

UPLOAD

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



ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix
with gDNA Remover
→本誌p.1~2に詳細記事がございます。

TECHNICAL REVIEW

- 1 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix
with gDNA Removerを用いたcDNA特異的検出例
-夾雑ゲノムDNA除去性能の確認-

特集

- 3 材料別・用途別 PCRプロトコール
 - 4 使用商品一覧
 - 5 様々なサンプルからのゲノムDNA抽出
 - 6 精製DNAからの増幅におけるPCR基本条件
 - 7 血液からの直接PCR
 - 8 マウステールライセートからのPCR
 - 9 ホルマリン固定組織(組織切片ライセート)からのPCR
 - 10 細胞壁を有する微生物(酵母・カビコロニー)からのPCR
 - 11 植物ライセートからのPCR

HOT ITEM

- 12 哺乳類細胞タンパク質高発現システム
Mammalian PowerExpress System®



2012 August
VOL. 99

ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Removerを用いたcDNA特異的検出例 -夾雑ゲノムDNA除去性能の確認-

東洋紡績（株） 敦賀バイオ研究所 杉山 明生

はじめに

リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析実験では、cDNAのみを検出することが重要です。多くの場合、エキソンジャンクションを挟む位置にプライマーを設計することで、鋳型RNAに混入したゲノムDNA (gDNA) に由来する増幅を回避することができます。しかしながら、cDNA特異的なプライマーが設計できないためにgDNAに由来する増幅が起こり、特に低発現遺伝子の研究などにおいて、発現量が正確に解析できない場合があります。

cDNA特異的Primerが設計できないケース

- ・ターゲットにイントロンがない (intronless遺伝子) か、あるいは、イントロンがあってもサイズが短く、十分な大きさのイントロンをまたぐ位置にプライマーを設定できない場合
- ・ターゲットに偽遺伝子 (Pseudogene) が存在する場合

ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Removerは、gDNA除去機能を付加した、リアルタイムPCR用逆転写反応キットです。本キットには、強力なDNA分解活性を有するgDNA Removerが付属されており、逆転写反応に先立って本試薬で鋳型RNAを処理することによって、ゲノムDNAフリーのcDNAを簡単に調製することができます。また、それぞれの反応に用いる試薬は、プレミックスタイプであり、容易に反応液を調製することができます。

今回は、本キットを用いてcDNA特異的検出を行った例をご紹介します。



方 法

(1) Total RNAの抽出

まず、市販のスピンカラムタイプのtotal RNA抽出キットを用いて、HeLa細胞からTotal RNAの抽出・精製をおこないました (カラム上でのDNase処理はなし)。抽出後、RNAの品質を確認するため、1%アガロースゲルを用いて電気泳動を行いました (右写真)。

(2) cDNA合成 (逆転写反応)

次に、抽出したHeLa Total RNA 500ngを、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて、逆転写酵素の有り (+) 無し (-) の条件で逆転写反応 (20µl反応系) を行いました。その際、逆転写無し (-) の条件には、キット付属のno-RT Controlを用いました。また、比較のため、gDNA除去機能を持たないcDNA合成キットを用いて、同様に逆転写酵素の有り (+) 無し (-) の条件にて逆転写反応を行いました。

(3) リアルタイムPCR

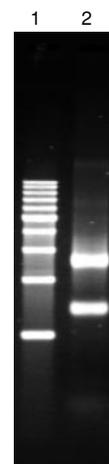
続いて、以下のリアルタイムPCR条件にて、TNF、ACTB、AMIGO3の各遺伝子の検出を行いました (N=2)。

試薬：THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No.QPS-201)

鋳型：(2) で調製した反応液2µl/20µl反応系 (持込量10%)

測定：Applied Biosystems 7900HT

各遺伝子の検出には、以下のプライマーセットを使用しました。



1 : 1kb DNA Ladder
2 : (1) で抽出した HeLa細胞由来 total RNA (200ng)

Primer set name	Target gene name	Target gene Symbol	Genbank Acc.	Target長	Exon junction	挟む場合の Intron size	Target 偽遺伝子
TNF-FR	Homo sapiens tumor necrosis factor	TNF	NM_000594	221bp	挟む	1084bp	-
ACTB-FR	Homo sapiens actin, beta	ACTB	NM_001101	188bp	挟む	441bp	有り
AMIGO3-FR	Homo sapiens adhesion molecule with Ig-like domain 3	AMIGO3	NM_198722	118bp	挟まない	-	-

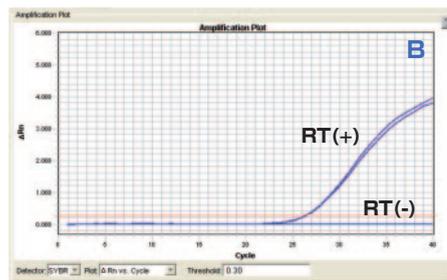
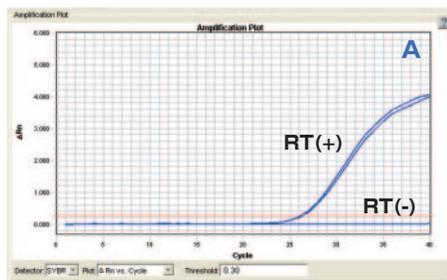
※AMIGO3は、intronがない (intronless) 遺伝子。http://www.bioinfo-cbs.org/igd

結果および考察

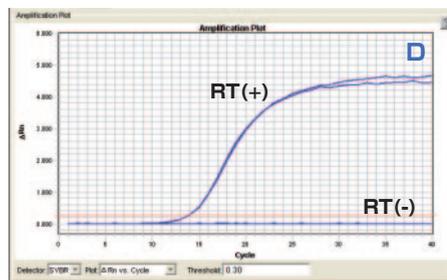
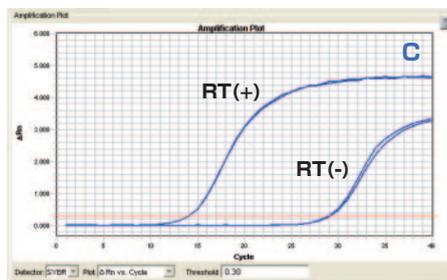
gDNA除去機能を持たない
cDNA合成キット

ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix
with gDNA Remover

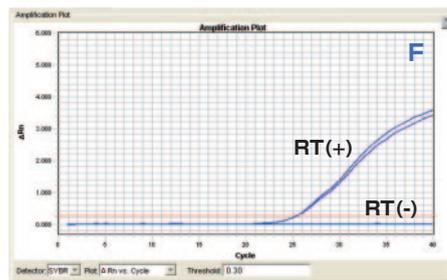
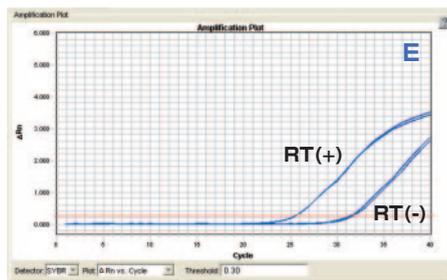
Target: TNF
Primer:エキソンジャンクション
を挟むプライマー
(イントロンサイズ:1,084bp)



Target: β -actin
Primer:エキソンジャンクション
を挟むプライマー
(イントロンサイズ:441bp)



Target: AMIGO3
Primer:エキソンジャンクション
を挟まないプライマー
(AMIGO3は, intronless遺伝子)



