

### 3 難配列の増幅



#### 実施例1 ヒトジストロフィン遺伝子の増幅とクローニング

ヒトジストロフィン(DMD)遺伝子は、真核細胞における最も長いmRNAの一つです。今回、KOD FXを用いて本遺伝子の全長クローニングを行いました。

#### 【方 法】

以下のようなフローに従って、ジストロフィン遺伝子を増幅した後に、プラスミドにクローニングを行い、得られた5 クローンの遺伝子配列を確認しました。



逆転写反応  
1<sup>st</sup> Strand 合成キット: ReverTra Ace -α -(Code No.: FSK-101)  
RNA: Human Adult Skeletal Muscle total RNA (Code No.: CA1H60) 1μg / 20μl Reaction  
逆転写Primer: Oligo(dT)<sub>20</sub> primer

#### KOD FXを用いたPCR

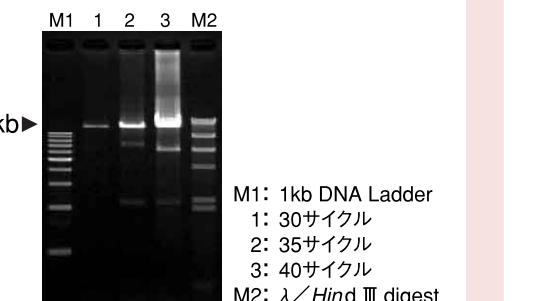
【プライマー配列】 Primer F: GATGGCCTTGTGCGCTACTGGAGCAATAAGTTGAAGAACCTTTACAGG  
Primer R: GACGGCCTATGTGGCCACACGAAATAATGTCAAATTAAATTATGC  
(下線部はSfi Iサイト)

【サイクル】 94°C 2min.  
98°C 10sec. ↘ 30 or 35 or 40 cycles  
68°C 14min ↗ 30 cycles  
※プライマーのTm値が73°C未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

#### 制限酵素部位を用いてベクターにクローニング後、シーケンス解析

#### 【結 果】

PCRの結果、40サイクルの条件で明瞭な13.5kbの増幅が確認できました。  
また、シーケンシングの結果、5クローン中1クローンにおいて、PCRエラーによる変異のないDMD遺伝子の全長を取得することができました。



#### 【考 察】

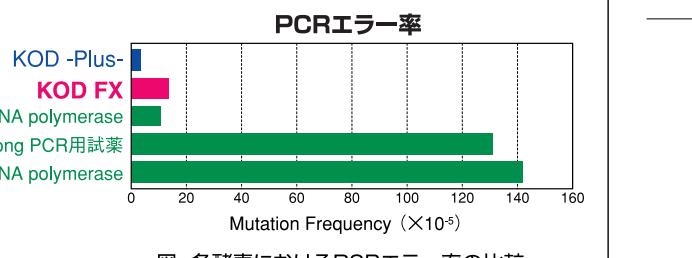
KOD FXはKOD -Plus-では増幅が困難な比較的長いターゲットを直接増幅してクローニングするような用途に適していると思われます。本酵素は、KOD -Plus-に比べて正確性は低いですが、Taqベースの酵素に比べると格段に正確性が良いので、このような用途に適していると思われました。

### KOD FXの正確性について

KOD FXは強い3'-5'エキソヌクレアーゼ活性(校正活性)を示します。KOD FXのPCRエラーによるミス塩基の取り込み頻度(エラー率)は、実際にシーケンシングにて解析した144,535塩基中、わずか19塩基でした。このエラー率は、Taqや他社Long PCR用酵素の約11倍優れている値でした。

※さらに、正確性良く増幅したい場合はKOD -Plus-シリーズをお薦めします。

**（PCRエラー率の測定方法）**  
各酵素にてヒトゲノムDNAを錆型にβ-globin領域2.4kbの増幅を行い、PCR産物をTAクローニング後、96クローンをピックしてシーケンシングを行い、配列を確認しました。



### 実施例募集

KOD FXでは、今回紹介した以外に、様々な用途で使用されはじめています。  
そこで、KOD FXを用いた新事例を募集いたします。詳しくは、以下のサイトをご参照ください。  
過去の実施例もこのサイトでご覧いただけます。

