異性を改善する機能を有するバッファードです。

使用法は、現在希釈液に用いている希釈血清やブロッキング溶液を本溶液に変更するだけです(Solution AとBは免疫反応の促進作用が異なり、両試薬ともに1次抗体および2次抗体にご使用いただけます)。

⇒詳しくは<http://www.toyobo.co.jp/bio>をご覧ください。

メールアドレス登録で、初代細胞などが初回30%OFF

## Cell Applications, Inc. 製品 お試しキャンペーン!!

CAI は各種初代細胞、Total RNA、抗体などを取り扱っている会社です。  
iPS 細胞研究などで実績があります。

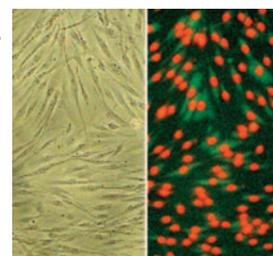
東洋紡ではCell Applications, Inc. (CAI) 取扱い細胞のロット情報 (年齢・性別・人種など) およびその在庫状況を毎月1~2回、メールアドレスを登録されたお客様にE-mailでお送りしております。今回、キャンペーン期間中にメールアドレスを登録されたお客様について、CAI全製品初回購入価格を30%OFFとさせていただきます。

※キャンペーン期間中にご注文いただいた製品を対象といたします。※キャンペーン価格の適用はお客様お一人につき1回までとします。  
※他のCAI製品キャンペーンとの同時割引はございません。

**期間：2010年11月25日～2011年3月25日(ご注文分)**

**■ 対象：CAI全製品**

初代細胞   培地   Total RNA   抗体   など



メールアドレスの登録はこちらから

ウェブサイト  
[https://secure.toyobo.co.jp/bio01/html/cai/cai\\_form.html](https://secure.toyobo.co.jp/bio01/html/cai/cai_form.html)



配信申込フォームに必要事項をご記入いただき、送信ボタンを押してください。

受付のメールが返信されます。

**このメールをプリントアウトして保管しておいてください。ご注文の際の申込用紙になります。**

東洋紡からCAI 製品情報の配信を開始いたします。

※ヒト滑膜・軟骨・骨芽細胞は1ロットあたりの在庫数が少なく、変動が速いため、これらの細胞のロット情報を、毎週配信するオプションをご用意しています。この情報には薬歴情報が含まれています。

細胞情報例	Lot.#	Donor Information			
		Age	Sex	Race	Source
	Year/Week Gesteron				
Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (CADMEC) adult	1941	47	F	-	abdominal
	2023	28	F	C	breast
	2092	49	M	C	facial
	2306	50	F	C	facial
	2322	36	F	C	abdominal
	2460	37	F	C	abdominal

CAI製品をご注文ください。その際上記の受付メールのプリントアウトを代理店様にお渡しください。  
**初回のご注文について30%割引をいたします。(割引のご利用は1回のみとなります)**

**いますぐ、ウェブでご登録を!!**

入力いただきました個人情報につきましては、弊社で責任をもって管理し、お客様への情報提供のみに使用させていただきます。

## ●学会出展のご案内

下記の日程で、製品、パネル、資料の展示を行います。ブースには製品に詳しいスタッフがおりますので、ご質問などがございましたら、その場でお気軽にお尋ねください。BMB2010では、新製品のご紹介を兼ねた、楽しいイベントを企画しています。学会にお越しの際は是非、弊社ブースにお立ち寄りください。

### 日本動物実験代替法学会第23回大会

期間：2010年12月3日(金)～12月5日(日)  
会場：北里大学薬学部1号館・コンベンションホール

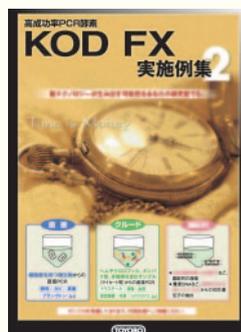
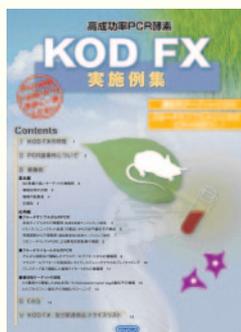
### 日本分子生物学会・日本生化学会 合同大会 (BMB2010)