イントロンが十分に長いTNF (図A) では、RT (-) 条件で増幅はみられませんでした。偽遺伝子が存在するハウスキーピング遺伝子 β -actin (図C) やイントロンを挟まなかったAMIGO3 (図E) においては、RT (-) 条件でも増幅がみられました。 β -actinでは融解曲線解析の結果から、偽遺伝子由来の産物が優先的に増幅している可能性が示唆されました。このことから、gDNA除去機能をもたないcDNA合成キットの場合、プライマーセット (あるいはTarget) によっては、RNAサンプルに夾雑しているgDNAに由来するシグナルが検出されてしまう可能性があると考えられます。

これに対し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Removerでは、いずれの場合においても、RT (-) 条件で増幅がみられず (図B, D, F)、確実にgDNAが除去され、gDNAに由来するシグナルは検出されないことが確認されました。

まとめ

本実験でお示したように、cDNA特異的なPrimerが設計できない場合でも、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Removerを用いることによって、簡便に混入gDNA由来の増幅を回避することができます。この効果は、低発現遺伝子の発現解析を行う場合に特に有効になってくると考えられます。

また、本キットはマスターミックス化されており、簡便かつ正確に反応液を調製することができます。さらに、逆転写酵素のみを除いたno-RT Control試薬も付属しておりますので、上記のようなRT (-) 条件も簡単に採ることができます。Total RNA中のgDNAの残存が問題となる、あるいは、なりそうなリアルタイムPCR実験には是非一度お試しください。

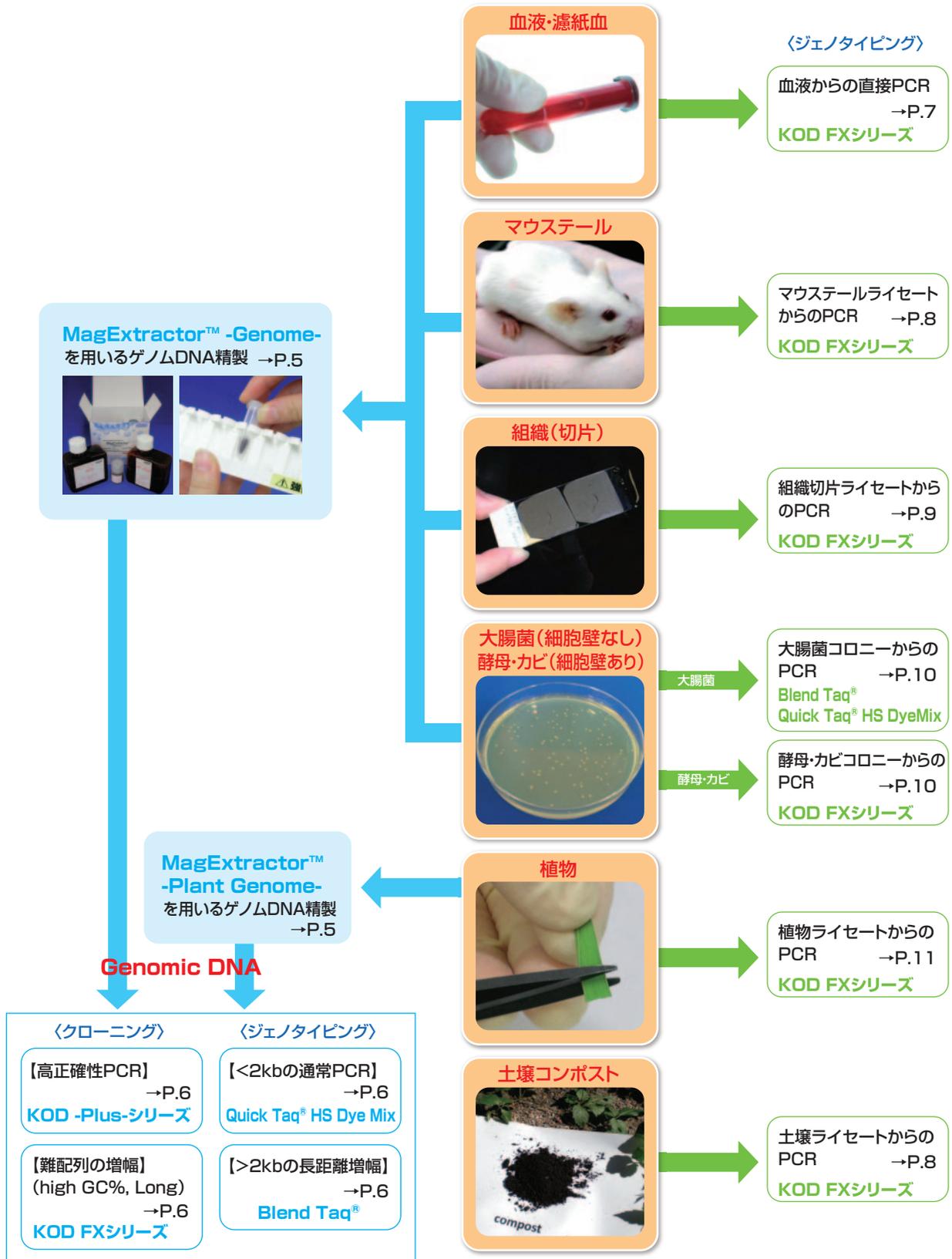
品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover ・gDNA Remover ・4x DN Master Mix ・5x RT Master Mix II ・5x RT Master Mix II no-RT Control ・Nuclease-free Water	200回用 (10 μ l反応)	-20 $^{\circ}$ C	FSQ-301	¥40,000

※リアルタイムPCR用マスターミックスTHUNDERBIRD®とのセット品もご用意しております。詳細は、弊社Webサイトにてご確認ください。

gDNAを含むRNAサンプルから簡便にgDNA-free cDNAを調製したい場合、あるいはRNA調製時に、時間とコストと手間のかかるDNaseI処理をされている方は是非一度お試しください。

材料別 用途別 PCRプロトコール

近年、実験材料・用途の多様化に伴い、簡便かつ効率的なPCRのための様々なプロトコールが考案されてきました。本特集では、材料別・用途別にプロトコールを整理し、分かりやすく解説いたします。



使用商品一覧

MagExtractor™ -Genome-



磁性ビーズを用いるDNA抽出キットです。全血や動物組織、微生物などから高純度のゲノムDNAを抽出することができ、抽出したDNAは主にPCRに使用することができます。

【用途】全血・動物・微生物サンプルからのゲノムDNA精製

MagExtractor™ -Plant Genome-

磁性ビーズを用いるDNA抽出キットです。植物組織は多糖を多く含みますが、本キットは多糖の混入を抑え、様々な材料から高純度なゲノムDNAを抽出することができます。

【用途】植物サンプルからのゲノムDNA精製

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
MagExtractor™ -Genome-	100回用	4℃	NPK-101	¥28,000
MagExtractor™ -Plant Genome-	100回用	4℃、室温	NPK-501	¥28,000
磁性スタンド Magical Trapper	1個	室温	MGS-101	¥38,000

※抽出は遠心法でも可能ですが、磁性スタンドを用いるとより簡便に行うことができます。

KOD -Plus-シリーズ



KOD DNA Polymeraseをもとに開発された高正確性PCR酵素です。Taqポリメラーゼの約80倍の正確性を示し、クローニング等の用途にご使用いただけます。KOD -Plus- Neoは伸長エンハンサーを含み、高速PCR、及び最長24kbまでの増幅が可能です。ホットスタートに対応します。

【用途】高正確性PCR

KOD FXシリーズ



KOD DNA Polymeraseをもとに開発された高成功率PCR酵素です。1) 難配列の増幅 (高G/C%, Long)、2) クールドサンプルからの増幅、3) 細胞壁を有する微生物 (酵母、カビ) からのコロニーPCRに力を発揮します。

