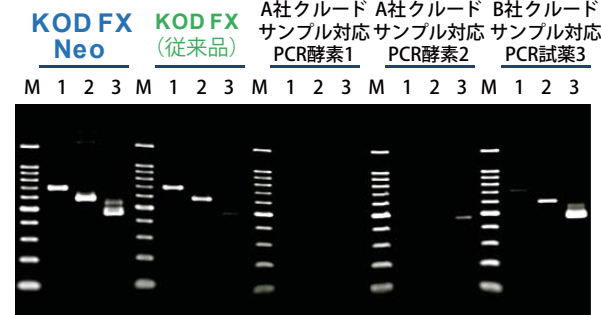


応用例 コンポスト(堆肥)を用いたメタゲノム解析

コンポスト(堆肥)から、さまざま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勧めします)。

また、アルカリ溶解法によって調製した上清を用いて、さまざま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)。



M: 100 bp 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)

【プライマー】

- 1 Fwd: ATTAGATACCCCTDGTAGTCC
Rev: TACCTTGTTACGACTT
- 2 Fwd: AGGGTCATTGGAAACTGGG
Rev: CGTGTGTAGCCAGTCCATA
- 3 Fwd: GGCCTTCGGGTTGTAACC
Rev: CTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGC

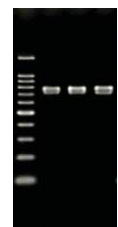
【サイクル条件】

94°C 2min.
98°C 10sec. Y cycles
X °C 30sec. Y cycles
68°C 30sec. Y cycles
4°C Hold

PCR 酵素 1 X: 50°C Y: 23 cycles
PCR 酵素 2 X: 60°C Y: 33 cycles
PCR 酵素 3 X: 65°C Y: 33 cycles

KOD FX Neo

M 1 2 3



【サイクル条件】
94°C 2min.
98°C 10sec. 24~26 cycles
55°C 30sec.
68°C 1min.
4°C Hold

M: 100 bp DNA ラダー
1: アルカリ溶解法 [24 cycles]
2: ワンステップ法 [24 cycles]
3: CTAB 法 (従来法) [26 cycles]

【プライマー】

Fwd: GTTTGATCCTGGCTCA
Rev: TACCAGGGTATCTAATCC



【アルカリ溶解法】

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

【ワンステップ法】

土壌 100 mg
↓ ←Buffer A* 100 μL
↓ Vortex にて良く攪拌
↓ 95°C, 10 min. インキュベート
↓ 遠心 12,000 rpm, 5 min.
上清
↓ 滅菌水で 10 倍に希釈し、1 μL を PCR 反応液 50 μL 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	包装*	保存温度	Code No.	価格
高効率・高成功率 PCR 酵素 KOD FX Neo <small>評価用サンプル ございます</small>	200 U×1 本 [200 回用]	-20°C	KFX-201	¥ 38,000
	(200 U×1 本)×5 本 [1,000 回用]	-20°C	KFX-201X5	¥ 152,000
	(200 U×1 本)×10 本 [2,000 回用]	-20°C	KFX-201X10	¥ 285,000

*50 μL 反応を行った時の反応回数で示しています。

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) TARget Clone™-Plus-	10 回用	-20°C	TAK-201	¥ 18,000

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。

※本資料に記載している会社名および商品名・ロゴマークなどは、各社の商号、商標または登録商標です。

TOYOBO 東洋紡株式会社

バイオプロダクト営業部

(E-mail) order_lifescience@toyobo.jp

(大阪) 〒530-0001

大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号

大阪梅田ツインタワーズ・サウス

TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833

(東京) 〒104-8345

東京都中央区京橋一丁目17番10号

住友商事京橋ビル

TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951

テクニカルライン

(E-mail) tech_osaka@toyobo.jp

TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833

(9:00~12:00 13:00~17:00 [土日祝日、休日を除く])

WEBサイト

[https://lifescience.toyobo.co.jp/]



サンプル請求

高効率・高成功率 PCR 酵素

KOD FX Neo

● 伸長性アップ
● クルードサンプルからの増幅性能アップ!

待望のクルード・難配列用 PCR 酵素!

お試しサンプル(20回用)をご用意しております。

伸長時間を 30sec./kb に短縮!