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

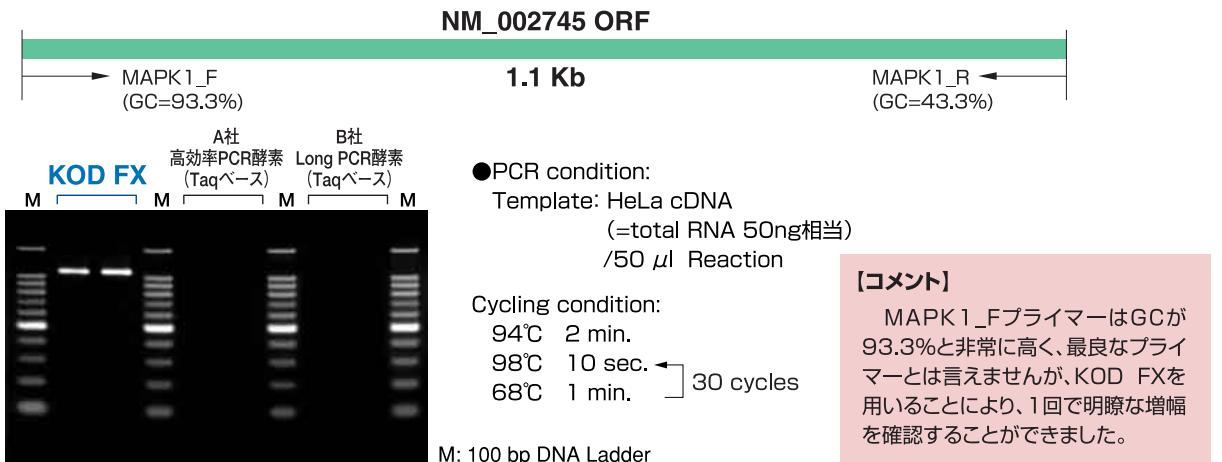
KOD FXコーナー

#### 実施例2 GC=93.3%のプライマーを用いたORF全長の増幅

配列情報が少なく、オープンリーディングフレーム(ORF)の末端にしかプライマーを設計できないような時など、必ずしも最良なプライマーベアを設計できるとは限りません。以下に、通常のプライマーの設計が困難なターゲットの例として、MAPK1遺伝子(下記参照)のORFの増幅を行った結果をお示します。

【ターゲット】 NM\_002745 Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), transcript variant 1

【プライマー配列】 開始コドン(MAPK1\_F下線)から終止コドン(MAPK1\_R下線)を増幅するように設計  
MAPK1\_F: ATGGCGCCGCCGGCGCGCGGGCGCGGG (30mer) <GC=93.3%>  
MAPK1\_R: TTAAGATCTGTATCCTGGCTGGAATCTAGC (30mer) <GC=43.3%>



【コメント】  
MAPK1\_FプライマーはGCが93.3%と非常に高く、最良なプライマーとは言えませんが、KOD FXを用いることにより、1回で明瞭な増幅を確認することができました。

品名及び内容	包 装	Code No.	価 格
KOD FX KOD FX (1 U/μl) 2×PCR Buffer for KOD FX* 2 mM dNTPs	200 U×1本 1.7 ml×3本 1 ml×2本	200 U×1本(200回用)	KFX-101 ¥35,000
KOD FX	(200 U×1本)×5(1000回用) (200 U×1本)×10(2000回用)	KFX-101X5 KFX-101X10	¥140,000 ¥260,000

\*終濃度2.0mMのMg<sup>2+</sup>を含有します。

#### 関連商品 ●TAクローニング試薬 (KOD用)

品名及び内容	包 装	Code No.	価 格
TArgent Clone™ -Plus- pTA2 Vector (50 ng/μl) 2×Ligation Buffer T4 DNA Ligase 10×A-attachment mix	10 μl 50 μl 10 μl 10 μl	10回用	TAK-201 ¥16,000
10×A-attachment mix 10×A-attachment mix Ligation high Ver.2	25 μl 750 μl×1本(100回用)	25回用	TAK-301 LGK-201 ¥12,000 ¥22,000

※KOD FXで増幅されたDNAの末端は平滑化されているため通常のTAクローニング法ではクローニングすることができません。TArgent Clone™ -Plus-には、TベクターとDNAリガーゼとは別に、10×A-attachment mixが含まれています。この10×A-attachment mixには、抗KOD DNA polymerase抗体とTaq DNA polymeraseが含まれているため、未精製のPCR産物にこの試薬を添加して、60°C・10分間加温することで容易に3'末端にdAを付加することができます。付加反応の後、産物をそのままTベクターとリゲーションさせることができます。また、お手持ちのTベクターにクローニングしたい場合は、別売の10×A-attachment mix (Code No. TAK-301)と高効率リゲーションキット Ligation high Ver.2 (Code No. LGK-201)を用いることで効果的にTAクローニングすることができます。