KOD FX Neoは伸長エンハンサーを含み、高速PCR、及び最長40kbまでの増幅が可能です。正確性はTaqの約11倍であり、クローニング用としてもご使用いただけます。ホットスタートに対応します。

【用途】難配列PCR、クールドサンプルからのジェノタイプング、細胞壁を有する微生物からのコロニーPCR

Blend Taq®シリーズ



Taqポリメラーゼに微量の校正活性を有するポリメラーゼを混合することで、高効率、高感度を達成した高性能Taqです (混合型酵素)。最長で23kbまでの増幅が可能であり、その範囲で様々な用途に使用可能です。コロニーPCRにも最適です。Blend Taq® -Plus-はホットスタートに対応します。

【用途】一般的なPCR、Long PCR、コロニーPCR

Quick Taq® HS DyeMix



プレミックスTaqです。電気泳動用の色素を含んでおり、PCR後の溶液をそのまま電気泳動に供することができます。ホットスタートに対応します。

【用途】一般的なPCR、コロニーPCR

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD -Plus-	200U×1本 (200回用)	-20℃	KOD-201	¥30,000
KOD -Plus- Ver.2	200U×1本 (200回用)	-20℃	KOD-211	¥30,000
KOD -Plus- Neo	200U×1本 (200回用)	-20℃	KOD-401	¥30,000
KOD FX	200U×1本 (200回用)	-20℃	KFX-101	¥35,000
KOD FX Neo	200U×1本 (200回用)	-20℃	KFX-201	¥35,000
Blend Taq®	250U×1本 (200回用)	-20℃	BTQ-101	¥19,000
Blend Taq® -Plus-	250U×1本 (200回用)	-20℃	BTQ-201	¥21,000
Quick Taq® HS DyeMix	100回用	-20℃	DTM-101	¥9,800

※複数本組のお得なパックもございます。詳しくは、総合カタログやウェブサイトをご参照ください。

様々なサンプルからのゲノムDNA抽出

MagExtractor™シリーズは様々なサンプルから高効率かつ迅速にゲノムDNAを精製することができます。
ここでは、動物、微生物、及び植物からの抽出方法をご紹介します。

プロトコールA 様々な動物・微生物・全血サンプルからのゲノムDNA精製

【準備するもの】

- ・試薬 MagExtractor™ -Genome- (Code No. NPK-101)
70% エタノール 滅菌水
- ・器具 *Magical Trapper* (Code No. MGS-101) :
磁性スタンド
- ・材料 動物組織、酵母、血液(全血)

【前処理】

A) 溶解・吸着液によりサンプルを溶解する方法

- 組織片(10mg以下)または
マウステール(2~5mm程度)
- ↓ ← 850μl 溶解・吸着液
- ↓ ホモジナイズ(マイクロチューブ用ホモジナイザーを
使用して十分に行う)
- ↓ 遠心分離(10,000rpm., 5min.)
- 上清(約850μl)

B) Proteinase K消化によりサンプルを溶解する方法

- 組織片(10mg以下)または
マウステール(2~5mm程度)
- ↓ ← 90μl Proteinase K buffer (100mM NaCl,
10mM Tris-HCl (pH8.0), 25mM EDTA)
- ↓ ← 5μl 10mg/ml Proteinase K (30U/mg)
- ↓ ← 5μl 10% SDS
- ↓ 55°C, 6~18hr. 加温
(途中、2・3回混合し、消化を十分に行う)
- ↓ 遠心分離(10,000rpm., 5min.)
- 上清(約100μl)

- 酵母 (YPD培地で培養後に集菌したもの1~80.D相当)
- ↓ ← 100μl の10mg/ml Zymolyase 20T/Sorbitol溶液*
- ↓ ← 0.5μl の2-Mercaptoethanol
- ↓ 37°C, 1hr. 加温
- 全量(約100μl)

*Sorbitol溶液:
0.9M Sorbitol
0.1M Tris-HCl(pH8.0)
0.1M EDTA

【DNA抽出】

- 前処理サンプル A) (850μl)、B)、酵母または全血(100μl)
- ↓ 1.5mlチューブに分注
- ↓ ← 溶解・吸着液(前処理サンプルB)、酵母または
全血の場合のみ: 750μl)
- ↓ ← 40μl 磁性ビーズ(転倒攪拌して均一混和したもの)
- ↓ 10min. 攪拌
- ↓ 磁性スタンドで上清を除去
- ↓ ← 900μl 洗浄液 ← 2回行う
- ↓ 5sec. 攪拌
- ↓ 磁性スタンドで上清を除去 ← 2回行う
- ↓ ← 900μl 70%エタノール ← 2回行う
- ↓ 5sec. 攪拌
- ↓ 磁性スタンドで上清を除去
- ↓ ← 100μl 滅菌水
- ↓ 10min. 攪拌
- ↓ 磁性スタンドでビーズを除去
- 上清(精製DNA溶液)



プロトコールB 様々な植物サンプルからのゲノムDNA精製

【準備するもの】

- ・試薬 MagExtractor™ -Plant Genome- (Code No. NPK-501)
70%エタノール 滅菌水
クロロホルム/イソアミルアルコール
- ・器具 *Magical Trapper* (Code No. MGS-101) :
磁性スタンド
- ・材料 植物組織

【前処理】

- 植物サンプル0.01~0.1g
- 液体窒素の存在下でパウダー状に粉碎
- ↓ 1.5ml のチューブにサンプルを移す
- ↓ ← 300μl 溶解液
- ↓ ボルテックスミキサーを使用して10sec. 激しく攪拌
- ↓ 65°C, 10min. 加温
- ↓ ← 300μl クロロホルム/イソアミルアルコール
- ↓ 3~5sec. 激しく上下に振って混合
- ↓ 遠心分離(12,000rpm., 1min.)
- 上清(約250μl)

【DNA抽出】

- 前処理サンプル(約250μl)
- ↓ 1.5ml チューブに分注
- ↓ ← 40μl 磁性ビーズ(転倒攪拌して均一混和したもの)
- ↓ 1min. 激しく混合
- ↓ 磁性スタンドで上清を除去
- ↓ ← 900μl 洗浄液 ← 2回行う
- ↓ 5sec. 激しく混合
- ↓ 磁性スタンドで上清を除去 ← 2回行う
- ↓ ← 900μl 70%エタノール ← 2回行う
- ↓ 5sec. 激しく混合
- ↓ 磁性スタンドで上清を除去
- ↓ ← 100μl TE buffer
- ↓ 1min. 激しく混合
- ↓ 磁性スタンドでビーズを除去
- 上清(精製DNA溶液)



精製DNAからの増幅におけるPCR基本条件

精製したDNAを用いるPCRは大きく分けて、「クローニング用」と「検出・ジェノタイピング用」に分けることができます。ここでは、4種類のPCR試薬を用いる増幅をご紹介します。

KOD -Plus- Neo

(クローニング用)

滅菌蒸留水	X <μl>	
10XPCR Buffer	5	
2mM dNTPs	5	
25mM MgSO ₄	3	
10pmol/μl プライマー 各0.75-1.5		
KOD -Plus- Neo (1U/μl)	1	Genomic DNA ~200ng/50μl Plasmid DNA ~50ng/50μl cDNA ~200ng/50μl
テンプレート	Y	
	50μl	

*プライマーのTm値が63℃以下の場合は、3ステップで行います。

KOD Neoシリーズサイクル条件*

<2ステップサイクル>

94℃	2 min.	
98℃	10 sec.	25~45 cycles
68℃	0.5 min./kb	

<3ステップサイクル>

94℃	2 min.	
98℃	10 sec.	25~45 cycles
(Tm)℃	30 sec.	
68℃	0.5 min./kb	

<ステップダウンサイクル>

94℃	2min.	
98℃	10sec.	5cycles
74℃	0.5min./kb	
98℃	10sec.	5cycles
72℃	0.5min./kb	
98℃	10sec.	5cycles
70℃	0.5min./kb	
98℃	10sec.	15~30 cycles
68℃	0.5min./kb	
68℃	7min.	

