



THUNDERBIRD™ qPCR Mix

➡本誌p.1に詳細記事がございます。

Brand-New item

- 1 高効率リアルタイムPCR用マスターミックス
THUNDERBIRD™ qPCR Mix **キャンパーン**

HOT ITEM

- 3 リアルタイムPCR用cDNA合成キット
ReverTra Ace® qPCR RT Kit **キャンパーン**

千種万様 USER'S NOTE

- 4 製品Can Get Signal® immunostainを用いた実施例
Schneider 2 (S2)のalpha-tubulin染色における
従来法との比較実験
- 5 製品Can Get Signal®を用いた実施例
ウェスタンブロットによる海馬内のNR2A
(NMDA receptor subunit)の発現量の検出

ライフサイエンス実験シリーズ Vol.8

私にも
できた!

- 6 PCR実戦技術編 (4)

HOT ITEM

- 14 Cell Applications, INC. 製品

TECHNICAL REVIEW

- 15 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

みんなの広場

- 17 実験のコツ、失敗・成功談
「プラスミドレスキュー作戦」
- 17 実験川柳特集9



INFORMATION

- 18 実施例集、新カタログ発刊のお知らせ
- 18 大包装品およびバッファー発売のご案内



高効率リアルタイムPCR用マスターミックス

サンダーバード

THUNDERBIRD™ qPCR Mix

■期間：2009年5月18日～2009年6月19日（ご注文分）



NEW

リアルタイムPCR界の「幸運の鳥」誕生。測定レンジ、特異性、コスト等のお悩み解消します。

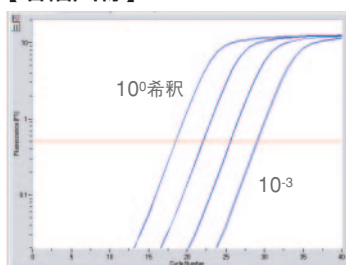
THUNDERBIRD™ qPCR Mixは、Taq DNA polymeraseをベースとして開発された、高効率リアルタイムPCR用マスターミックス（2×濃度）です。本製品は、新規エンハンサーの採用を含め、組成を根本的に見直すことによって、反応特異性とPCR効率が飛躍的に向上しています。これらの改良によって、幅広い定量可能域（ダイナミックレンジ）を実現しました。また、実験のランニングコストを大幅におさえることが可能になりました。



特長1 高い特異性

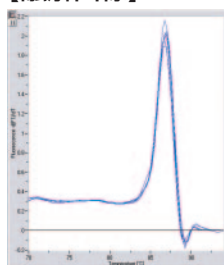
- ・組成最適化により、PCRの特異性が向上。非特異反応の低減によって、SYBR® Green I、及びTaqMan®アッセイにおいて、低コピー数のターゲットの検出感度が向上しました。

【増幅曲線】

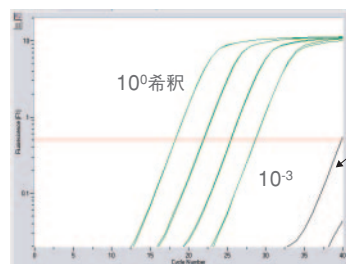


プライマーダイマーの出現は認められませんでした。

【融解曲線】

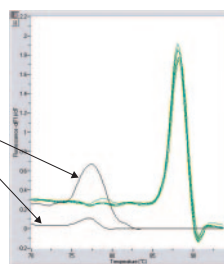


THUNDERBIRD™
SYBR® qPCR Mix
(Code No. QPS-201)

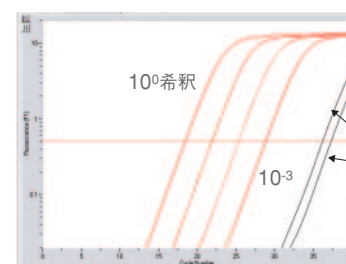


プライマーダイマー

no template control

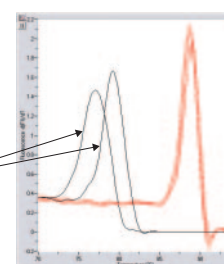


弊社従来品
SYBR® Green Realtime PCR
Master Mix -Plus-
(Code No. QPK-212)



プライマーダイマー

no template control



A社製リアルタイムPCR試薬

図1. SYBR® Green I 検出系による反応特異性の比較 (Roche Diagnostics LightCycler® 1.1使用)

プライマーダイマーの発生が見られるプライマーセットを用いて、各リアルタイムPCR試薬による反応特異性の比較を行いました。プライマーセットは、ヒトβ-Actin cDNAに対するもの、鋳型には弊社の高性能逆転写反応用試薬「ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Code No. FSQ-101)」により合成したHeLa細胞Total RNA由来cDNAを用い、cDNAの10倍段階希釈液（4段階）と、no-template control (NTC) について、それぞれduplicateにて反応を実施しました。

特長2 様々なターゲットを均一に検出

・ターゲットごとのPCR効率のばらつきを最小限に抑える効果のある新規エンハンサーを採用。*

*特許出願中

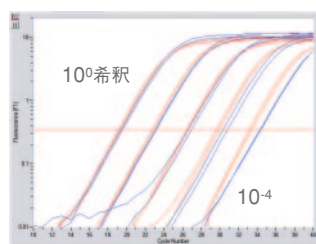


図2. SYBR[®]Green I 検出系によるノロウイルスGI cDNAの検出
(縮合プライマー使用) (Roche Diagnostics LightCycler[®] 1.1使用)

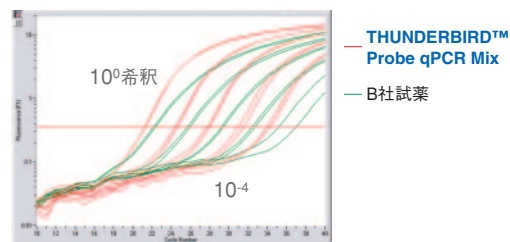


図3. TaqMan[®]検出系によるGAPDH cDNAの定量
(Roche Diagnostics LightCycler[®] 1.1使用)

特長3 広いレンジで検出可能

・特異的(特長1)、かつ高効率(特長2)な増幅により、広い測定レンジでの解析が可能になりました。

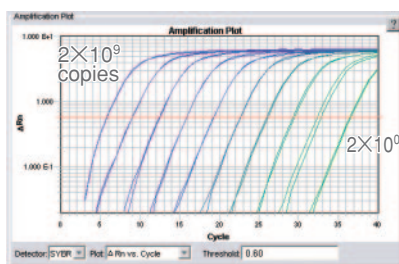
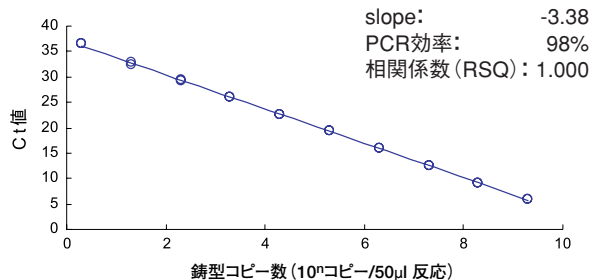


図4. SYBR[®]Green I 検出系によるプラスミド鋳型の検出 (Applied Biosystems 7900HT使用)



特長4 様々な機器に対応

・ブロックタイプの機器 (Fast Modelにも対応) のほか、ガラスキャピラリーを用いる高速サイクラーにも対応しています。
また、50× ROX reference dyeが別添付されているため、パッシブリファレンスを使用する機器 (Applied Biosystems社製機器、Stratagene社製機器など) においても、各機種の特性に応じた最適なROX濃度でご使用いただけます。

特長5 高速ホットスタート

・抗Taqポリメラーゼ抗体を用いるホットスタートシステムを採用しています。抗体は加温により速やかに失活するため、最初の変性時間を短時間に設定できます。

特長6 高いコストパフォーマンス

・実験のランニングコストを大幅におさえることが可能になりました。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	通常価格	キャンペーン価格
TaqMan [®] アッセイ用 THUNDERBIRD [™] Probe qPCR Mix ・THUNDERBIRD [™] Probe qPCR Mix ・50× ROX reference dye	1ml×1本 (40回用)	-20℃	QPS-101T	¥8,500	対象外
	1.67ml×3本 (200回用)	-20℃	QPS-101	¥29,000	¥17,400
	(1.67ml×3本)×5 (1000回用)	-20℃	QPS-101X5	¥133,000	対象外
SYBR [®] Green I アッセイ用 THUNDERBIRD [™] SYBR [®] qPCR Mix ・THUNDERBIRD [™] SYBR [®] qPCR Mix ・50× ROX reference dye	1ml×1本 (40回用)	-20℃	QPS-201T	¥8,500	対象外
	1.67ml×3本 (200回用)	-20℃	QPS-201	¥29,000	¥17,400
	(1.67ml×3本)×5 (1000回用)	-20℃	QPS-201X5	¥133,000	対象外