(クルードサンプルは 60sec./kb を推奨)

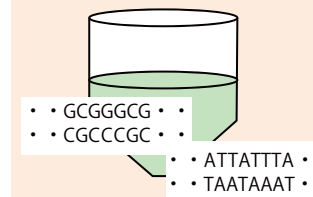
1 難配列の増幅

高GC/ATターゲット

Longターゲット (~40 kb)



植物葉、米



KOD FX シリーズのバッファーには、GC 含量の影響を受けにくくする成分が含まれており、本 PCR 酵素は高 GC ターゲットや、逆に高 AT ターゲットの増幅に力を発揮します。また、長距離の PCR が可能であり、長鎖の難配列をクローニングするような用途に大変有用です。KOD FX Neo は、「伸長エンハンサー」を採用することにより、伸長性能がさらに向上しました。

2 クルードライセートからの増幅

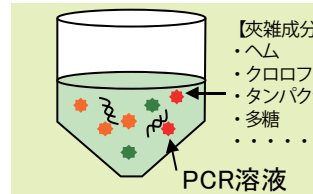
マウステール 植物 土壌 昆虫 ホルモン固定組織



マウステール



土壌サンプル



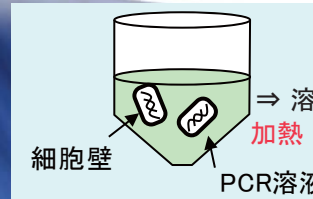
生体由来する、ヘムやクロロフィル、多糖などは PCR を阻害することが知られています。KOD FX シリーズには、それらの阻害を抑える成分が添加されており、マウステールや植物ライセートなどを用いて高効率な PCR を行うことができ、トランスジェニックマウスや植物などのジェノタイピングに大変有用です。KOD FX Neo は、「伸長エンハンサー」を採用することなどにより、クルードサンプルからの増幅性能が向上しました。

3 微生物・生体成分等からの直接PCR

酵母 カビ 真菌 植物 プランクトン 血液 哺乳類培養細胞



微生物サンプル



通常、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、グラム陽性菌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 シリーズのバッファーは、熱サイクル中に細胞壁を溶解する能力があるため、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。また、血液や哺乳類培養細胞などからも直接増幅可能であり、大変有用です。

「伸長エンハンサー」により、長鎖ターゲットやクルードサンプルでの増幅効率アップ

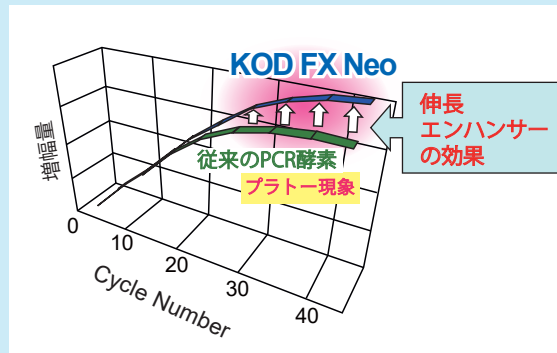
KOD FX Neo ってどんな酵素？



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好評いただいております。また、KOD FX は、高温下で細胞壁成分を破壊する特殊なバッファを採用しており、グラム陽性菌、酵母、カビなどからの直接 PCR においても定評を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、「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がさらに向上しています。

- <試薬構成>
- KOD FX Neo (200U)
 - 2×PCR Buffer for KOD FX Neo
 - 2mM dNTP
 - ※ホットスタート用の抗体を含有します。

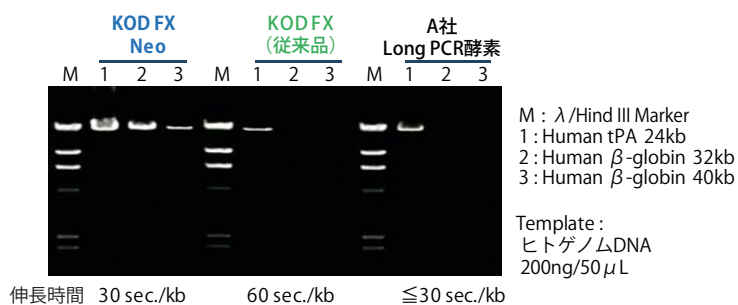
*M. Takagi et al., Appl. Environ. Microbiol., 63: 4504-4510 (1997)