*2ステップサイクルで増幅がみられない場合は3ステップサイクルをお試しください。また、エキストラバンドあるいはスメアが認められた場合はステップダウンサイクルをお試しください。

KOD FX Neo

(クローニング・検出・ジェノタイピング用)

滅菌蒸留水	X <μl>	
2XPCR Buffer	25	
2mM dNTPs	10	
10pmol/μl プライマー 各0.75-1.5		
KOD FX Neo (1U/μl)	1	Genomic DNA ~200ng/50μl Plasmid DNA ~50ng/50μl cDNA ~200ng/50μl
テンプレート	Y	
	50μl	

*プライマーのTm値が68℃未満の場合は、3ステップで行います。

Target Clone™ -Plus-

KOD -Plus-シリーズ、KOD FXシリーズで増幅したPCR産物の末端は平滑化されています。高効率TAクローニングキット「Target Clone™ -Plus-」には、増幅産物の末端にdAを付加するための試薬が添付されており、KODシリーズのPCR産物を高効率でTAクローニングすることができます。

<A付加反応>

PCR産物	9 <μl>
10XA-attachment Mix	1
	10μl

↓
60℃, 10min

<ライゲーション>

滅菌蒸留水	(3-X) <μl>
2XLigation buffer	5
pTA2 Vector	1
上記処理済みPCR産物	X
T4 DNA Ligase	1
	10μl

↓
室温 (15~25℃) 30min

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
Target Clone™ -Plus-	10回用	-20℃	TAK-201	¥16,000

Blend Taq®

(検出・ジェノタイピング用)

滅菌蒸留水	X <μl>	
10XPCR Buffer	5	
2 mM dNTPs	5	
10pmol/μl プライマー 各1		
Blend Taq® (2.5U/μl)	0.5	Genomic DNA ~1,000ng/50μl Plasmid DNA ~50ng/50μl
テンプレート	Y	
	50μl	

*プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップで行います。

<2ステップサイクル>

94℃	2min.	
94℃	30sec.	30 cycles
68℃	1min./kb	

<3ステップサイクル>

94℃	2min.	
94℃	30sec.	30 cycles
(Tm-5)℃	30sec.	
72℃	1min./kb	

Quick Taq® HS DyeMix

(検出・ジェノタイピング用)

滅菌蒸留水	X <μl>	
2xQuick Taq® HS DyeMix	25	
10pmol/μl プライマー 各1		
テンプレート	Y	Genomic DNA ~200ng/50μl Plasmid DNA ~50ng/50μl
	50μl	

*プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップで行います。

<2ステップサイクル>

94℃	2min.	
94℃	30sec.	25~40 cycles
68℃	1min./kb	

<3ステップサイクル>

94℃	2min.	
94℃	30sec.	25~40 cycles
(Tm-5)℃	30sec.	
68℃	1min./kb	

血液からの直接PCR

KOD FXシリーズは、血液に含まれるヘムや抗凝固剤に含まれるヘパリンなどの多糖の阻害を受けにくいという性質を有しています。ここでは、KOD FXを用いる全血、及び濾紙にしみこませた血液（濾紙血）を用いて直接増幅する方法をご紹介します。

全血サンプルからの増幅例

EDTA採血管によって採血したヒト全血（1～4μl）をサンプルとして、1.3kbのβ-globin遺伝子の増幅を行いました。

【準備するもの】

- ・試薬 KOD FXもしくはKOD FX Neo
- ・材料 ヒト血液（EDTA採血、ヘパリン採血など）

【反応液組成】

滅菌蒸留水	7～10 <μl>
2x PCR buffer for KOD FX	25
2mM dNTPs	10
10pmol /μl Primer F	1.5
10pmol /μl Primer R	1.5
KOD FX (1.0U/μl)	1
血液	1～4
Total	50μl

【サイクル条件】

94°C	2 min.	} 30 cycles
98°C	10 sec.	
68°C	1 min.	

【結果】



【プライマー配列】

1.3 kb β-globin Target
Forward primer : 5' -TTAGGCCTTAGCGGGCTTAGAC-3'
Reverse primer : 5' -CCAGGATTTTGTATGGGACACG-3'

【考察】

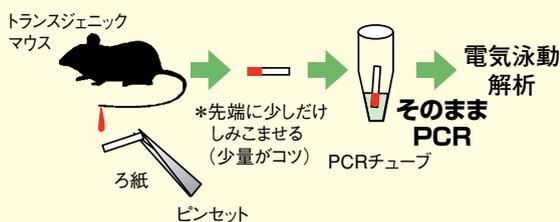
Taq DNA Polymeraseでは全く増幅が確認できませんでしたが、KOD FXでは血液量にほぼ比例して増幅産物の増加が見られました。これは、KOD FXが血液中の夾雑物によるPCR阻害をほとんど受けていないことが示唆されます。

濾紙血を用いる方法

【準備するもの】

- ・試薬 KOD FXもしくはKOD FX Neo
- ・材料 マウス等の血液

【前処理】



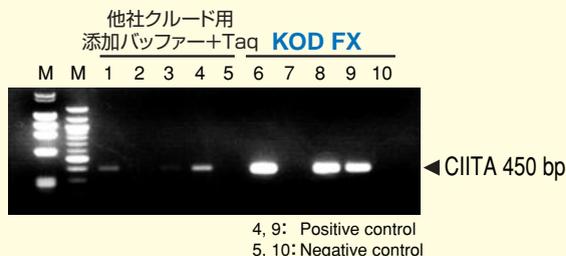
【反応液組成】

滅菌蒸留水	11 <μl>
2x PCR buffer for KOD FX	25
2mM dNTPs	10
10pmol /μl Primer F	1.5
10pmol /μl Primer R	1.5
KOD FX (1.0U/μl)	1
Total	50μl

【サイクル条件】

94°C	2 min.	} 30 cycles
98°C	10 sec.	
60°C	30 sec.	
72°C	40 sec.	
72°C	7 min.	

【結果】



【考察】

クルードサンプル用添加バッファーを加えたTaq DNA Polymeraseでは、弱い増幅しか得られませんでした。KOD FXでは、良好な結果が得られました。

データご提供 名古屋市立大学 医科学研究科 細胞分子生物 金澤 智先生

魚ヒレを用いて直接PCRを行うことも可能です。詳細につきましては、弊社ウェブサイト掲載、KOD FXのユーザー様からの実施例27をご参照ください。

マウステールライセートからのPCR

KOD FX シリーズは、クールドサンプルに含まれる不純物の阻害を受けにくく、様々なライセートからの増幅に向きます。ここでは、最近盛んになったトランスジェニックマウスのマウステールライセートからのPCRを中心にご紹介いたします。