※50× ROX reference dyeがマスターミックスとは別容器で供給されます。 ※包装の欄に記載の反応回数は、50μl反応時のものです。容量はqPCR Mixのみ示しています。

※大容量版 (QPS-101X5およびQPS-201X5) は、QPS-101もしくはQPS-201の5セット組です。

※TaqMan[®]は、Roche Molecular Systems Inc.の登録商標です。 ※SYBR[®]は、Molecular Probes Inc.の登録商標です。

関連商品

下記の通りReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (Code No.FSQ-101) [p.3] とのセット販売を開始いたします。

品名	内容	保存温度	Code No.	通常価格	キャンペーン価格
THUNDERBIRD [™] Probe qPCR/RT Set	THUNDERBIRD [™] Probe qPCR Mix (200回用) と ReverTra Ace [®] qPCR RT Kit (200回用) とのセット	-20℃	QPS101/FSQ101	¥63,000	¥37,800
THUNDERBIRD [™] SYBR [®] qPCR/RT Set	THUNDERBIRD [™] SYBR [®] qPCR Mix (200回用) と ReverTra Ace [®] qPCR RT Kit (200回用) とのセット	-20℃	QPS201/FSQ101	¥63,000	¥37,800

※本品は、THUNDERBIRD[™] qPCR Mix (¥29,000→¥27,300) とReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (¥38,000→¥35,700) のセット販売品です。

リアルタイムPCR用cDNA合成キット

ReverTra Ace® qPCR RT Kit



■期間：2009年5月18日～2009年6月19日（ご注文分）

リアルタイムPCR用鑄型cDNA作製に最適。簡便・高効率な逆転写キットです。

特長1 幅広いダイナミックレンジを実現

- 最適化されたPrimer Mix (oligo dTとRandom primer)、およびBuffer組成の改良により、RNAを偏りなく安定に逆転写することができます。低コピー域の検出率が向上しており、広いレンジで高い直線性を得ることができます。

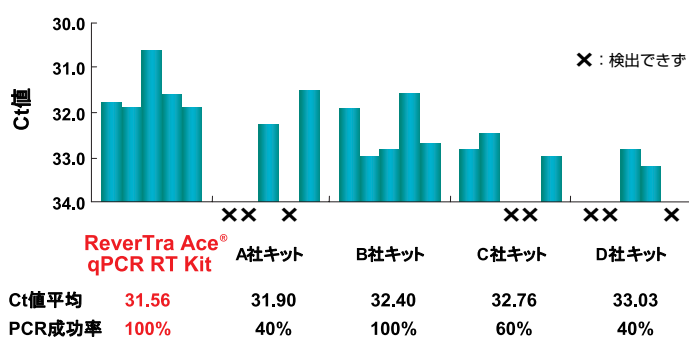


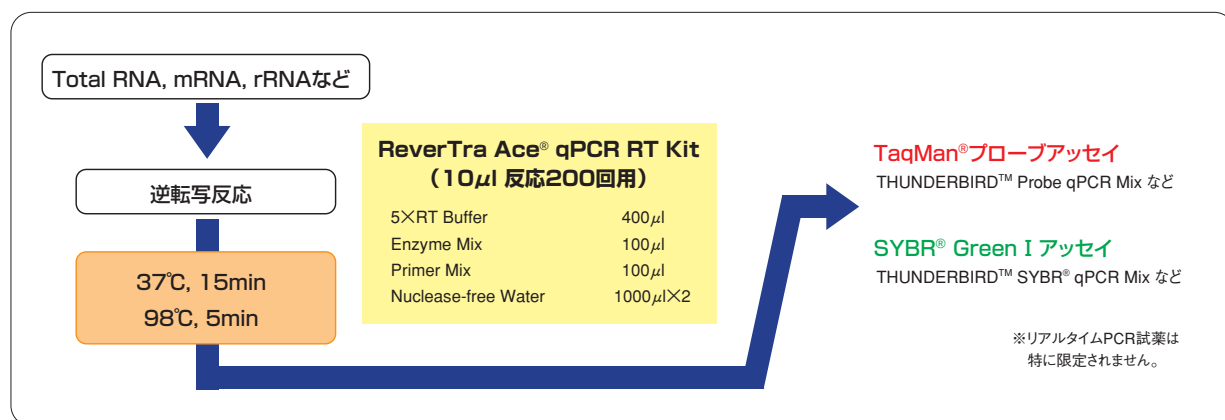
図1. TNF- α 遺伝子 (レア発現) の検出における検出率の比較
HeLa細胞から精製したTotal RNA 100ngを各社キットを用いて逆転写した後、反応液に2%となるよう添加して、SYBR® Green I アッセイ法によるリアルタイムPCR 解析を行いました。

特長2 レア発現遺伝子の検出に最適

- リアルタイムPCR反応液に最大20% (v/v) まで逆転写反応液を持ち込むことが可能であり、さらにレア発現遺伝子の検出率を高めることができます。

特長3 わずか15分で逆転写反応完了

- 逆転写反応はわずか15分で完了。RNase H処理などは必要ありません。



品 名	内 容	保存温度	Code No.	通常価格	キャンペーン価格
ReverTra Ace® qPCR RT Kit	上記参照	-20°C	FSQ-101	¥38,000	¥22,800
THUNDERBIRD™ Probe qPCR/RT Set*	THUNDERBIRD™ Probe qPCR Mix (200回用)とReverTra Ace® qPCR RT Kit (200回用)とのセット	-20°C	QPS101/FSQ101	¥63,000	¥37,800
THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR/RT Set*	THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (200回用)とReverTra Ace® qPCR RT Kit (200回用)とのセット	-20°C	QPS201/FSQ101	¥63,000	¥37,800

※本品は、ReverTra Ace® qPCR RT Kit (¥38,000→¥35,700)とTHUNDERBIRD™ qPCR Mix (¥29,000→¥27,300) [p.1]のセット販売品です。

製品 **Can Get Signal® immunostain** を用いた実施例

Schneider 2 (S2) のalpha-tubulin染色における従来法との比較実験

データご提供 京都大学 研究員様

実験方法

サンプル

Drosophila culture cell line (Schneider 2 (S2) cells)
※抗原タンパク質の発現誘導の有無:なし
Concanavalin A coated glass bottom dish に接着30分

・希釈溶液: (1) 1% BSA, 0.02% TX-100/PBS (従来法)
(2) **Can Get Signal® immunostain Solution A**
(3) **Can Get Signal® immunostain Solution B**
・反応条件: 室温, 1 時間

ブロッキング、内因性ペルオキシダーゼ活性阻止

・ブロッキング溶液: 1% BSA, 0.02% TX-100/PBS
・反応条件: 室温, 30分間
・内因性ペルオキシダーゼ活性阻止: なし

〈2次抗体〉

・使用抗体: Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L)
highly cross adsorbed <Invitrogen>
・希釈倍率: 1/600
・希釈溶液: (1) 1% BSA, 0.02% TX-100/PBS (従来法)
(2) **Can Get Signal® immunostain Solution A**
(3) **Can Get Signal® immunostain Solution B**
・反応条件: 室温, 1 時間

抗体反応

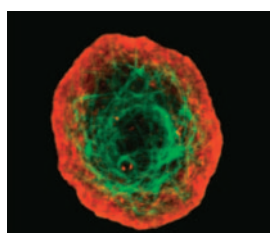
〈1次抗体〉

・使用抗体: monoclonal anti-alpha-tubulin, antibody,
mouse <Sigma>
・希釈倍率: 1/100

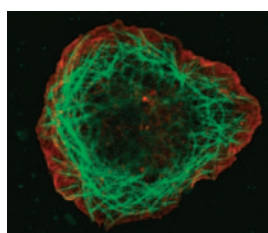
検出方法

Immunofluorescence (IF)

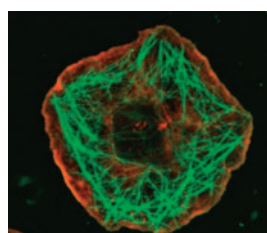
結 果



(1) BSA (従来法)



(2) **Can Get Signal®
Solution A**



(3) **Can Get Signal®
Solution B**

蛍光退色防止剤 (FluorSave™ Reagent <CALBIOCHEM® #345789>) を用いてサンプルをマウントし、共焦点顕微鏡観察 <ZEISS LSM 510> を行いました。添付した画像は、共焦点顕微鏡の画像取得条件 (gain やレーザー強度など) は、全く同条件で行い、また、得られた画像のコントラスト等の画像処理は行っていません。

