

高成功率PCR酵素『KOD FX』を用いた 毛根サンプルからの簡便な増幅例

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、様々な増幅実験において確実にPCR産物を得ることができます。特に、その優れた「増幅成功率」については、クルードなサンプルを鑄型に用いる場合においても十分に発揮されます。

例えば、全血や培養細胞を直接PCR反応液に添加した場合においても、良好な増幅が得られることを確認しています。また、マウスステールや植物サンプル（葉、米粒）の場合は、簡便な前処理にて調製したライセートをPCR反応液に添加するだけで、確実に増幅産物が得られます。つまり、従来、サンプルからDNAを一旦精製してから行っていたようなPCR実験も、『KOD FX』を用いることによって、DNAの精製が不要になったり、簡単な前処理のみでPCR増幅が可能になります。

今回は、クルードかつ微量サンプルからの実施例として、毛根サンプルからの簡便なPCR増幅を試みました。毛根サンプルは、非侵襲的に取得できることから、法医学の分野のみでなく、分子生物学実験にも用いられることがあります。しかし、毛根サンプルは、微量なためDNA含量が少なく、かつ毛髪中の色素メラニンはPCR阻害物質であることから、DNAを精製するには高度な技術と労力が要求されます。そこで、ここでは、『KOD FX』とアルカリ抽出法を組み合わせることによって、毛根サンプルからDNAを精製することなく、簡便にPCR増幅を行うことを試みました。その方法および結果をご紹介します。

方 法

(1) アルカリ溶解法による毛根ライセートの調製

毛根は、ヒト毛髪の根元から約2mm程度のところで切断し、毛根を含む部分をサンプルとしました。これを5本使用し、図1に示すアルカリ溶解法にてライセートを調製しました。なお、本方法では、毛根は完全に溶解しませんのでご注意ください（完全に溶解させる必要はありません）。また、溶解液の核酸濃度は測定できませんでした。

(2) PCR反応

PCR反応は、(1)で調製したライセート2 μ lを直接PCR反応液に添加し、以下の条件にて実施しました。

① 反応液組成

PCR grade water	9	μ l
2x 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
毛根ライセート	2	μ l
KOD FX (1.0U/ μ l)	1	μ l
Total reaction volume	50	μ l

Target: ヒト β -globin 1.3kb

Primer #1: TTAGGCCTTAGCGGGCTTAGAC

Primer #2: CCAGGATTTTTGATGGGACACG

② PCRサイクル^{*1}

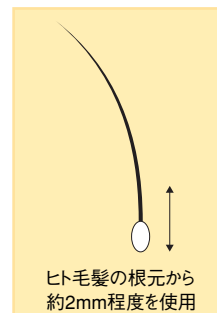
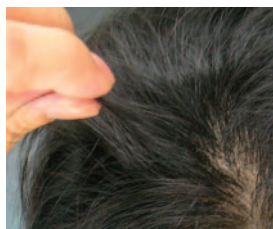
94°C, 2min.

98°C, 10sec.

68°C, 1.5min^{*2} } 40 cycles

^{*1} プライマーのTm値が73°C未満の場合は、Tm-5°C、30sec.のアニーリングステップを加えた3ステップのサイクルをお薦めします。

^{*2} 1 min./kbを目安に設定します。



毛根（上図ご参照）5本

↓ ←50mM NaOH 18 μ lを加え、Vortexにて良く攪拌

↓ 95°C 10min インキュベート

↓ ←1M Tris-HCl (pH8.0) 2 μ lを加え、Vortexにて良く攪拌

↓ 12,000rpm 5min

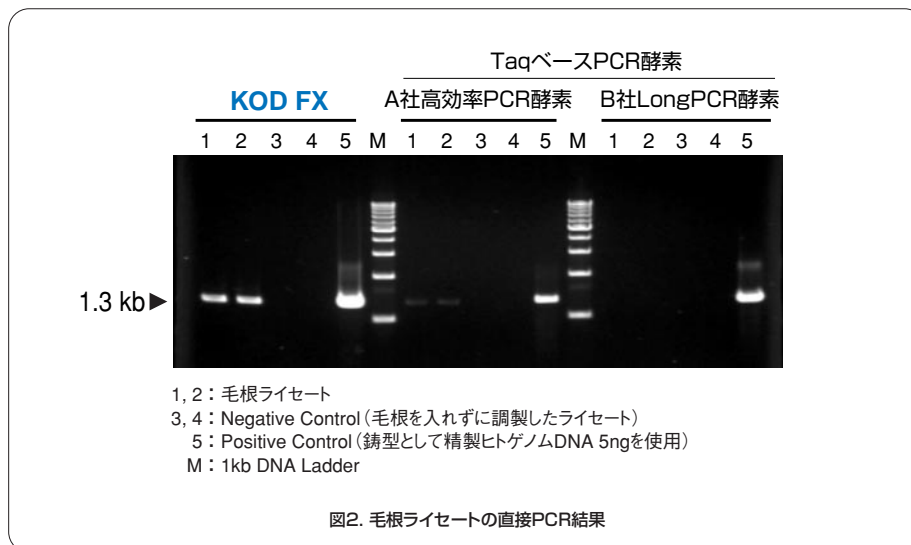
上清2 μ lをPCR反応に使用

（※熱アルカリ溶液の取り扱いに十分ご注意ください。）

図1. 毛根ライセートの調製方法（アルカリ溶解法）

また、比較のためTaqベースの他社PCR酵素を用いて、取り扱い説明書推奨の条件にてPCRを実施し（サイクルは同じく40サイクル）、比較を行いました。

結果および考察



PCR産物を、1%アガロースゲルに5μlアプライして解析を行いました(図2)。その結果、KOD FXを用いた場合のみ、明瞭な増幅が確認できました。一方、比較に用いたTaqベースのPCR酵素では、精製したゲノムDNAを用いたポジティブコントロールでは増幅が確認できるものの、毛根ライセートをサンプルとした場合には、ほとんど増幅が見られませんでした。

毛根サンプルに存在するDNA量はごく微量であるため、そのDNAを増幅する場合、細胞中でのコピー数が多いミトコンドリアDNAをターゲットとするのが一般的です。しかし今回、KOD FXでは、簡便な「アルカリ溶解法」で調製したライセートを鋳型に、核DNA上の1.3kbという比較的長いターゲットでも増幅が可能でした。これは、従来のTaqベースのPCR酵素と比較して、KOD FXがクルードサンプルに強いことに加え、増幅効率の点においても圧倒的に優れていることによるものと考えられました。

まとめ

毛根等の微量サンプルからのDNA精製は、高度な技術が必要であり、かつ大変神経を使う作業を伴います。さらに、DNA抽出におけるステップが増えるほど、クロスコンタミネーションの危険も高まり、多検体処理も困難になります。一方、上述の「アルカリ溶解法」は短時間でPCR用のサンプルを調製可能であり、KOD FXと組み合わせることで、簡便・迅速に微量サンプルからの遺伝子増幅を実現することができます。微量生体サンプルを用いるPCR実験をされる際は、是非、本方法をお試しください。

マウステールや植物サンプル実施例はこちら!

1 弊社ウェブサイト
www.toyobo.co.jp/bio

2 KOD FXコーナー

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
	(200U×1本) × 10 [2,000回用*]	-20℃	KFX-101X10	¥260,000
2×PCR Buffer for KOD FX	1.7ml×3本	-20℃	KFX-1B	¥5,000

* 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。

NEW
NEW

関連商品

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD用高効率TAクローニングキット TArget Clone™ -Plus-	10回用	-20℃	TAK-201	¥16,000