【準備するもの】

- ・試薬 KOD FXもしくはKOD FX Neo
- ・材料 マウステール

【サイクル条件】

94°C 2 min.
98°C 10 sec. ←
68°C 2.5 min. } 30 cycles

【前処理】

アルカリ溶解法



【ターゲット】

Mouse membrane glycoprotein (Thy-1) gene<M10246>

【結果】

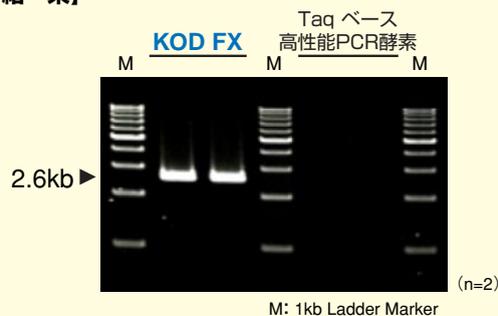


図1. マウステールライセートを用いたPCRの結果

【反応液組成】

●PCR	
滅菌蒸留水	10.5 μl
2x PCR Buffer for KOD FX	25
2mM dNTPs	10
10pmol/ μl Primer F	1.5
10pmol/ μl Primer R	1.5
KOD FX (1U/ μl)	1
ライセート(アルカリ溶解法)	0.5 μl (最大2 μl)
Total	50 μl

※PCR産物の制限酵素処理

PCR産物	10 μl
制限酵素	1 μl (約10U)
Total	11 μl → 37°C, 60 min

【プライマー配列】

Primer F: 5' -CCACAGAATCCAAGTCGGAAGTCTTG-3'
Primer R: 5' -GTAGCAGTGGTGGTATTATACATGGTG-3'

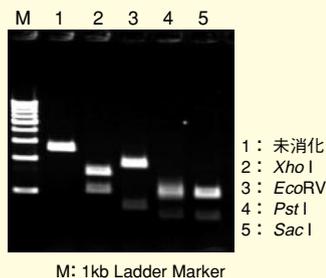


図2. PCR産物の制限酵素消化結果

【考察】

KOD FXはマウステール中の夾雑物の影響をほとんど受けないことが分かります。明瞭な増幅が認められ、また、PCR産物の制限酵素での消化も、今回用いた酵素では良好でした。アルカリ溶解法は、Proteinase Kを用いる方法よりも手間が少ないため、本方法を行うことにより、より簡便にトランスジェニックマウスの遺伝子解析ができるものと思われま

アルカリ溶解法を用いて、昆虫やコンポストでPCRを行なうこともできます。詳細につきましては、弊社ウェブサイト掲載のKOD FXのユーザー様からの実施例19やKOD FX Neoの実施例7をご参照ください。

ホルマリン固定組織（組織切片ライセート）からのPCR

【準備するもの】

- ・試薬 KOD FXもしくはKOD FX Neo
- ・材料 ホルマリン固定パラフィン包埋材料(ヒト)
(今回使用した切片は厚さ約10 μ mで、
大きさは1cm \times 2cm程度)



【反応液組成】

滅菌蒸留水	3.6 (μ l)
2x PCR buffer for KOD FX	10
2mM dNTPs	4
10pmol/ μ l Primer F	0.5
10pmol/ μ l Primer R	0.5
KOD FX (1.0U/ μ l)	0.4
精製DNA ①またはライセート ②	1 *
Total	20 μl

*20 μ lのPCR反応系に対しては、①は100ng
②は1 μ lの添加を目安とします。

【前処理】

- 5~10 μ mパラフィン包埋切片を1.5mlチューブに移す
- ↓
- 脱パラフィン
キシレンを入れ5分放置後遠心してキシレンを除去
(3回繰り返す)
- ↓
- 脱キシレン
100%エタノールを入れ5分放置してエタノールを除去
(4回繰り返す)
- ↓
- エタノールを除いた後、70 $^{\circ}$ C・5分でエタノールを完全に除去
- ↓
- 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 300 μ lを加えた後、
Proteinase K(10mg/ml)を10 μ l加え、
37 $^{\circ}$ Cで一晩放置
- ↓
- 加熱処理 (70 $^{\circ}$ C、10 min)
⇒ そのままPCR用サンプルとして使用②
- ↓
- カラム精製(シリカメンブレンを用いたスピナカラムタイプを使用)
⇒ DNA鑄型として使用①

※本実験では、10mM Tris-HCl (pH 8.0)を300 μ l添加していますが、サンプル量に応じて50~300 μ lを使用します。Proteinase Kはその量に応じて、増減させてください。

※切片が大きいときは、bufferを加えた後、眼科用のはさみで1mm以下になるぐらいまで細かく切ってからProteinase Kを添加します。

※37 $^{\circ}$ Cで一晩おいて未消化の組織が多いときは、さらに5~10 μ l Proteinase Kを加えて2~3時間消化します。

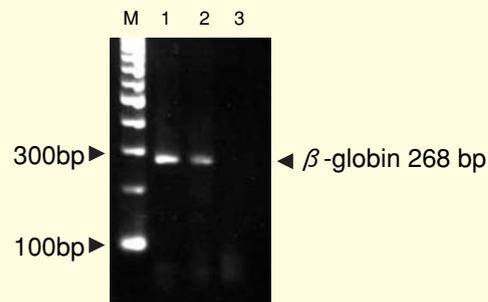
※組織の細胞密度や種類によって消化の具合はかなり変化します。線維組織はProteinase Kで消化されないため、筋肉や膜などが多い組織は完全には溶解しません。

【サイクル条件】

94 $^{\circ}$ C	15 min*	
↓		
98 $^{\circ}$ C	10 sec.	} 38 cycles
57 $^{\circ}$ C	30 sec.	
68 $^{\circ}$ C	30 sec.	

*ホルマリン固定組織から得られたDNAの増幅では、最初の変性ステップを7~15分程度に設定することで良好な結果を得ることができるようです。

【結果】



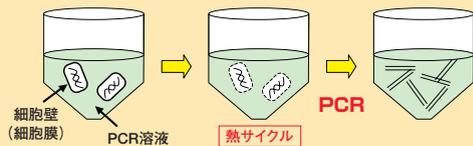
M: 100bp DNA Ladder
1: Proteinase K処理後、カラム精製したDNA①
2: Proteinase K処理後、70 $^{\circ}$ C10分処理した
クールドサンプル②
3: 滅菌蒸留水
(アプライ量:2 μ l / Lane)

【考察】

他社のポリメラーゼを用いた場合は、精製DNAを用いても増幅できない検体が多かったが、KOD FXを用いることで精製DNAおよび、Proteinase K処理後のパラフィン包埋材料のライセートから高効率にPCR産物を得ることができた。

データご提供 福岡大学 医学部 病理学講座 石黒 晶子先生、竹下 盛重先生、福重 智子先生

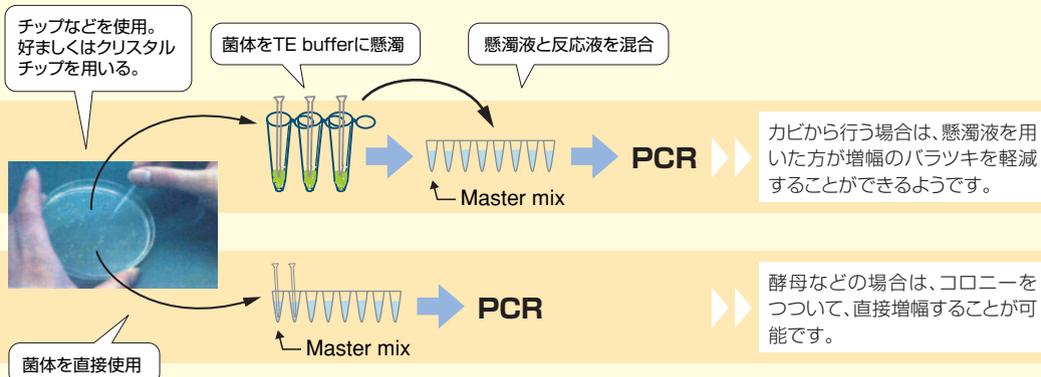
細胞壁を有する微生物（酵母・カビコロニー）からのPCR



解説

大腸菌などのグラム陰性菌からの直接PCRはプラスミドのインサート確認などで頻繁に行われますが、酵母やカビなどをサンプルとする場合、細胞壁が存在するため、通常、酵素処理が行われます。KOD FXシリーズは、バッファーに特別な技術を使用しており、熱サイクル中に細胞壁を効率よく破壊するため、多くの微生物を直接サンプルとしてPCRを行うことができます。