先生からのコメント

従来法でも、細胞内のチューブリン構造は可視化できていましたが、**Can Get Signal® immunostain** を使用した場合は、顕著なシグナル増強が認められ、従来法では、ややdiffuseであったチューブリン束のシグナルが、鮮明に検出されました。また、細胞内のバックグラウンドと思われるシグナルが減少傾向にありました。

Solution A、Solution B のどちらも、シグナルの増強が認められましたが、Solution B の方が若干強い印象を受けました。Phalloidin で同時にアクチン骨格を可視化したところ、抗原抗体反応以外の反応には顕著な影響は見られませんでした。ただ、**Can Get Signal® immunostain** を使用した場合、細胞が存在しない部分 (Concanavalin A でコートしたガラスディッシュ上) に、非特異的なシグナルが多くみられた点が若干気になりましたが、この件を考慮しても、全体的には **Can Get Signal® immunostain** は、十分にシグナルを増強させることができると思いました。ちなみに、この非特異的なシグナルが、洗浄過程をより十分にすることで減少するかどうかについては未確認です。

今回使用した抗体は、ごく一般的な抗体でしたが、シグナル検出感度が低いものでは、より一層効果が期待できるのではないかと思います。

免疫反応促進試薬 **Can Get Signal® immunostain**



内容		Code No.	価格
Solution A&B	各5ml	NKB-401	¥12,000
Solution A	20ml	NKB-501	¥30,000
Solution A	(20ml × 1本) × 4	NKB-501x4	¥70,000
Solution B	20ml	NKB-601	¥30,000
Solution B	(20ml × 1本) × 4	NKB-601x4	¥70,000

Can Get Signal® immunostain は、免疫組織・細胞染色などの感度と特異性を改善する機能を有するバッファーです。

使用方法は、現在希釈液に用いている希釈血清やブロッキング溶液を本溶液に変更するだけです (Solution A と B は免疫反応の促進作用が異なり、両試薬ともに1次抗体および2次抗体にご使用いただけます)。

⇒ 詳しくは <http://www.toyoobo.co.jp/bio> をご覧ください。

製品 **Can Get Signal®** を用いた実施例

ウェスタンブロットによる海馬内のNR2A (NMDA receptor subunit) の発現量の検出

データご提供 東京大学 医科学研究所 神経ネットワーク分野

実験方法

サンプル

マウス海馬のHomogenate

ブロッティング方法

セミドライ法

ブロッキング

- ・ブロッキング溶液: 0.5% Skim milk in TBST
- ・反応条件: 室温、1 時間

抗体反応

〈1次抗体〉

- ・使用抗体: Anti NR2A <Frontier Science>
- ・希釈倍率: 1/500

- ・希釈溶液: (1) 0.5% Skim milk in TBST (従来法)
(2) **Can Get Signal®** Solution 1
- ・反応条件: 4 ℃、O/N

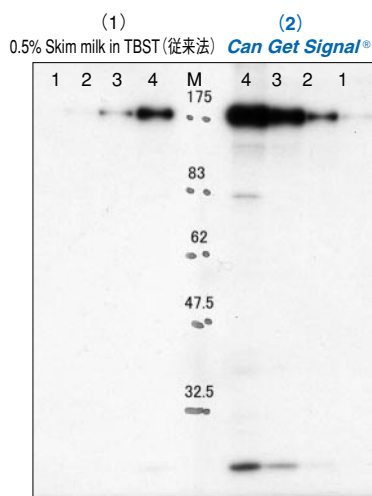
〈2次抗体〉

- ・使用抗体: anti-rabbit IgG HRP
<GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社>
- ・希釈倍率: 1/4,000
- ・希釈溶液: (1) 0.5% Skim milk in TBST (従来法)
(2) **Can Get Signal®** Solution 2
- ・反応条件: 室温、1 時間

検出方法

ECL Plus <GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社>

結 果



M: Prestained Protein Marker (Bio Labs)

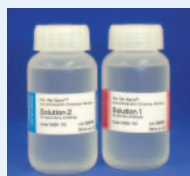
- 1: サンプル 1.25 µg
- 2: サンプル 2.5 µg
- 3: サンプル 5 µg
- 4: サンプル 10 µg

先生からのコメント

175kDaにあるバンドがNR2Aのバンドを示しています。およそ2〜4倍くらい感度が上がりました。

この抗体はもともと特異性の高い抗体だったのですが、希釈倍率が低く、抗体の消費が激しかったので、**Can Get Signal®**を使えば、抗体の使用量を減らせそうなので、抗体の節約に役立ちそうです。

免疫反応促進試薬 **Can Get Signal®**



内容		Code No.	価格
Solution 1&2	各50ml	NKB-101T	¥10,000
Solution 1&2	各250ml	NKB-101	¥30,000
Solution 1	250ml	NKB-201	¥17,000
Solution 2	250ml	NKB-301	¥17,000

Can Get Signal®は、ウェスタンブロット解析やELISAなどの感度と特異性を改善する機能を有するバッファーです。

使用方法は、現在希釈液に用いているTBS-Tやブロッキング溶液を本溶液に変更するだけです(1次抗体をSolution 1で、2次抗体をSolution 2で希釈)。

⇒詳しくは<http://www.toyoobo.co.jp/bio>をご覧ください。

LIFE SCIENCE SERIES

ライフサイエンス実験シリーズ

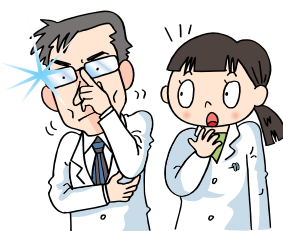
Vol.8

PCR実戦技術編(4)

本シリーズは、市販のノウハウ本や実施例集ではカバーできなかったようなライフサイエンス実験のコツなどについて、弊社研究員の実験ノートなども参考に、生の事例を交えながら紹介させていただいています。Vol.5から、最もリクエストの多かったPCR関連技術を更に深くご紹介する目的で、「PCR実戦技術編」をお届けしています。

さて前号では、Sリーダーからまたまた難問が出題され、その問題をめぐるA子さんとライバルのN代さんの間でバトルの予感が漂っていましたが…。

皆さんも、是非、前号で2人の考えた解答を確認してから、本号を読み進めてください。

前号の課題
ダイジェスト

●課題: 大腸菌のDHFR (ジヒドロ葉酸還元酵素) を発現するベクターがあります。そのDHFRのN末端にタグ配列を付加するにはどのようなプライマーを設計すれば良いですか?

〈条件〉

- インバースPCR法を用いること。
- タグのアミノ酸配列は以下のとおり。
Leu-Ile-Arg-Arg-Ile (L-I-R-R-I)
タグは開始コドンの隣りに挿入すること。
- 発現は大腸菌で行います。



図1 DHFR発現ベクター

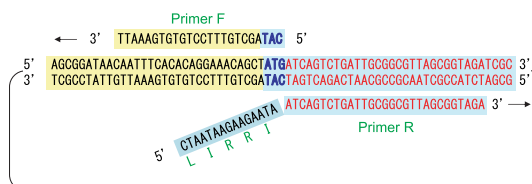


図2 A子さんの解答

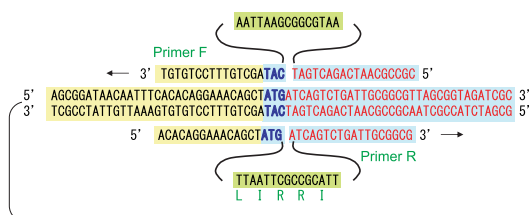


図3 N代さんの解答 (ループで示してある部分をプライマー中央に挿入)

注意!!

