Brand-New item

発売キャンペーン 30%off

NEW

部位特異的変異導入キット

KOD -Plus- Mutagenesis Kit

■2006年12月6日～2007年1月31日の期間中、30%offでご購入いただけます。

KOD-Plus- を用いたInverse PCR法に基づく部位特異的変異導入キットです。幅広い変異導入が可能です。

本製品は、KOD -Plus-の高い正確性を活かした、Inverse PCR法に基づく部位特異的変異導入キットです。Inverse PCR法では、プラスミドを鋳型として、逆向きに設定したプライマーを用いてPCRを行い、プラスミド全周の増幅を行います。その際、導入したい変異や挿入配列を付加したプライマーを用いることにより、様々な変異を導入することができます。本製品には、形質転換までに必要な全ての試薬および詳細なプロトコールが含まれています。

一口メモ

- KOD -Plus-は、KOD DNA Polymeraseに、常温で活性を抑える2種類の抗体を加えたホットスタート対応型高正確性PCR用酵素です。Taq DNA Polymeraseの約80倍の忠実度(fidelity)を有し、正確性を要するPCRに最適です。
- 制限酵素*Dpn* Iは、メチル化されたDNAを基質として切断します。通常のメチラーゼを発現している大腸菌(JM109やDH5α)から得られたプラスミドは、*Dpn* Iサイトがメチル化されており、本酵素を用いて選択的に分解することができます。

特長1 幅広い変異導入に対応

・Inverse PCR法の採用により、数bpの置換、挿入、欠失のみでなく、数10bpの挿入(Tagの導入)や数100bpの欠失等にも対応可能です。また、特定部位のアミノ酸を20種類のアミノ酸に置換するなどの Mutant Clone Collectionの作製(Saturation Mutagenesis)も可能です。

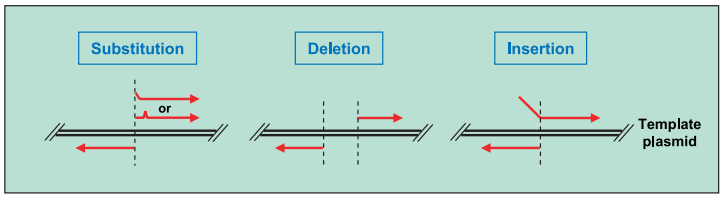

図1. 置換、欠失、及び挿入の各変異導入プライマー設計例

特長2 確実な変異導入

・最大95%の変異導入効率が得られます。また、KOD -Plus-の採用、およびPCRサイクル数を最小限に設定するなど条件の最適化により、PCRエラーによる2nd-site mutation(目的とする変異以外の変異)が入る可能性を最小限にしています。最長約11kbのプラスミドで変異導入を確認済みです。

特長3 簡単プロトコール*

・本製品では、PCR産物のSelf-ligationを、KinaseとLigaseを同時に反応させて行います。従って、PCR Primerのリン酸化は不要です。また、形質転換まで3ステップの簡単なプロトコールとなっています(図2)。

＊特許出願中

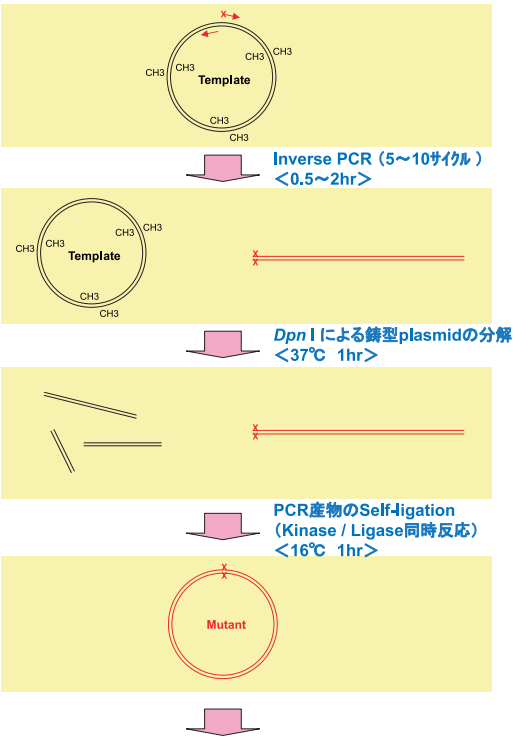

図2. KOD -Plus- Mutagenesis Kitによる変異導入フロー

実施例1 種々のサイズのプラスミドをターゲットとした場合の変異導入効率の評価

全長3.3kb～11.3kbの5種類のヒトcDNAクローン(FLJ cDNA Clone: Code No. FLJ-101)に対して、1塩基置換、3塩基欠失、6塩基挿入の変異導入をそれぞれ行い、シーケンシングにて変異導入効率の評価を行いました(変異箇所は、ベクター上の共通領域に設定。(ベクターサイズ 3.0kb))。その結果、本製品では、plasmidのサイズに特に影響を受けることなく、平均84%の割合で目的の変異体を得ることができました。