特長 1 優れた伸長性

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の増幅が完了しました。

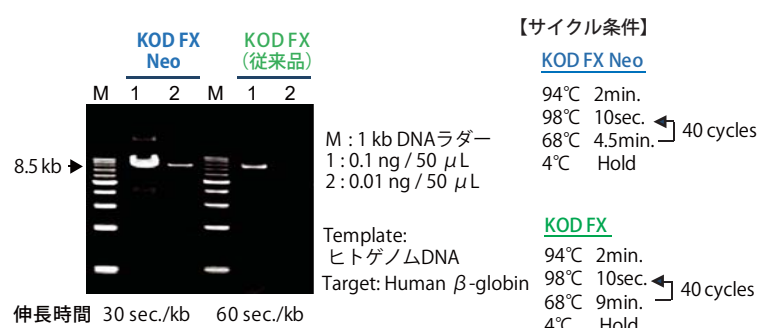


【サイクル条件】	KOD FX Neo	KOD FX
94°C 2min.	94°C 2min.	94°C 2min.
98°C 10sec.	98°C 10sec. ↖ 5 cycles	98°C 10sec. ↖ 5 cycles
74°C 30sec./kb	74°C 30sec./kb ↖ 5 cycles	74°C 60sec./kb
98°C 10sec.	98°C 10sec. ↖ 5 cycles	98°C 10sec. ↖ 5 cycles
72°C 30sec./kb	72°C 30sec./kb ↖ 5 cycles	72°C 60sec./kb
98°C 10sec.	98°C 10sec. ↖ 5 cycles	98°C 10sec. ↖ 5 cycles
70°C 30sec./kb	70°C 30sec./kb ↖ 5 cycles	70°C 60sec./kb
98°C 10sec.	98°C 10sec. ↖ 20 cycles	98°C 10sec. ↖ 20 cycles
68°C 30sec./kb	68°C 30sec./kb ↖ 20 cycles	68°C 60sec./kb
68°C 7min.	68°C 7min.	68°C 7min.
4°C Hold	4°C Hold	4°C Hold

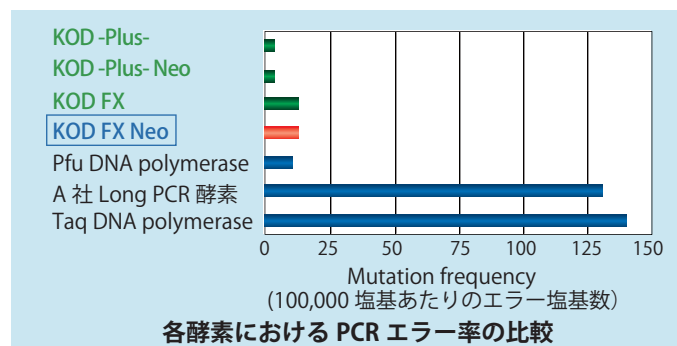
伸長時間が 30 sec./kb となり、長鎖ターゲットでより便利になりました。

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。



【サイクル条件】	KOD FX Neo	KOD FX
94°C 2min.	94°C 2min.	94°C 2min.
98°C 10sec.	98°C 10sec. ↖ 40 cycles	98°C 10sec.
68°C 4.5min.	68°C 4.5min.	98°C 10sec.
4°C Hold	4°C Hold	68°C 9min. ↖ 40 cycles
		4°C Hold