期間：2010年12月7日(火)～12月10日(金)  
会場：神戸国際展示場(神戸ポートアイランド)



## ●実施例集のご案内

高成功率PCR酵素『KOD FX』、免疫反応促進試薬『Can Get Signal®』を用いた実験例をまとめた、実施例集をご用意しております。弊社ウェブサイト [お問い合わせ・ご請求](#) のコーナーからご請求いただけます。ぜひご利用ください。



## ●メールマガジン配信のご案内

弊社では、様々なお買い得情報、エッセイ、クイズなどを盛り込んだ、有用でお楽しみいただけるメールマガジンを定期的にお送りしております。ご希望の方は、こちらのサイトにてご登録ください。

1 弊社ウェブページ  
([www.toyobo.co.jp/bio](http://www.toyobo.co.jp/bio))

メールマガジン(登録はこちら)

[https://secure.toyobo.co.jp/bio01/html/bionews/bionews\\_form.html](https://secure.toyobo.co.jp/bio01/html/bionews/bionews_form.html)

## \*実験川柳特集 12\*

本コーナーは、弊社ウェブサイト ([www.toyobo.co.jp/bio](http://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。

卒業後 私のテーマ 消えていた

匿名希望 YANAGI さん

●YANAGIさんのコメント:卒業後、研究室のホームページを見たら自分の研究していたテーマが消えていました。(先輩談)

【句評】それは悲しい事実ですね。問題が解決できたからなのか、それとも…。詮索したくなりますね。

癒される 菌を育てる 波の音

匿名希望 シノさん

●シノさんのコメント:温浴で揺られる大腸菌は気持ちよさそう…

【句評】私もそれを感じたことがあります。特に夜にあの音を聞いていると意識が遠のきそうになったりします。酸素の供給よりも、あの振動の心地よさが菌の生育に効いていたりして。とても美しい句なので採用させていただきました。

アクリルアミド ゲル固まらず 私かたまる

匿名希望 もこさん

●もこさんのコメント:すぐに使おうと作っておいたゲルが全く固まっていなくて、コームを抜いた瞬間に思わず呆然として自分が固まってしまう様子。

【句評】私も経験あります! 逆に、ゲルを流し込んでいるときにすべてが固まってしまうパターンも悲しいですよ。だから最近、プレキャストゲルがもてはやされているのかも知れませんね。

無理をして メイクと成果 総崩れ

匿名希望 ぼんぼんさん

●ぼんぼんさんのコメント:徹夜明けはドロドロです…

【句評】なんとも生活臭のする川柳ですね。しかも、リアルです。徹夜はお肌にも悪いので、実験もほどほどに。でも、「クライマーズハイ」ならぬ「実験ハイ」というのもありますよね。

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

ご投句はこちらから

1 弊社ウェブページ  
([www.toyobo.co.jp/bio](http://www.toyobo.co.jp/bio))

2 読者のコーナー

3 ご投稿コーナー

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

採用になった方には、¥2,000の図書カードと認定証をご進呈いたします(詳しくはサイトをご覧ください)。奮って投句ください。

### NOTICE TO PURCHASER : LIMITED LICENSE

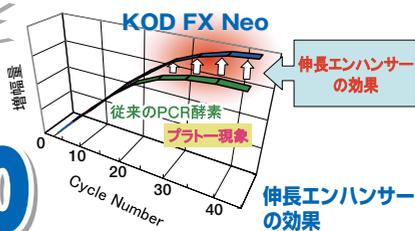
●PCR関連商品のラベルライセンスについての詳細は、弊社ウェブサイト ([www.toyobo.co.jp/bio](http://www.toyobo.co.jp/bio)) をご覧ください。

- 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。
- 本ページ掲載商品の価格(弊社希望価格)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劇物です。
  - ☒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。
  - ☒印は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(カルベ法)に基づく組換え体または昆虫細胞組換え体で生産された蛋白質です。