上の二人の解答には間違いが含まれている可能性があります。

本シリーズは、弊社ウェブサイト(<http://www.toyobo.co.jp/bio/>)の「実験お助けコーナー」でご覧いただけます。

今までの
登場人物



Sリーダー
冷静沈着なライフ
サイエンスグルー
プのリーダー



A子さん
今年入社4年目
になる研究員



N代さん
今年入社3年目
になる研究員
(A子さんのライバル)



S本さん
アシスタント

遺伝子組換え技術が発達し、変異を導入してタンパク質の機能を改変したり、タグを付加したりするような実験がとて簡単に行えるようになりました。今回は、そのような変異導入技術とそれに関連したトピックスをご紹介します。

1-1 網羅的変異導入法と生物の進化

現在のような分子生物学的な手法が発展する以前から、様々な方法を用いて変異実験が行われてきました。例えば、細菌やショウジョウバエなどに紫外線やX線を照射することによって、様々な変異体が取得されてきたこともその一つです。これらの方法は、DNAが紫外線やX線によって損傷を受け、その修復段階で変異が導入されることを利用します。よって、遺伝子のどこに変異が導入されるかをあらかじめ知ることはできませんが、様々な領域にまんべんなく変異を導入できるという特徴があります。

また近年、PCRを用いて網羅的に変異導入する方法（エラーブローンPCR）が頻繁に行われるようになりました。この方法は、

PCR時のマグネシウムイオンをマンガンに変更したり、dNTP中の各ヌクレオチドのバランスを崩したりすることにより、DNAポリメラーゼの正確性を低下させて変異を導入します。

ところで、様々な生物で働いているDNAポリメラーゼは大きく分けて7種に分類されますが、Yファミリーに属するDNAポリメラーゼの正確性（忠実度）が低いことが最近分かってきました。この酵素は、多くの生物に存在することが知られており、実際に進化の原動力の一つになったのではないかと考えられているようです。

1-2 部位特異的変異導入 — 生体成分であるが故の宿命？ —

DNAポリメラーゼによる変異導入プライマーの伸長反応を利用して特定の塩基を置換するような技術も次々と開発されています。これらの技術は、タンパク質の機能を解明したり、タンパク質に新しい機能を付加するような実験に応用されています。実際に、活性中心と思われる部位に変異を導入してアミノ酸を変異させ酵素活性の変化を調べたり、酵素の耐熱性や反応性や基質特異性を改善したりする研究が行われています。

また、研究が進むにつれて、ほんの一つのアミノ酸の変異が、タンパク質全体の機能に多大なる影響を及ぼすような事例が次々と報告されるようになりました。その変異で、タンパク質の機能が失われることもあれば、タンパク質の機能が飛躍的に向上する場合もあるようです。現在、産業用や研究用として用いられている酵素の多くは、この手法を用いて改良されたものが少なくありません。

しかし、考えようによっては不思議な話です。生体中で働いて

いる酵素は、最大の力を発揮できないように進化してきた節があります。おそらく、酵素の過剰な活性は逆に生体に不利に働くため、生体にとってちょうど良い活性を発揮するように進化段階で調節されていたのでしょう。いわゆる、自動車やバイクなどと言うところのリミッターのイメージです。よって、機能改良のための変異導入は、このリミッターを外す作業といえるのかも知れません。



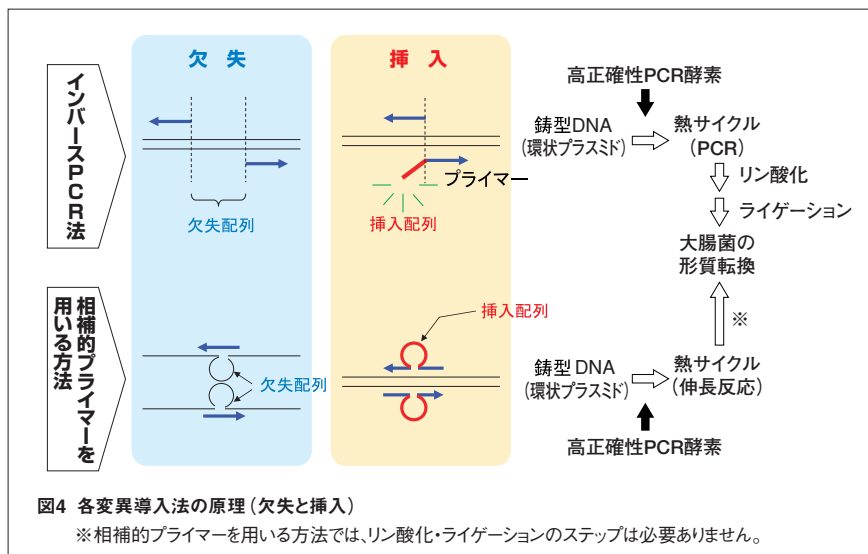
1-3 様々な変異導入法における利点と欠点

1-2のような置換に加え、特定の配列を削ったり、挿入したりするような変異導入も頻繁に行われています。しかし、このような変異導入は、方法によってかなり効率が異なるようです。

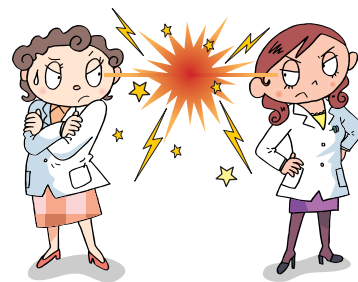
部位特異的変異導入法は、相補的なプライマーを用いる方法とそうでない方法に大きく分けることができますが（図4）、遺伝子配列の欠失や挿入には、相補的なプライマーを用いない「インバースPCR法」などの方法が効果的であるといえます。相補的なプライマーを用いる方法では、図4に示すように、プライマーがアニーリングする際にDNAがかなり不自然な構造をとる必要があり、効率が下がってしまうようです。近年、ヒスチジンタグなどを用いることが増えてきましたが、インバースPCR法はそのようなタグ配列の挿入にも力を発揮します。

また、相補的なプライマーを用いる変異導入法では、原理上、ミックス塩基（NNNなど）を導入することが困難です

が、インバースPCR法では問題なく行うことができます。よってこの方法は点突然変異ライブラリーなどの作製に適しているといえます。



A子さんとN代さんはT社バイオ研究所のライフサイエンス試薬開発グループの研究員です。先ほどからなにやら、Sリーダーの前で火花を散らしているようです。実は、つい先ほど2人に問題が出され、その解答がSリーダーに提出されたところなのです(ライフサイエンス実験シリーズの表紙参照)。



2-1 N代さんの落とし穴

まず、Sリーダーは、N代さんに向かって、「このプライマーペアでPCRができるの?」という疑問を投げかけました。N代さんはポカンとしています。

N代さんは学生時代にインバースPCR法とは異なる方法を用いて変異導入実験を行っていました(図4 相補的プライマーを用いる方法)。今回、N代さんはその方法の規則に従ってプライマーを設計してしまったのです。

増幅の機構を図に描いてみると分かるのですが、このような相補的なプライマーではいわゆる連鎖的増幅は起こりません(PCRできません!)。N代さんはとっさに、「はっ!」と気づいて、頭を抱えてしまいました。課題では、「インバースPCR法を用いて行う」となっていたので、N代さんの答えは課題の条件を満たしていないことになってしまいます。



続けて、Sリーダーは、確かにこの原理を用いても変異導入は可能なのですが、今回のように途中で長い挿入のあるようなプライマーではうまくいかないことが多いことをN代さんにアドバイスしました。Sリーダーは、以前行ったヒスチジンタグ配列挿入実験における比較結果を見せてくれました(表1)。確かに、18bpともなると、相補的プライマーを用いる方法では、問題があるよ

うです。

また、欠損変異体を作製する場合においても、インバースPCR法は有利なようです。表2は、同様にSリーダーが以前行った90bpの欠損変異体の作製効率を二つの方法で比較したものです。

表1 各方法におけるヒスチジンタグ(18bp)挿入効率の比較

	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
インバースPCR法*1	16	15	94%
相補的プライマーを用いる方法*2	16	0	0%

表2 各方法における欠損変異体(90bp)作製効率の比較

	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
インバースPCR法*1	16	14	88%
相補的プライマーを用いる方法*2	16	7	44%

*1 部位特異的変異導入キット「KOD-Plus- Mutagenesis Kit (Code No. SMK-101)」を用いました(図4上参照)。

*2 相補的プライマーを用いる方法(図4下)にて実施。

※*1、*2ともに、増幅反応の後に制限酵素Dpn Iを用いて鋳型プラスミドの分解を行っています(図7参照)。

※実験に用いたプラスミドの全長は7.3kbです。

2-2 A子さんの落とし穴

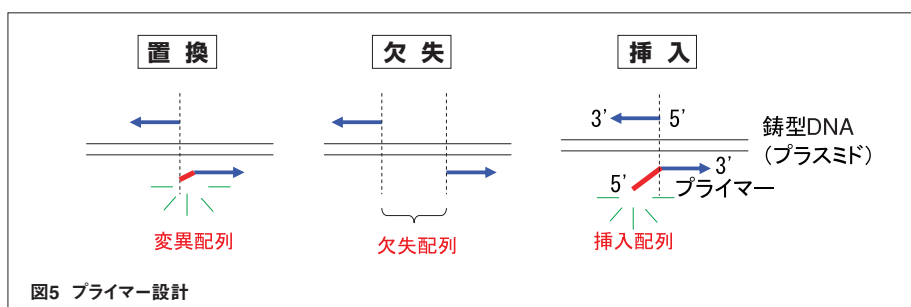
今回、A子さんは慎重でした。原理は完璧なはずですが。Sリーダーは、N代さんと呼んで、A子さんの解答を見せつつ解説を始めました。