微生物からの直接PCR



【準備するもの】

- ・試薬 KOD FXもしくはKOD FX Neo
- ・材料 カビ、酵母

【前処理】

サンプルがカビの場合は、菌体をチップでつついてTE bufferに懸濁します。

【反応液組成（懸濁液を使用する場合）】

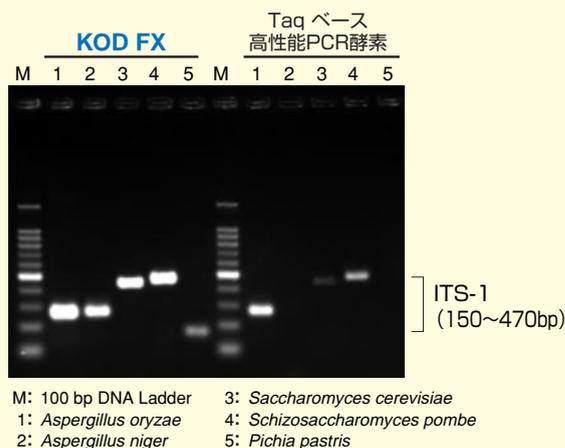
滅菌蒸留水	7 (μl)
2x PCR Buffer for KOD FX	25
2mM dNTPs	10
10pmol/μl Forward Primer	1
10pmol/μl Reverse Primer	1
KOD FX (1U/μl)	1
菌懸濁液*	5
Total	50 μl

*コロニーから直接行う場合はこの分だけ滅菌蒸留水を増やします。

【サイクル】

94°C	2 min.	} 30 cycles
98°C	10 sec.	
55°C	30 min.	
68°C	1 min.	

【結果】



【プライマー配列】

Primer F: 5'-GTAACAAGGT (T/C) TCCGT-3'
 Primer R: 5'-CGTTCCTT CATCGATC-3'

【考察】

KOD FXではカビ、酵母各種において、ターゲットが良好に増幅され、酵素処理を行わなくても、直接高効率検出が可能であることが確認できました。

大腸菌のような細胞壁を持たない微生物をサンプルとして用いる場合は、KOD FXシリーズの他にBlend Taq[®]、QuickTaq[®] HS DyeMixでも同様にColony Direct PCRを行っていただくことが可能です。

植物ライセートからのPCR

KOD FXシリーズは、植物に含まれるクロロフィルや多糖などの成分の阻害を受けにくいという特長があります。ここでは、植物ライセートを用いるPCRをご紹介します。

【準備するもの】

- ・試薬 KOD FXもしくはKOD FX Neo
- ・材料 トマト葉、タバコ葉、イネ葉、精米

【前処理】

ワンステップ法またはホモジナイズ法

ワンステップ法

① 葉 (3mm角) 精米 (1粒) → ② マイクロチューブへ

③ Buffer A 100 μ l添加
Buffer A: 100mM Tris-HCl (pH9.5), 1M KCl, 10mM EDTA
Vortexにて良く攪拌

④ 95°C・10 min.
Vortexにて良く攪拌

⑤ 上清1 μ l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)

ホモジナイズ法

① 葉 (3mm角) → ② マイクロチューブへ

③ Buffer A 100 μ l添加
Buffer A: 100mM Tris-HCl (pH9.5), 1M KCl, 10mM EDTA
Vortexにて良く攪拌

④ ベッセルを用いてホモジナイズ

⑤ 上清1 μ lをPCR反応液に添加

【反応液組成】

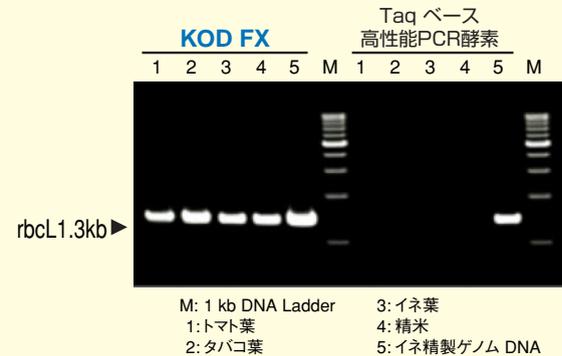
●PCR	
滅菌蒸留水	10 (μ l)
2x PCR Buffer for KOD FX	25
2mM dNTPs	10
10pmol/ μ l Primer F	1.5
10pmol/ μ l Primer R	1.5
KOD FX (1U/ μ l)	1
ライセート (ワンステップ法)	1
Total	50 μl

【サイクル条件】

94°C	2 min.	} 30 cycles
98°C	10 sec.	
68°C	1.5 min.	

【結果】

本方法を用いることで、トマト、タバコ、イネの葉、及び精米のライセートをサンプルとして、明瞭な増幅が認められました。



【プライマー配列】

- Primer F1: 5' -ATGTCACCACAAAACAGAGACTAAAGC-3' (トマト&タバコ用)
- Primer R1: 5' -AAGCAGCAGCTAGTTCCGGGCTCCA-3' (トマト&タバコ用)
- Primer F2: 5' -ATGTCACCACAAAACAGAAACTAAAGC-3' (イネ用)
- Primer R2: 5' -AAGCTGCGGCTAGTTCAGGACTCCA-3' (イネ用)

【考察】

KOD FXは植物由来の阻害物質の影響を受けにくいことがわかりました。ワンステップ法 (もしくはホモジナイズ法) とKOD FXを組み合わせることで、植物の遺伝子解析を簡便化できると思われまます。

※ワンステップ法でPCRがかからない場合でも、ホモジナイズ法で結果が得られる場合があります。詳細につきましては、弊社ウェブサイト掲載のKOD FXのユーザー様 からの実施例26をご参照ください。

非営利団体様
向けに販売開始

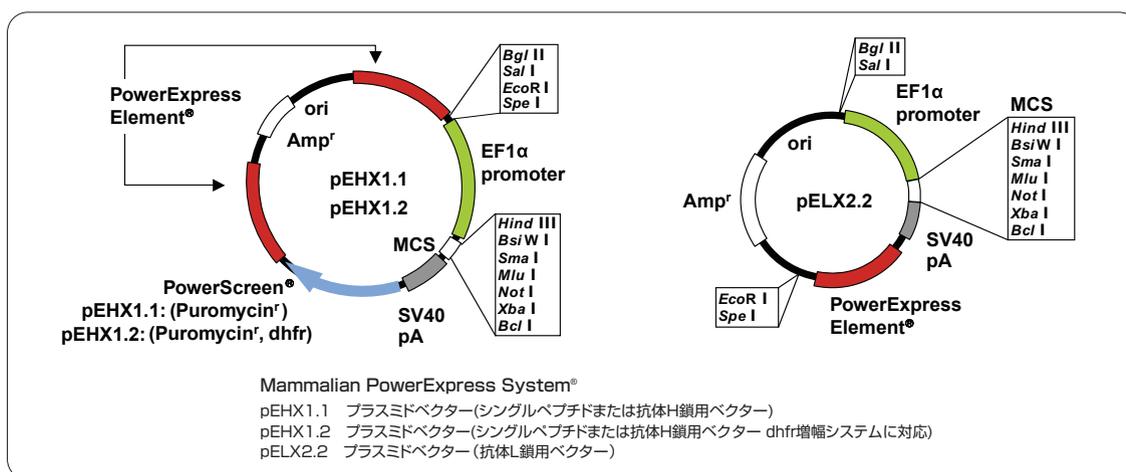
哺乳類細胞タンパク質高発現システム

Mammalian PowerExpress System®

医薬品、診断薬、検査キット用タンパク質の生産に適した高発現システムです。

Mammalian PowerExpress System®は医薬品、診断薬、検査キットなどに使用される抗体等のタンパク質の生産に適した哺乳類細胞タンパク質高発現ベクターシステムです。Mammalian PowerExpress System®では、遺伝子発現安定化のためのPowerExpress Element®と、高発現細胞株の効率的な選択のためのPowerScreen®テクノロジーにより、目的タンパク質を安定かつ高度に生産する細胞株を効率的に取得することができます。