高効率・  
高成功率PCR酵素

**新製品**

# KOD FX Neo



## モニター募集のお知らせ

KOD FX Neo(本誌p1)は、ご好評いただいております高成功率PCR酵素「KOD FX」に、弊社で新たに見出した伸長エンハンサーを添加することで、さらなる高効率化を実現しました。特に、Long Target からの増幅、及びクルードサンプルからの増幅効率が向上しています。

この度、本試薬のモニターを募集いたします。応募いただいた方には評価用のキットを提供させていただきます。また、レポートと交換に¥1,000の図書カードなどを進呈いたします。詳しくは以下のサイトをご参照ください。

応募方法

弊社ウェブサイト  
([www.toyobo.co.jp/bio](http://www.toyobo.co.jp/bio))

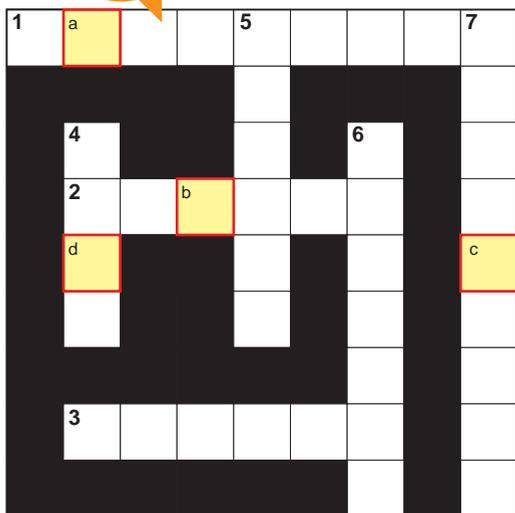
キャンペーン  
コーナー

【応募期間:2010年11月25日~2011年3月31日】

アルファ  
ベットを  
入れてください

## バイオ・クロスワードパズル ~元素編~

プレゼント  
付き



寒い夜はやっぱり、熱燗と

a b c d

ミツカギ

1. 窒素とリンと並んで植物の肥料に含まれる三大要素の一つです。アルカリ金属に分類されます。英語で?
2. 甲状腺ホルモンに含まれるハロゲン的一种です。
3. エビやカニの血液の成分の一つであるヘモシアニンに含まれる金属です。ちなみにヘモグロビンでは鉄がその役割を果たします。

タテのカギ

4. 転写因子等の補因子としてしばしば用いられる金属です。DNAとの結合に関与します。\_\_\_\_\_ finger という独特の構造が良く知られています。
5. 生体に重要な電解質のひとつで、ヒトではその大部分が細胞外液に分布している重要なアルカリ金属です。海の成分としても大量に含まれています。英語で?
6. 毒性を示す常温で液体の金属です。体温計などに使われます。
7. DNAポリメラーゼ等の補因子として働くアルカリ土類金属です。PCRの時に加えますよね。ニガリの主成分の一つです。

【以下の選択肢の中から選んでください】

LEAD ZINC IRON COPPER IODINE COBALT KARIUM  
CALCIUM SODIUM NATRIUM MERCURY MAGNESIUM  
POTASSIUM MANGANESE

バイオクロスワードパズルの解答に加え、UPLOADのアンケート(下記クイズコーナーに記載)にご回答いただいた方から抽選で、5名様にも2,000円分の図書カードをご進呈いたします。

ご応募はこちらから

1

弊社ウェブサイト  
([www.toyobo.co.jp/bio](http://www.toyobo.co.jp/bio))

2

読者のコーナー

3

クイズコーナー

※ご応募期間 2010年11月25日~2011年1月31日

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

TOYOBO

## 東洋紡績株式会社

◆◆ 納期・注文に関するお問合せ ◆◆

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)  
〒141-8633 東京都品川区東五反田二丁目10番2号  
東五反田スクエア  
TEL.03-6422-4819 FAX.03-6422-4951  
E-mail order\_lifescience@toyobo.jp

◆◆ 製品内容・技術に関するお問合せ ◆◆

テクニカルライン  
TEL.06-6348-3888 FAX.06-6348-3833  
開設時間: 9:00~12:00 13:00~17:00  
(土・日・祝を除く)  
E-mail tech\_osaka@toyobo.jp  
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>

PCRは  
東洋紡