まず、プライマーの設計は、変異の種類によって様々であり、以下のようなコツがあります。

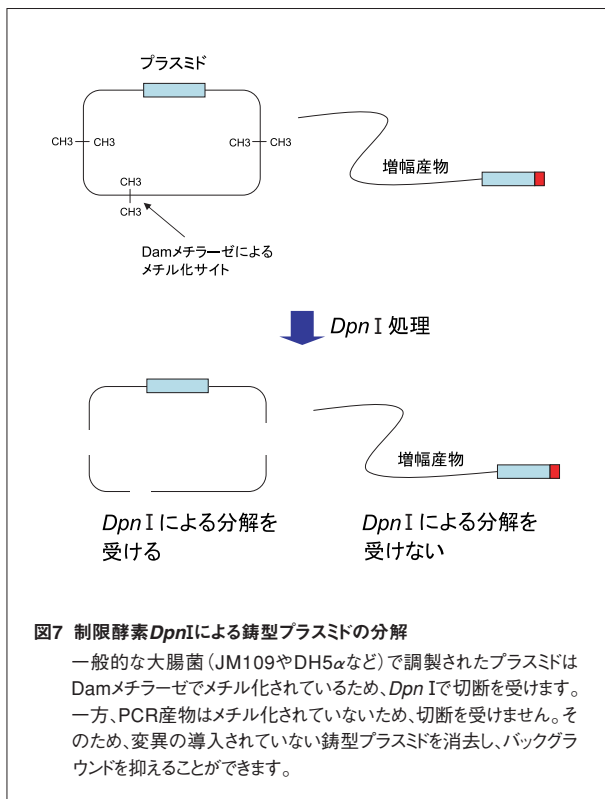
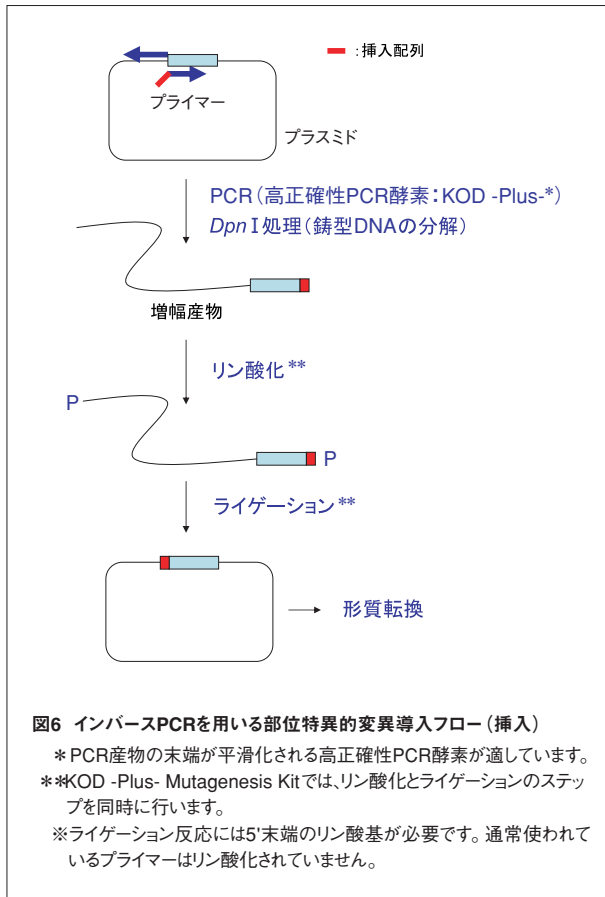
- 変異導入部位は、プライマーの5'末端、あるいは5'末端付近に設計します(欠失の場合は変異部位の導入は必要ありません)。
- 3'末端側には、鋳型DNAと相補性のある領域が少なくとも20塩基以上(望ましくは25塩基以上)になるようにプライマーを設計します。
- プライマーが50塩基を超えるような場合は、精製度の高いプライマーを用います(プライマーが長くなるほど、5'末端の欠落した不完全なプライマーの混入が増える傾向にあります)。
- プライマーをあらかじめリン酸化しておくか、PCR産物をリン酸化する必要があります。

※KOD-Plus- Mutagenesis Kit (Code No. SMK-101)を用いる場合、あらかじめプライマーをリン酸化しておく必要はありません。PCR後にPCR産物をリン酸化するステップが設定されています。

右が、3種類の変異を導入する場合の典型的なプライマー設計例です。(図5)



前述の、KOD -Plus- Mutagenesis Kit (Code No. SMK-101)は、インバースPCRで用いる高正確性PCR酵素『KOD -Plus-』をはじめ、変異導入に必要な試薬をすべて含んでいます。更に、*Dpn* I 処理工程などの実験の効率を高める工夫もなされているため、初めて変異導入実験をされるような場合にはとても便利です。以下に、このキットを用いるインバースPCR法による部位特異的変異導入フローをA子さんの解答を元に示します(図6、図7)。また、プロトコール#1に具体的な実験方法を示します。



【プロトコール#1】
インバースPCR法を用いる部位特異的変異導入
(KOD -Plus- Mutagenesis Kitを使用)

- PCR**

滅菌蒸留水	35 (μl)
10×Buffer for iPCR	5
2 mM dNTPs	5
プライマー1 (10 pmol/μl)	1.5
プライマー2 (10 pmol/μl)	1.5
Plasmid DNA (50ng/μl)	1
KOD -Plus- (1 U/μl)	1
Total Volume	50 μl

94℃ 2 min
98℃ 10 sec
68℃ X min*1
4℃ Hold

Y (4~10) サイクル*2

*1 増幅するサイズ(kb)を基に、1min./kbを目安に設定します。例えば、5kbのPlasmidの全周を増幅したい場合には、5min.に設定します。

*2 増幅するサイズ(kb)を基に、1サイクル/kbを目安に設定します。但し、最終的に得られるコロニー数は、用いるコンピテントセルの形質転換効率等によっても変動しますので、実験に余裕がある場合には、反応液を2分割し、二通りのサイクル数にて実施します(例えば、5サイクルと10サイクル)。
- Dpn* I 処理**

PCRの終了した反応液	(全量50 μl)
<i>Dpn</i> I (10U/μl)	2 μl
Total Volume	52 μl

↓
37℃、1h反応
- リン酸化、ライゲーション**

<i>Dpn</i> I処理済みPCR産物	2 μl
滅菌蒸留水	7
Ligation high	5
T4 Polynucleotide Kinase (5U/μl)	1
Total Volume	15 μl

↓
16℃、1h反応 ⇒ 形質転換

インバースPCRにおける増幅は、KOD -Plus- (Code No. KOD-201) のような高正確性PCR酵素を用いる必要があります(前号参照)。これは、PCR産物の末端をライゲーションによって結合するため、平滑末端でなくてはならないからです。また、変異導入部位以外にPCRエラーによる変異が導入されないようにする目的もあります。よって、この用途には正確性が極めて高いKOD -Plus-が適していると言えます。さらにこの方法では、末端をライゲーションにより結合することから、PCR産物をリン酸化する必要があります。

Sリーダーは更に、以前、実際に実験に使用したことのある、プライマーペア(ヒスチジンタグ:図8、アミノ酸点変異ライブラリー:図9)を示して説明してくれました。皆さんも、これらのプライマーペアを用いて変異実験をシミュレーションしてみてください。このようにNNNというような配列を導入できるのは、インバースPCR法の利点でもあります。

ワンポイントメモ ①

Dpn Iは4塩基認識の制限酵素で、Damメチラーゼでメチル化されたGATC配列を認識して、切断するという珍しい性質を有しています。

5' ... CATCACCATCACCATCAC ... 3' Primer #1
 5' ... CGGATAACAATTTACACAGGAACAGAGC ATG ... 3'
 3' ... GCCTATTGT TAAAGTGTGCTTTTGTCTGGTACCTCTCTCTTCTTGCACACATGCCGGGGC TCGGGTTC ... 5'
 3' ... TTAAGTGTGCTTTTGTCTGGTAC ... 5' Primer #2



PCR ⇒ リン酸化/ライゲーション

N-- MetHisHisHisHisHisHisGluArgGluLysAsnValVal ... C
 5' ... CGGATAACAATTTACACAGGAACAGAGC ATG ... 3'
 3' ... GCCTATTGT TAAAGTGTGCTTTTGTCTGGTACCTCTCTCTTCTTGCACACATGCCGGGGC TCGGGTTC ... 5'

図8 ヒスチジンタグ配列挿入例

5' ... NNNAACGTTCCCTCCACAATCCTGTTC ... 3' Primer #1
 5' ... CTGAAGGCCATCCAGGACTACGAGGTGAGGAGCGTGA ... 3'
 3' ... GACTTCGGTAGGTCTGATGCTCCACTCCTCGCACTAGTTGCAAGGGAGGTGTTAGGACAAGGACAGGTTTC ... 5'
 3' ... GGTCTGATGCTCCACTCCTCGCAC ... 5' Primer #2