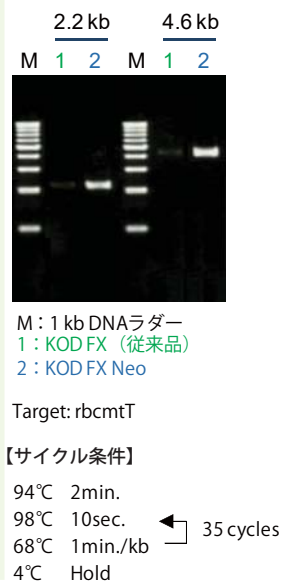


特長 2 クルードサンプルからの優れた増幅性能

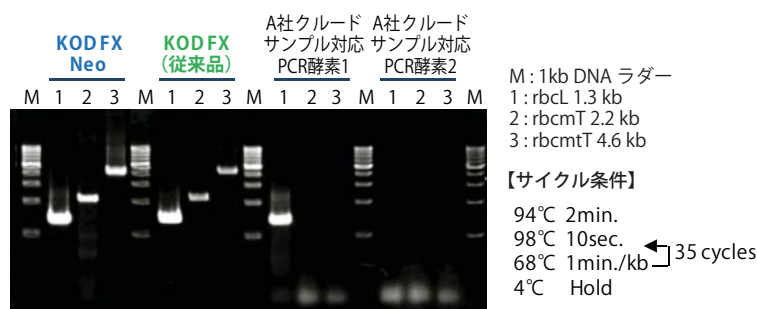
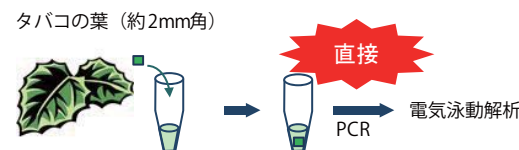
実施例 3：植物のライセートをを用いた増幅

前処理法 (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 を 100 μL 添加し、Vortex にて良く攪拌
Buffer A: 100mM Tris-HCl (pH9.5) 1M KCl 10mM EDTA
 4. 95°C, 10min. Vortex にて良く攪拌
 5. 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: BioTechniques, 19:394 (1995)



実施例 4：植物の葉の直接 PCR



タバコの葉を直接サンプルとして、PCR を行いました。その結果、KOD FX と KOD FX Neo でのみ良好な増幅が得られ、KOD FX Neo を用いた場合、より良好な増幅を確認することができました。

実施例 5：マウステールライセートの増幅の比較

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、増幅効率も KOD FX Neo の方が良好でした。

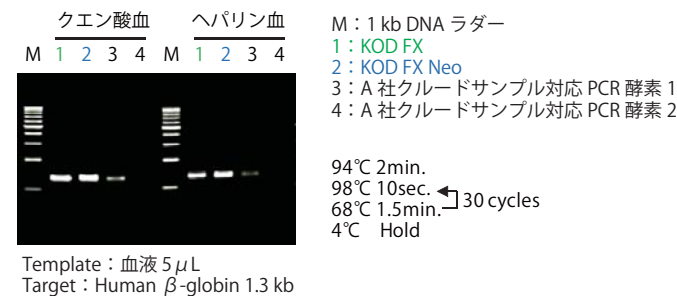
【96 well PCR プレートを用いるマウステールライセートの作製方法 (アルカリ溶解法)】

マウステール (3 mm 程度) を 96 ウェル PCR プレートに入れる
↓
↓ ← 50 mM NaOH 180 μL を加え、蓋をして Vortex にて良く攪拌する
↓ スピンドアウン (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, 10 min. インキュベート (サーマルサイクラーを使用)
↓ ← 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 20 μL を加え、蓋をして Vortex にて良く攪拌する
↓ スピンドアウン (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 ~ 2 μL を PCR 反応液 50 μL 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 6：血液からのダイレクト PCR 解析

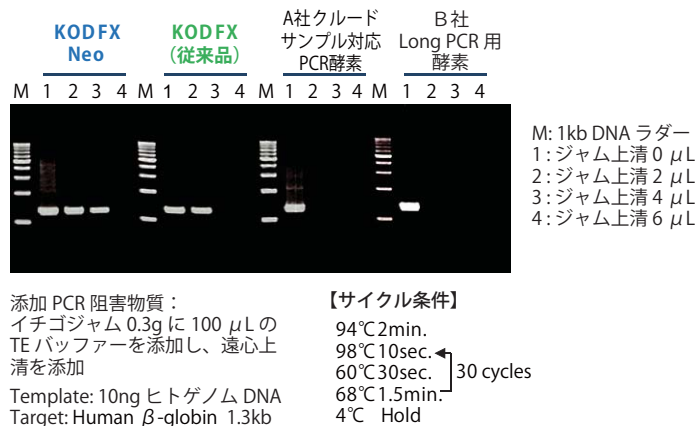
採血した血液を直接 PCR に用いる検討を行いました。その結果、KOD FX 及び KOD FX Neo で良好な結果を示しました。また、PCR を阻害することが知られているヘパリンを含む血液では、KOD FX Neo の方が、増幅量が多い結果でした。



PCR 阻害物質添加実験

実施例 7：ジャム (食品) 添加実験

加工果物食品の一例として、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。実験の結果から、KOD FX Neo が最も阻害に強いことが明らかとなりました。



実施例 8：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。