Plasmid	Plasmid サイズ	変異導入のタイプ	配列確認を試みたクローン数	目的の変異を有していたクローン数	目的とした変異体の割合
FLJ20649	3.3kb	1塩基置換	12	10	83%
		3塩基欠失	12	9	75%
		6塩基挿入	12	11	92%
FLJ11212	5.3kb	1塩基置換	12	10	83%
		3塩基欠失	12	12	100%
		6塩基挿入	12	9	75%
FLJ32066	7.3kb	1塩基置換	12	9	75%
		3塩基欠失	12	12	100%
		6塩基挿入	12	11	92%
FLJ13783	9.3kb	1塩基置換	12	9	75%
		3塩基欠失	12	12	100%
		6塩基挿入	12	10	83%
FLJ43903	11.3kb	1塩基置換	12	8	67%
		3塩基欠失	12	11	92%
		6塩基挿入	12	8	67%
平　均			**180**	**151**	**84%**

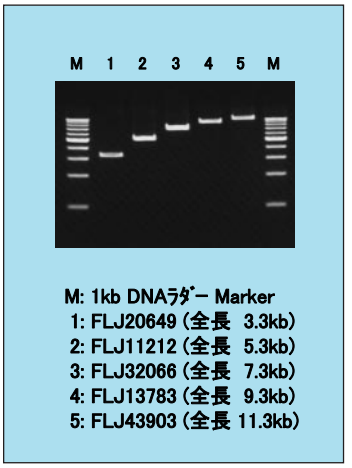

図3. Inverse PCR後のアガロースゲル電気泳動結果

実施例2 大きな欠失導入およびHis-tag挿入における他社品との性能比較

7.3kbのプラスミドFLJ32066を対象に、本製品とA社non-PCR法キットを用いて90塩基の欠失、および6xHisに対応する18塩基の導入を行いました。その結果、他社のキットが苦手とするこのような変異導入に対しても、本製品では、高い成功率で変異体を取得することができました。

●90bp 欠失

	配列確認を試みたクローン数	目的の変異を有していたクローン数	目的とした変異体の割合
本　製　品	16	14	88%
A社キット	16	7	44%

●18bp 挿入

	配列確認を試みたクローン数	目的の変異を有していたクローン数	目的とした変異体の割合
本　製　品	16	15	94%
A社キット	16	0	0%

実施例3 目的外変異（2nd-site mutation ）の挿入頻度の評価

キット付属のコントロールplasmid（4.3kb）を鋳型として変異導入を行い（PCRは8サイクルにて実施）、得られた変異体から24クローンについて各々2000bpの領域のシーケンシングを行いました。その結果、本製品では、実際に解析した合計48,000塩基の内、目的以外の変異はわずか1塩基でした。これは、A社non-PCR法キットと比較しても、同等以上の結果でした。

	変異導入率	シーケンシングしたクローン数	総シーケンシング塩基数	目的外変異の塩基数	目的外変異の挿入率 ($\times 10^{-5}$)
本　製　品	>80%	24	48000	1	2.08
A社キット	>80%	24	48000	2	4.16

価格を変更しております。現在の情報は、お問い合わせいただきますようお願いいたします。

品　名	包　装	保存温度	Cod
KOD -Plus- Mutagenesis Kit	20回用	-20℃	SMK

＊本製品には、以下の試薬が含まれています。KOD -Plus-, 10×Buffer for iPCR, 2mM dNTPs, *Dpn*I, T4 Polynucleotide Kinase, Ligation high, Control Plasmid, Control Primer #1, Control Primer #2.

※PCR（Polymerase Chain Reaction）は、F. Hoffman-La Roche社が米国特許（特許番号4,683,195および4,683,202）を有しています。PCRの実施に当たっては許可が必要となります。本品はF. Hoffman-La Roche社が有するPCRに関する特許の使用許可を示唆するものではありません。