### 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.06-6348-3788 FAX.06-6348-3833  
E-mail: [order\\_lifescience@toyobo.jp](mailto: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2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](mailto: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](mailto:tech_osaka@toyobo.jp)  
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>

### 高成功率PCR酵素

# KOD FX

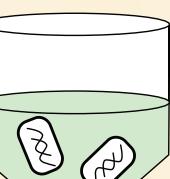
## 実施例集2

新テクノロジーが生み出す可能性をあなたの研究室でも。

Time is Money



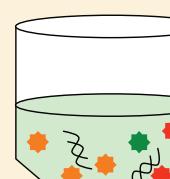
### 直 接



細胞壁を持つ微生物からの直接PCR

酵母 カビ 真菌  
プランクトン など

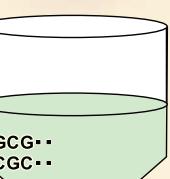
### ク ル ー ド



ヘムやクロロフィル、タンパク質、多糖等を含むサンプル  
(ライセート等)からの直接PCR

マウス tail 植物 血液  
固定組織 毛根 ショウジョウバエ など

### 難配列



• GC含量の偏った遺伝子など、難配列の増幅

• 粪便DNAなど、夾雜DNAが多いサンプルからの目的遺伝子の検出

サンプルを準備しております。代理店様へご依頼ください。

TOYOB

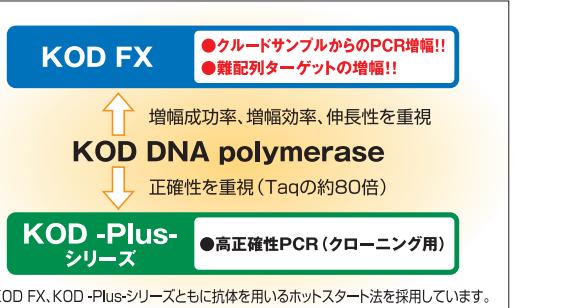
2009.12.20.000

## KOD FXの特性

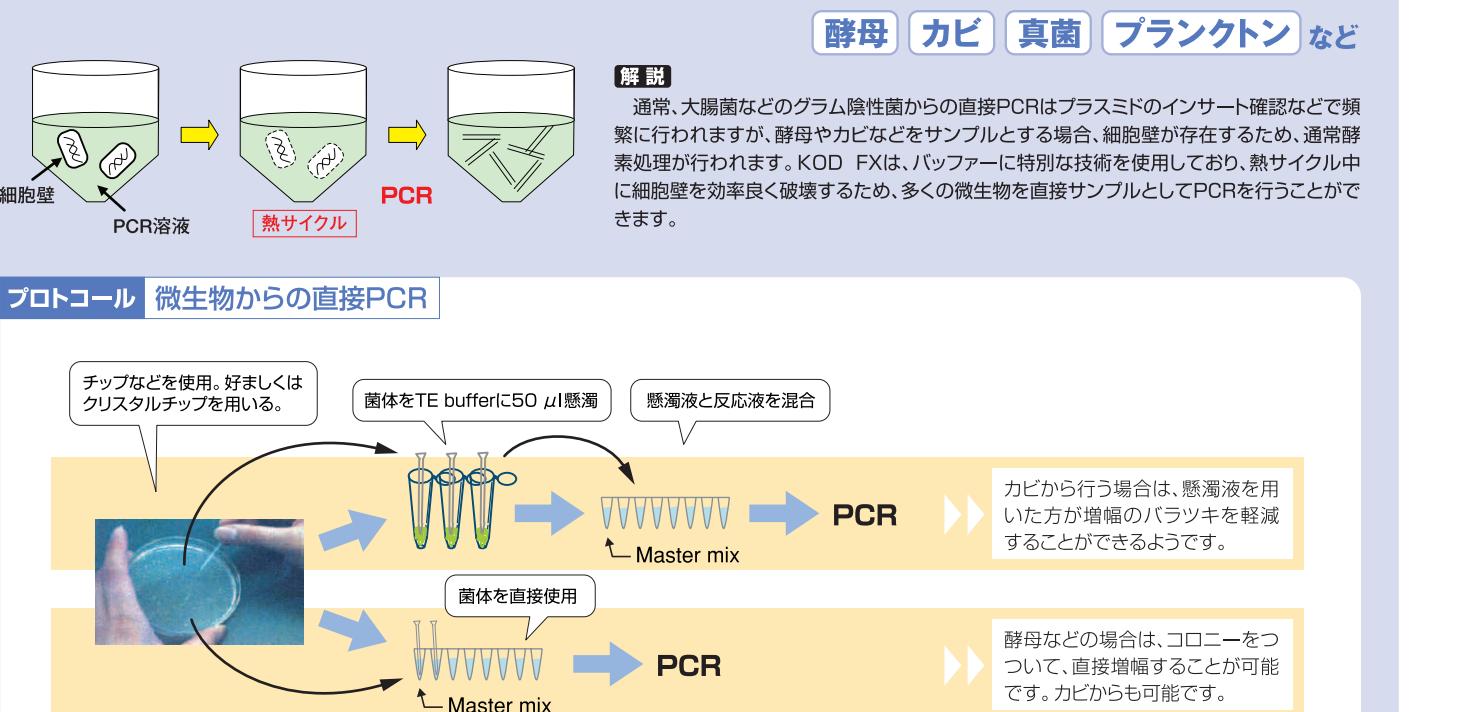
『KOD FX』は、様々な優れた特性を有するPCR酵素『KOD DNA Polymerase』をベースに開発された高性能PCR試薬です。本酵素は、優れた「増幅成功率」、「増幅効率」、「伸長性」を示し、幅広いPCRにおいて確実にPCR産物を得ることができます。KOD -Plus-シリーズがKOD DNA polymeraseの高い正確性に着目して開発されたのに対し、本酵素は「増幅成功率」、「増幅効率」、「伸長性」を重視して開発された酵素であるといえます。