PCR ⇒ リン酸化/ライゲーション

N-- LeuLysAlaIleGlnAspTyrGluValArgSerVal???AsnValProSerThrIleLeuPheLeuSerLys... C
 5' ... CTGAAGGCCATCCAGGACTACGAGGTGAGGAGCGTGA ... 3'
 3' ... GACTTCGGTAGGTCTGATGCTCCACTCCTCGCACNNNTTGCAGGGAGGTGTTAGGACAAGGACAGGTTTC ... 5'

図9 アミノ酸点変異ライブラリー作製例

表3 大腸菌K12株におけるコドンの使用頻度

(Codon usage database [http://www.kazusa.or.jp/codon/]より転記しました)
Escherichia coli K12 [gbcbct]: 14 CDS's (5122 codons)

UUU (Phe) 19.7	UCU (Ser) 5.7	UAU (Tyr) 16.8	UGU (Cys) 5.9
UUC (Phe) 15.0	UCC (Ser) 5.5	UAC (Tyr) 14.6	UGC (Cys) 8.0
UUA (Leu) 15.2	UCA (Ser) 7.8	UAA (Stop) 1.8	UGA (Stop) 1.0
UUG (Leu) 11.9	UCG (Ser) 8.0	UAG (Stop) 0.0	UGG (Trp) 10.7
CUU (Leu) 11.9	CCU (Pro) 8.4	CAU (His) 15.8	CGU (Arg) 21.1
CUC (Leu) 10.5	CCC (Pro) 6.4	CAC (His) 13.1	CGC (Arg) 26.0
CUA (Leu) 5.3	CCA (Pro) 6.6	CAA (Gln) 12.1	CGA (Arg) 4.3
CUG (Leu) 46.9	CCG (Pro) 26.7	CAG (Gln) 27.7	CGG (Arg) 4.1
AUU (Ile) 30.5	ACU (Thr) 8.0	AAU (Asn) 21.9	AGU (Ser) 7.2
AUC (Ile) 18.2	ACC (Thr) 22.8	AAC (Asn) 24.4	AGC (Ser) 16.6
AUA (Ile) 3.7	ACA (Thr) 6.4	AAA (Lys) 33.2	AGA (Arg) 1.4
AUG (Met) 24.8	ACG (Thr) 11.5	AAG (Lys) 12.1	AGG (Arg) 1.6
GUU (Val) 16.8	GCU (Ala) 10.7	GAU (Asp) 37.9	GGU (Gly) 21.3
GUC (Val) 11.7	GCC (Ala) 31.6	GAC (Asp) 20.5	GGC (Gly) 33.4
GUA (Val) 11.5	GCA (Ala) 21.1	GAA (Glu) 43.7	GGA (Gly) 9.2
GUG (Val) 26.4	GCG (Ala) 38.5	GAG (Glu) 18.4	GGG (Gly) 8.6

●A子さんの設計したタグ配列

CTAATAAGAAGAATA

L I R R I

5.3 3.7 1.4 1.4 3.7 [frequency per thousand]
 (コドンの使用頻度)

●N代さんの設計したタグ配列

TTAATTCGCCGCATT

L I R R I

15.2 30.5 26.0 26.0 30.5 [frequency per thousand]
 (コドンの使用頻度)

図10 2人の選択したコドンと各コドンの大腸菌における使用頻度



Sリーダーからは以下のような解説がありました。

mRNAのコドンの使われ方は、翻訳速度に大きく影響します。現在までに、高頻度コドンに対応するtRNAは細胞内に高濃度で存在し、低頻度コドンに対応するtRNAは低濃度でしか存在しないことが確かめられています。発現させようとする遺伝子に低頻度コドンが多く含まれている場合、対応するtRNAが少ないので翻訳速度が低下し、発現量が少なくなることが調べられています。特に、N末端付近にレアコドンが連続するような場合、発現量に大きく影響する可能性が高いという報告もあるようです。よって、A子さんの配列では、このタンパク質全体の発現量が大きく低下する恐れがあります。

ワンポイントメモ ②

mRNAのコドンの使われ方は、生物種によってかなり異なるようです。よって、他の生物種の発現系を用いて発現実験を行う場合には、注意が必要です。以下の表はコドンの使用頻度を千分率で表したものです。下表には、便宜上6以下の低頻度コドン(stopコドンを除く)を黄色で示しています。これで見ると、大腸菌のK12株とB株では低頻度コドンの分布はほぼ等しいのですが、ヒトやシロイヌナズナなどは低頻度コドンが重なっていないところもあるようです。例えば、真核生物の遺伝子を大腸菌で発現させるような場合、注意が必要です。

実際、低頻度コドンは生物における発現制御にも用いられているようです。例えば、大腸菌におけるrpoDシストロン産物がdnaGシストロン産物より多く合成されるのはこのメカニズムによっていると考えられています。

表4 各生物におけるコドンの使用頻度の比較

(Codon usage database [http://www.kazusa.or.jp/codon/]より転記しました)

大腸菌K12株

Escherichia coli K12 [gbtct]: 14 CDS's (5122 codons)
fields: [triplet] [frequency: per thousand]

UUU (Phe) 19.7	UCU (Ser) 5.7	UAU (Tyr) 16.8	UGU (Cys) 5.9
UUC (Phe) 15.0	UCC (Ser) 5.5	UAC (Tyr) 14.6	UGC (Cys) 8.0
UUA (Leu) 15.2	UCA (Ser) 7.8	UAA (Stop) 1.8	UGA (Stop) 1.0
UUG (Leu) 11.9	UCG (Ser) 8.0	UAG (Stop) 0.0	UGG (Trp) 10.7
CUU (Leu) 11.9	CCU (Pro) 8.4	CAU (His) 15.8	CGU (Arg) 21.1
CUC (Leu) 10.5	CCC (Pro) 6.4	CAC (His) 13.1	CGC (Arg) 26.0
CUA (Leu) 5.3	CCA (Pro) 6.6	CAA (Gln) 12.1	CGA (Arg) 4.3
CUG (Leu) 46.9	CCG (Pro) 26.7	CAG (Gln) 27.7	CGG (Arg) 4.1
AUU (Ile) 30.5	ACU (Thr) 8.0	AAU (Asn) 21.9	AGU (Ser) 7.2
AUC (Ile) 18.2	ACC (Thr) 22.8	AAC (Asn) 24.4	AGC (Ser) 16.6
AUA (Ile) 3.7	ACA (Thr) 6.4	AAA (Lys) 33.2	AGA (Arg) 1.4
AUG (Met) 24.8	ACG (Thr) 11.5	AAG (Lys) 12.1	AGG (Arg) 1.6
GUU (Val) 16.8	GCU (Ala) 10.7	GAU (Asp) 37.9	GGU (Gly) 21.3
GUC (Val) 11.7	GCC (Ala) 31.6	GAC (Asp) 20.5	GGC (Gly) 33.4
GUA (Val) 11.5	GCA (Ala) 21.1	GAA (Glu) 43.7	GGA (Gly) 9.2
GUG (Val) 26.4	GCG (Ala) 38.5	GAG (Glu) 18.4	GGG (Gly) 8.6

大腸菌B株

Escherichia coli B [gbtct]: 11 CDS's (3771 codons)
fields: [triplet] [frequency: per thousand]

UUU 28.9	UCU 8.5	UAU 18.6	UGU 4.2
UUC 18.8	UCC 8.0	UAC 8.5	UGC 5.8
UUA 17.5	UCA 6.1	UAA 1.9	UGA 0.8
UUG 18.6	UCG 11.4	UAG 0.3	UGG 12.7
CUU 12.7	CCU 5.8	CAU 9.3	CGU 16.4
CUC 14.1	CCC 2.4	CAC 7.2	CGC 18.8
CUA 3.4	CCA 7.4	CAA 13.5	CGA 2.4
CUG 54.9	CCG 24.9	CAG 24.7	CGG 5.0
AUU 33.9	ACU 7.7	AAU 21.2	AGU 9.0
AUC 31.0	ACC 25.2	AAC 15.9	AGC 14.3
AUA 5.0	ACA 6.1	AAA 29.2	AGA 2.4
AUG 37.4	ACG 14.6	AAG 8.8	AGG 2.1
GUU 19.6	GCU 13.8	GAU 30.0	GGU 24.4
GUC 14.3	GCC 25.5	GAC 15.1	GGC 33.1
GUA 10.6	GCA 19.6	GAA 29.4	GGA 8.2
GUG 33.9	GCG 32.6	GAG 18.0	GGG 14.3

ヒト

Homo sapiens [gbpri]: 93487 CDS's (40662582 codons)
fields: [triplet] [frequency: per thousand]