本製品は、すでに製薬企業など営利団体様向けに契約締結の上でご利用いただいておりますが、様々なお客様からのご要望にお応えして、この度、非営利団体様向けにも販売を開始することになりました。非営利団体様以外のお客様は、これまで同様、契約締結の上でのご利用をお願いいたします。



特長1 遺伝子発現の安定化

・CHO (チャイニーズハムスター卵巣) 細胞のゲノムより単離された遺伝子発現安定化エレメントPowerExpress Element®を発現ベクターに配置しています。PowerExpress Element®により、導入部位のゲノム環境により目的タンパク質の発現が不活性化される現象を低減し、導入された遺伝子の発現を安定化しています。

図1はPowerExpress Element®を含む抗体発現ベクターを導入して取得した2つのクローンの継代安定性を調べた結果です。各クローンの1継代と20継代の発現量比を縦軸にとりました。抗生物質を添加して選択圧をかけた場合 (Puromycin (+))、抗生物質を添加せずに選択圧をかけなかった場合 (Puromycin (-))、いずれの場合も1継代と20継代の発現量の比は100%前後となり、20継代後でも発現量が低下していないことがわかります。

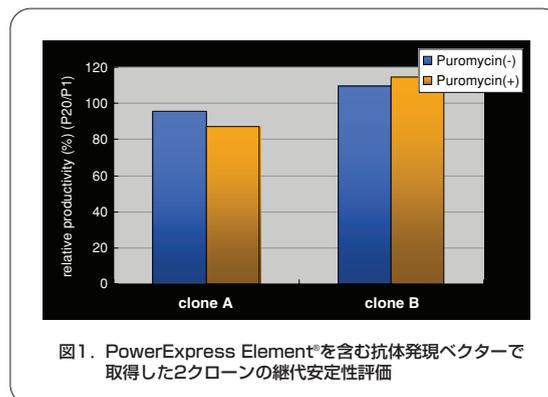


図1. PowerExpress Element®を含む抗体発現ベクターで取得した2クローンの継代安定性評価

特長2 高発現クローン選択の効率化

・弱化した薬剤選択マーカーを使用し、目的タンパク質高発現株の取得効率を高めています (PowerScreen®テクノロジー)。PowerScreen®テクノロジーにより薬剤選択培養後に生じるコロニーの数は約10分の1に減少し、生じたコロニーの多くが目的タンパク質を高度に発現しています。

特長3 dhfr遺伝子を用いた遺伝子増幅に対応

・pEHX1.2プラスミドベクターはdhfr遺伝子をコードしており、MTX (メトレキセート) による遺伝子増幅が可能です。

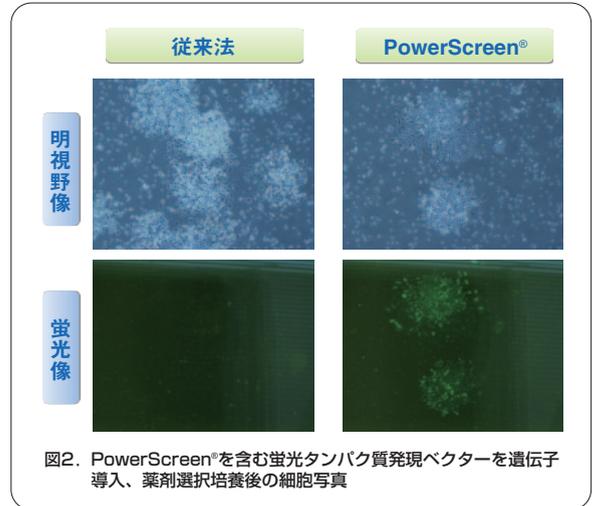


図2. PowerScreen®を含む蛍光タンパク質発現ベクターを遺伝子導入、薬剤選択培養後の細胞写真

特長4 ラボスケールから工業化スケールでの製造まで多様な用途

・抗体医薬などのバイオ医薬品の治験薬製造、市販品製造用としてはもちろんのこと、開発候補品選択のための多種類サンプル生産用としても有効です。

実施例1 抗体発現ベクターの構築

- ・pEHX1.1のマルチクローニングサイトに抗体重鎖遺伝子を挿入しpEHCを得ました。
- ・また、pELX2.2のマルチクローニングサイトに抗体軽鎖遺伝子を挿入しpELC2を得ました。
- ・pEHCのBglII-EcoRI間にpELC2のBglII-EcoRI断片を挿入し、抗体発現ベクターpELC2+HCを得ました。

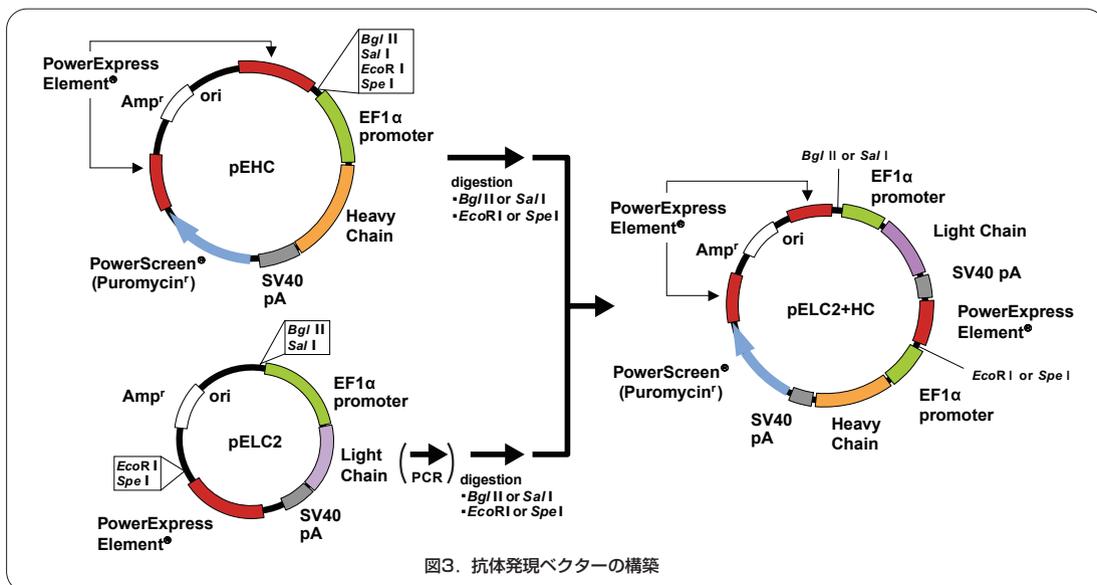


図3. 抗体発現ベクターの構築

実施例2 抗体発現における従来ベクターとMammalian PowerExpress System®との比較 (クローンプール状態での比較)