特に、KOD FXのその優れた「増幅成功率」は、クレードなサンプルを直接録型に用いる場合においても発揮されることを確認しています。すなわち、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、煩雑なDNAの精製が不要になったり、簡単なサンプルの前処理のみでPCR実験が可能になります。

本実施例集が、今まで確認実験に費やされてきた試薬コスト、そしてなによりも先生方の貴重な時間を節約するためのヒントになれば幸いです。



## 1 細胞壁をもつ微生物からの直接PCR



**[PCR組成(懸濁液を使用する場合)]**

滅菌蒸留水	9<μl>
2x PCR Buffer for KOD FX	25
2mM dNTPs	10 (0.4mM)
10 pmol/μl Forward Primer	1.5
10 pmol/μl Reverse Primer	1.5
KOD FX (1U/μl)	1
菌などの懸濁液*	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.
98°C	10 sec. ←
50°C	30 sec. ←
68°C	1 min. ←
	30 cycles

ITS-1 (150~470bp)



**[プライマー配列]**

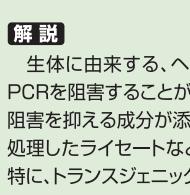
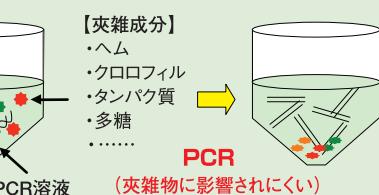
Primer F: 5'-GTAACAAAGGT (T/C) TCCGT-3'  
Primer R: 5'-CGTTCTTCATCGATC-3'

M: 100 bp DNA Ladder  
1: Aspergillus oryzae  
2: Aspergillus niger  
3: Saccharomyces cerevisiae  
4: Schizosaccharomyces pombe  
5: Pichia pastoris

[参考文献] BioTechniques, 19: 394 (1995)

## 2 クレードサンプル等からの増幅

ライセト マウステール 植物 ホルマリン固定組織 ショウジョウバエ 毛根 / 直接 血液 体液 濾紙血 哺乳類培養細胞 など



また、血液や哺乳類培養細胞なども直接増幅可能です。

**プロトコール マウステール①**



**プロトコール マウステール②**



**【基本反応条件】**

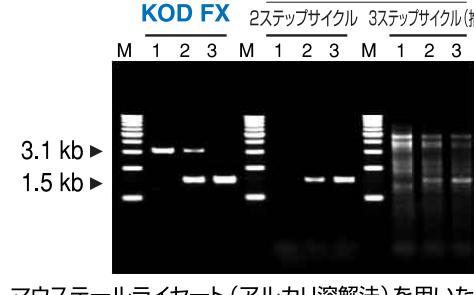
滅菌蒸留水	X μl
2x PCR buffer for KOD FX	25 μl
2mM dNTPs	10 μl (0.4mM)
10 pmol/μl Primer F	1.5 μl (0.3μM)
10 pmol/μl Primer R	1.5 μl (0.3μM)
KOD FX (1.0U/μl)	1 μl (1U)
Genomic DNA	~200ng
Plasmid DNA	~50ng
cDNA	~200ng (RNA相当)
クレードサンプル	0.5~2 μl*
Total	50 μl