UUU 17.6	UCU 15.2	UAU 12.2	UGU 10.6
UUC 20.3	UCC 17.7	UAC 15.3	UGC 12.6
UUA 7.7	UCA 12.2	UAA 1.0	UGA 1.6
UUG 12.9	UCG 4.4	UAG 0.8	UGG 13.2
CUU 13.2	CCU 17.5	CAU 10.9	CGU 4.5
CUC 19.6	CCC 19.8	CAC 15.1	CGC 10.4
CUA 7.2	CCA 16.9	CAA 12.3	CGA 6.2
CUG 39.6	CCG 6.9	CAG 34.2	CGG 11.4
AUU 16.0	ACU 13.1	AAU 17.0	AGU 12.1
AUC 20.8	ACC 18.9	AAC 19.1	AGC 19.5
AUA 7.5	ACA 15.1	AAA 24.4	AGA 12.2
AUG 22.0	ACG 6.1	AAG 31.9	AGG 12.0
GUU 11.0	GCU 18.4	GAU 21.8	GGU 10.8
GUC 14.5	GCC 27.7	GAC 25.1	GGC 22.2
GUA 7.1	GCA 15.8	GAA 29.0	GGA 16.5
GUG 28.1	GCG 7.4	GAG 39.6	GGG 16.5

シロイヌナズナ

Arabidopsis thaliana [gbpIn]: 80395 CDS's (31098475 codons)
fields: [triplet] [frequency: per thousand]

UUU 21.8	UCU 25.2	UAU 14.6	UGU 10.5
UUC 20.7	UCC 11.2	UAC 13.7	UGC 7.2
UUA 12.7	UCA 18.3	UAA 0.9	UGA 1.2
UUG 20.9	UCG 9.3	UAG 0.5	UGG 12.5
CUU 24.1	CCU 18.7	CAU 13.8	CGU 9.0
CUC 16.1	CCC 5.3	CAC 8.7	CGC 3.8
CUA 9.9	CCA 16.1	CAA 19.4	CGA 6.3
CUG 9.8	CCG 8.6	CAG 15.2	CGG 4.9
AUU 21.5	ACU 17.5	AAU 22.3	AGU 14.0
AUC 18.5	ACC 10.3	AAC 20.9	AGC 11.3
AUA 12.6	ACA 15.7	AAA 30.8	AGA 19.0
AUG 24.5	ACG 7.7	AAG 32.7	AGG 11.0
GUU 27.2	GCU 28.3	GAU 36.6	GGU 22.2
GUC 12.8	GCC 10.3	GAC 17.2	GGC 9.2
GUA 9.9	GCA 17.5	GAA 34.3	GGA 24.2
GUG 17.4	GCG 9.0	GAG 32.2	GGG 10.2

今回のバトル、痛みわけという感じでしょうか。それにしても、今回のバトルもお互い大変良い勉強になったようです。

(それからしばらくして…)

A子さんの1年間を通した活動も終わりを迎えました。高成功率PCR酵素『KOD FX』を用いたクルードサンプルや難ターゲットの増幅に関するノウハウもかなり集まりましたし、高正確性PCR酵素『KOD -Plus-』を用いた様々な遺伝子加工技術もSリーダーからの(意地悪な?)質問を通して驚くほど身につきました。何より、実験前にすべての可能性を疑ってみる癖が2人には身についたようです。

新しい年度を向かえ、A子さんとN代さんはますます張り切っているようです。いつの間にか、ここ北陸の長い冬も終わり、暖かな春がやってきたようです。

さて、このシリーズ、そろそろ予定していた紙面を埋め尽くしてしまったようです。この続きは、また機会のあるときにお届けいたします。今後の、皆様方のご活躍を期待しております。



高成功率PCR酵素『KOD FX (Code No.KFX-101)』は、クルードサンプルを用いるPCRにおいて高い効率を示します。前回は、マウステールライセートをサンプルとして用いるPCR法ご紹介しました。そこで今回は、植物ライセートをサンプルとしたPCRについて検討を行いました。この方法を用いることによって、煩雑なDNA精製操作なしで、高効率に植物体からのPCRが可能になると考えられます。

●植物組織の前処理方法

ワンステップ法

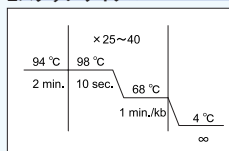
【参考文献】*BioTechniques*, 19: 394 (1995)

図11 ワンステップ法フロー

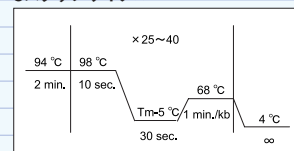
【プロトコール#2】KOD FXの基本反応条件

試薬	添加量(μl)	終濃度
2×PCR buffer for KOD FX	25	1×
2mM dNTPs	10	0.4 mM each
10pmol/μl Primer #1	1.5	0.3 μM
10pmol/μl Primer #2	1.5	0.3 μM
Template DNA	X	Genomic DNA : ~200 ng/50 μl Plasmid DNA : ~50 ng/50 μl cDNA : ~200 ng (RNA相当量)/50 μl (ワンステップ法からのサンプル: ~1 μl)
PCR grade water	Y	
KOD FX (1.0 U/μl)	1	1.0 U / 50 μl
Total	50 (μl)	

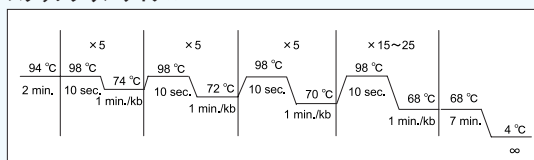
2ステップサイクル



3ステップサイクル



ステップダウンサイクル



※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勧めします。

【ターゲット】

ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase large subunit (rbcL) の1.3kb

【プライマー】

Primer F1 : 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' (トマト&タバコ用)

Primer R1 : 5'-AAGCAGCAGCTAGTTCGGGCTCCA-3' (トマト&タバコ用)

Primer F2 : 5'-ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGC-3' (イネ用)

Primer R2 : 5'-AAGCTGCGGCTAGTTCAGGACTCCA-3' (イネ用)

上記プライマーを用い、2ステップサイクル(伸長時間1.5 min、30サイクル、サンプル1 μl使用)にてPCRを実施しました。

●結果

従来、植物サンプルからのPCRでは、DNAサンプルの調製に大変な時間を要していましたが、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、短時間で解析することができました。一方、今回用いた他のPCR酵素では増幅は認められませんでした。よって、ワンステップ法とKOD FXを組み合わせることが重要であると考えられました。

KOD FXは、夾雑物による阻害に大変強いという特性を有しており、今回の例以外にも、マウステールライセートや酵母などのサンプルにおいても良好な増幅結果が得られています。

実施例を弊社ウェブサイトでご確認いただけます。

www.toyobo.co.jp/bio

1.3 kb ▶

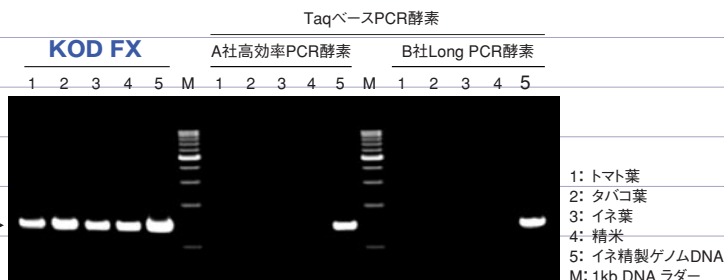


図12 植物ライセートを用いたPCRの結果

A子さん

KOD FXを用いて、植物ライセートからPCRを行う際に何かコツなどありますか？

Sりーダー

今回ご紹介したワンステップ法(前ページ参照)を用いて行う場合、植物ライセートを持ち込み過ぎないようにすることが大切です。50 μ lの反応系に対して、最大1 μ lまでとしてください。また、本方法でサンプル調製を行う場合、サンプルとした植物体がすべて溶解してしまうことはありません。上清を用いてください。

A子さん

インバースPCR法を用いて変異導入する際のプライマーについて、何かアドバイスはありますか？

Sりーダー

最終的に、増幅産物の末端を結合させるような形となりますので、それをイメージしながらプライマーを設計することをお薦めします。基本的に2つのプライマーにオーバーラップ部分は生じることはありませんので、注意してください。また、長い配列を挿入するような場合は、プライマーの両方に均等に挿入部分を配置するような配慮も必要です。とにかく、インバースPCRといえどもPCRなので、日常の経験を踏まえて、PCRがうまく行くようにプライマーを設計することが重要です。