抗体の重鎖、軽鎖遺伝子を、

1. 従来ベクター
2. PowerExpress Element®ベクター (PowerScreen®テクノロジーは使用していません)
3. Mammalian PowerExpress System®ベクターへ、それぞれ挿入し、CHO-K1細胞へ遺伝子導入、薬剤選択培養後、選択された細胞のクローン化を行う前のプール状態で、抗体の生産性を評価しました。Mammalian PowerExpress System®ベクターでは、従来ベクターに比べ5倍以上生産性が向上することを確認しました。

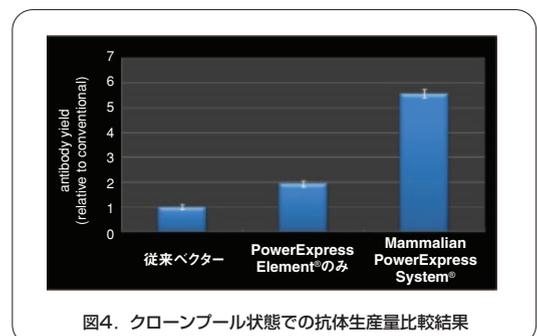


図4. クローンプール状態での抗体生産量比較結果

実施例3 抗体発現における従来ベクターとMammalian PowerExpress System®との比較 (モノクローン化した状態での比較)

実施例2の、1.従来ベクター、3.Mammalian PowerExpress System®ベクターを用いて取得した薬剤選択培養後の細胞集団を限界希釈して、96ウェルプレート2枚に播種しました。2週間後、それぞれのクローンの抗体生産量を測定し、度数分布で比較しました。Mammalian PowerExpress System®では、クローンの分布が高発現側へ顕著にシフトしていることを確認しました。

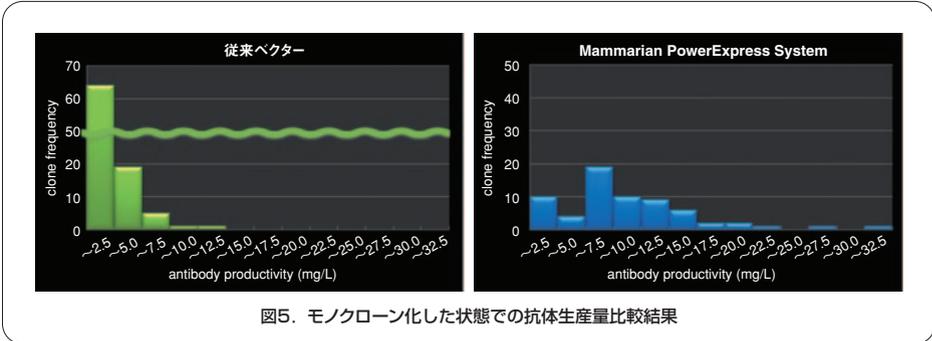


図5. モノクローン化した状態での抗体生産量比較結果

実施例4 dhfr遺伝子を含むMammalian PowerExpress System®でのMTXによる選択効果の検討

- ・抗体の重鎖遺伝子を、dhfr遺伝子を含むpEHX 1.2のマルチクローニングサイトへ挿入しpEHC2を得ました。
- ・実施例1と同様に、軽鎖遺伝子を含むpELC2のBglII-EcoRI断片をpEHC2のBglII-EcoRIサイトに挿入し抗体発現ベクターpELC2+HC2を得ました。
- ・pELC2+HC2をCHO/dhfr-細胞へ遺伝子導入後、薬剤選択培養により安定発現細胞集団を取得しました。この細胞集団から取得した高発現細胞クローンを、MTXで選択培養を行った後、細胞のクローン化を行う前のプールの状態で抗体の生産性を評価しました。MTXでの選択培養により最大で3倍、平均して1.8倍の生産性の増加が可能であることを確認しました。

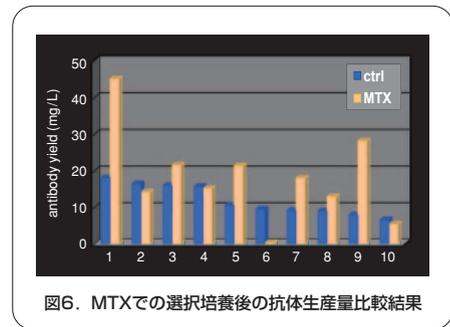


図6. MTXでの選択培養後の抗体生産量比較結果

* 詳細は東洋紡・テクニカルライン (tech_osaka@toyobo.jp) までお問い合わせください。

(保存・輸送温度: -20℃)

品名	用途	包装	Code No.	非営利団体様向け価格
pEHX1.1	シングルペプチド用、抗体H鎖用	10μg	MPH-101	¥150,000
pEHX1.2	シングルペプチド用、抗体H鎖用 (遺伝子増幅対応)		MPH-102	¥200,000
pELX2.2	抗体L鎖用		MPL-202	¥50,000

詳細はこちらをご覧ください。
https://lifescience.toyobo.co.jp/detail/detail.php?product_detail_id=116



東洋紡ライフサイエンス事業部は、1982年にライフサイエンス研究用試薬の発売を開始し、今日まで試薬の製造・販売、及び研究者への情報の提供に取り組んで参りました。

今年30周年を迎え、益々皆様のお役に立てるよう、邁進してまいり所存です。この度、日頃の感謝を込めまして、PCR酵素をはじめ様々な試薬において、記念キャンペーンを実施しております。是非、この機会にご利用いただきますよう、お願いいたします。

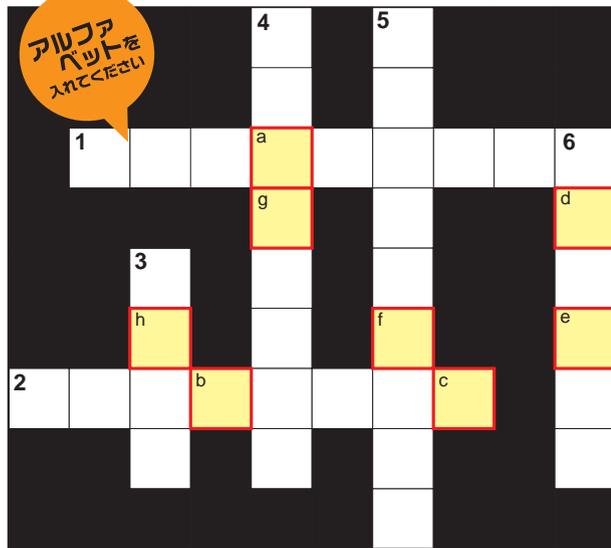
詳細は、キャンペーンサイトをご参照ください。

<http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/lifescience/products/campaign/index.html>

バイオ・クロスワードパズル ~病気の名前編~



アルファベットを入れてください



ミミのカギ

1. アルコールやウイルスなど、様々な原因で肝臓に発症する病気です。
2. 白血球の癌です。

タテのカギ

3. 血中の尿酸が原因で発症します。贅沢病とも言われ、とても痛い病気です。
4. 生活習慣病の一種です。ヘモグロビンの糖化などで診断します。
5. 傷んだものを食べたときに起きます。Food _____。
6. 生活習慣病の一種です。脳の血管の詰まりが原因で発症します。

【以下の選択肢の中から選んでください】

GOUT GAUT STROKE TUMOUR ASTHMA
ADIPOSIOS DIABETES NECROSIS MELANOMA
LEUKEMIA CARCINOMA POISONING
POSITIONING PNEUMONIA HEPATITIS GASTRITIS

a b c d e f g h

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)

2

読者のコーナー

3

クイズコーナー

※ご応募期間 2012年8月20日~2012年10月31日

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

TOYOBO

130TH

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