**注意**

\*この量は初めて実験する際の目安です。ワンステップ法の植物ライセトは~1 μl、血液は~4 μl、哺乳類培養細胞は~2×10<sup>6</sup>細胞が適量であることが分かれています。

\*\*プライマーのTm値が73°C未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

**【結果】**



※サンプルおよびプライマー情報は国立衛生環境センター・荒井勇二先生よりご提供いただきました。

※W: Wild type locus  
Tg: Targeted locus

**プロトコール 植物(トランスジェニック植物)**



**【ターゲット】**

rbcl (1.3kb)

**【サイクル】**

2ステップサイクル(30サイクル)

94°C, 2 min.

98°C, 10 sec. ←

68°C, 1 min./kb ←

25~40 cycles

74°C, 1 min./kb ← 5 cycles

78°C, 10 sec. ← 5 cycles

72°C, 1 min./kb ← 5 cycles

98°C, 10 sec. ← 5 cycles

70°C, 1 min./kb ← 5 cycles

98°C, 10 sec. ← 15~25 cycles

68°C, 1 min./kb ←

7 min.

**【結果】**



## FAQコーナー

**Q1 プライマー設計などに関して何かコツはありますか?**

**A1** ため、カートリッジ精製、もしくはHPLC精製グレードのプライマーのご使用をお薦めします。

**Q2 マルチブレックスPCRに応用したいのですが、コツはありますか?**

**A2** 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ターゲットのプライマー量を1.5倍程度に増やし、サイクル数を若干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。

**【ターゲット】**

CIITA 450bp

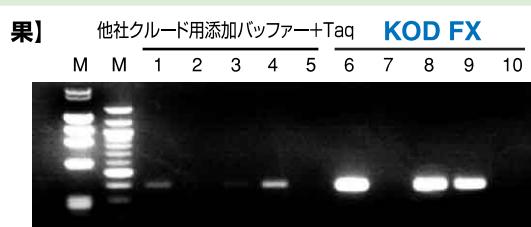
**【サイクル】**

3ステップサイクル(30サイクル)

**【結果】**

他社クレード用添加バッファー+Taq

M M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



\*本実験では、10mM Tris-HCl (pH8.0)を300 μl添していますが、サンプル量に応じて50~300 μl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、脱脂用のはさみで1mm以下になるぐらいうで細かく切ってからProteinase Kを加えて2~3時間消化します。

\*37°Cで一晩おいて未消化の組織が多いときは、さらに5~10 μl 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で消化されないので、筋肉や臍などが多い組織は完全には溶解しません。

\*20 μlのPCR反応系に対して、①は100ng②は1 μlの添加を自安とします。

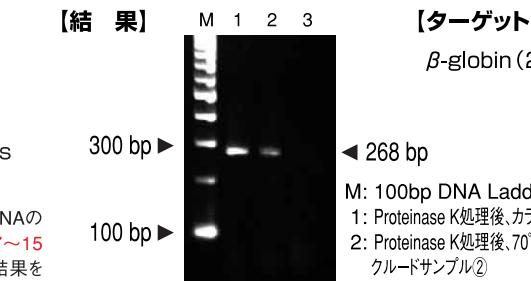
\*37°Cで一晩おいて未消化の組織が多いときは、bufferを加えた後、脱脂用のはさみで1mm以下になるぐらいうで細かく切ってからProteinase Kを加えて2~3時間消化します。

\*PCR反応系に対して、①は100ng②は1 μlの添加を自安とします。

カラム精製(シリカメンブレンを用いたスピンドラムタイプを使用) ⇒ DNA録型として使用①

**【結果】**

M 1 2 3



\*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ます。

**【先生からのコメント】**

他社のポリマーラーゼを用いた場合、精製DNAを用いても増幅できない検体が多かった。一方、KOD FXを用いることで精製DNA及び、Proteinase K処理後のパラフィン包埋材料のライセトから高効率にPCR産物を得ることができた。小さな組織の場合、精製するとDNAがより少なくなるので、精製しないでPCRに使えるのが良い。

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ます。