また、本文中にも出ていますが、プライマーの特異的な部分(鋳型DNAと相補性のある領域)が少なくとも20塩基、好ましくは25塩基必要です。よって、多くの場合Tm値は73 $^{\circ}$ Cを超えることから、2ステップサイクルを用いてPCRを行うと便利です。しかし、プライマーのTm値が73 $^{\circ}$ Cより低くなるような場合は、アニーリング温度をTm値より5~10 $^{\circ}$ C程度低く設定した3ステップサイクルをお薦めします。

A子さん

Taq DNAポリメラーゼを使ってインバースPCR法による変異導入実験を行いたいのですが、どうしたら良いですか？

Sりーダー

Taq DNAポリメラーゼには、ターミナルトランスフェラーゼ活性があり、そのPCR産物を用いると3'末端のdAがライゲーションの邪魔をするため、効率が極端に下がってしまいます。よって、校正活性(Proof reading活性)を有するKOD -Plus- (Code No.KOD-201)やKOD FX (Code No.KFX-101)などで増幅した平滑末端を有するPCR産物を用いる必要があります。本文中でもご紹介しましたが、KOD -Plus- Mutagenesis Kit (Code No.SMK-101)を用いると大変便利です。お薦めします。



関連製品紹介

品 名	用 途	包 装	Code No.	価 格
KOD -Plus-	高正確PCR	200U×1本	KOD-201	¥30,000
KOD -Plus- Ver.2	" (さらに高効率)	200U×1本	KOD-211	¥32,000
KOD FX	高成功率PCR	200U×1本	KFX-101	¥35,000
KOD Dash	インサートチェック	250U×1本	LDP-101	¥25,000
Blend Taq®	正確性の不要なPCR全般	250U×1本	BTQ-101	¥19,000
Blend Taq® -Plus-	" (Hot start可能)	250U×1本	BTQ-201	¥21,000
KOD -Plus- Mutagenesis Kit	部位特異的変異導入	20回用	SMK-101	¥38,000
ReverTra Ace - α -®	高効率逆転写	100回用	FSK-101	¥53,000
Ligation high Ver.2	高効率Ligation	750 μ l×1本	LGK-201	¥22,000
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-	DNA断片の精製	200回用	NPK-601	¥28,000
MagExtractor™ -mRNA-	Poly (A) ⁺ RNAの精製	5回用	NPK-801F	¥43,000
T4 Polynucleotide kinase	DNAのリン酸化	1,500U×1本	PNK-111	¥15,000
rATP	リン酸化の基質	50 μ moles/0.5ml	ATP-111	¥15,000
E. coli Alkaline Phosphatase	脱リン酸化	100U×1本	BAP-111	¥15,000
MagExtractor™ -Plasmid-	プラスミドの精製	500回用	NPK-301	¥33,000
Magical Trapper	磁性分離(磁性スタンド)	1個	MGS-101	¥38,000
TArget Clone™	TA Cloning vector	10回用	TAK-101	¥12,000
TArget Clone™ -Plus-	" (KOD専用)	10回用	TAK-201	¥16,000
Competent high JM109	高効率形質転換	0.1ml×10本	DNA-900	¥17,000
Competent high DH5 α	高効率形質転換	0.1ml×10本	DNA-903	¥17,000
Competent Quick DH5 α	サブクローニング用	0.1ml×20本	DNA-913	¥29,000

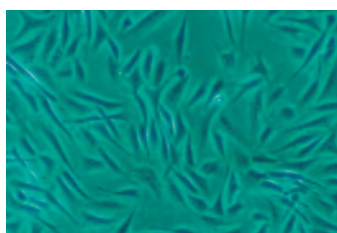
Cell Applications, INC. 製品

国内販売開始
10周年記念

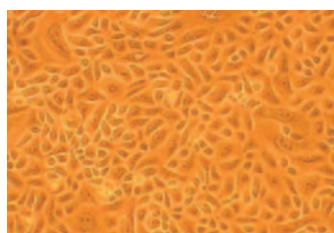
各種初代細胞をはじめTotal RNA、抗体などを取り揃えております。

Cell Applications, INC. (CAI社) では、ヒト及び動物に由来する初代細胞、培地、Total RNA、抗体などの製品を販売しております。

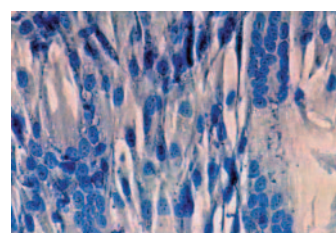
3月まで行っておりまして、まとめ買いキャンペーンで好評につき、さらに日本でのCAI社製品販売開始10周年を記念して、下記のディスカウント価格を常時適用してご提供させていただきます。CAI社の全製品を対象とし、組み合わせは自由です。是非、実験にお役立てください。



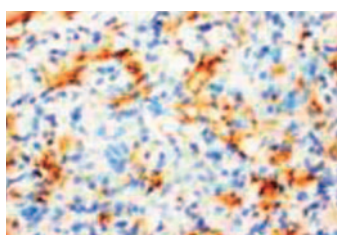
ヒト頭髪毛乳頭細胞
(Code No.CA60205a)



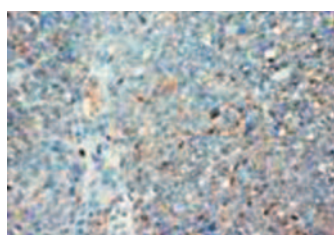
ヒト表皮角化細胞
(Code No.CA10205a)



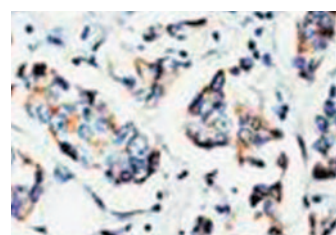
ヒト骨格筋細胞
(Code No.CA15005f)



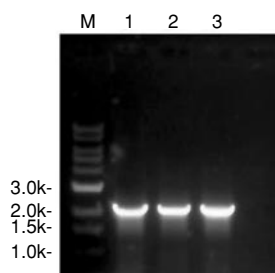
ラット脾臓組織 CD54抗体
(Code No.CACA0541)



ヒト卵巣癌組織 Caspase-8抗体
(Code No.CACA0689)



ヒト乳癌組織 VEGF-D抗体
(Code No.CACA1461)



Hsp60 primer 1によるRT-PCR

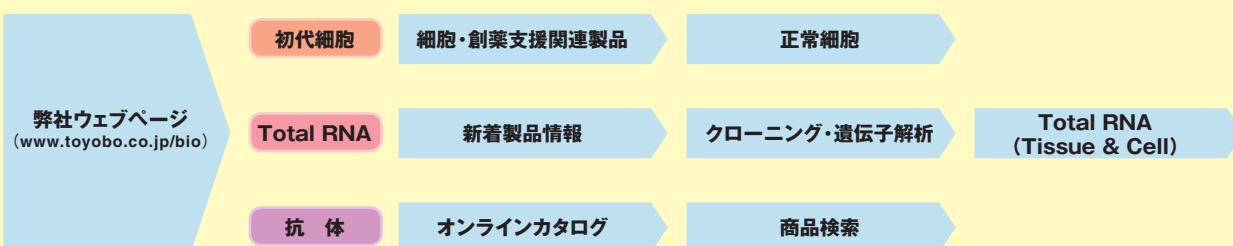
Total RNA 1. Testis (Code No.CA1H51-50)
2. Stomach (Code No.CA1H20-50)
3. Pancreas (Code No.CA1H23-50)

一回の
ご注文で...

- 5～9点ご購入の場合 ➡ **10%OFF**
- 10～19点ご購入の場合 ➡ **15%OFF**
- 20～29点ご購入の場合 ➡ **20%OFF**
- 30～39点ご購入の場合 ➡ **25%OFF**
- 40点以上ご購入の場合 ➡ **30%OFF**

CAI社の製品であれば、色々な製品を組み合わせさせていただいて、結構です!!

※この価格でのご提供は、予告なく終了させていただく場合がございます。

●CAI 社製品は、弊社ウェブサイト (www.toyobo.co.jp/bio) の下記のコーナーでご確認いただけます。

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鋳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2μl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	μl
2x PCR buffer for KOD FX	25	μl
2mM dNTPs	10	μl
10pmol /μl Primer #1	1.5	μl
10pmol /μl Primer #2	1.5	μl
毛根ライセート	2	μl
KOD FX (1.0U/μl)	1	μl
Total reaction volume	50	μl

Target: ヒトβ-globin 1.3kb

Primer #1: TTAGGCCTTAGCGGGCTTAGAC

Primer #2: CCAGGATTTTTGATGGGACACG

② PCRサイクル^{*1}

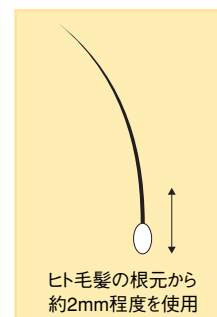
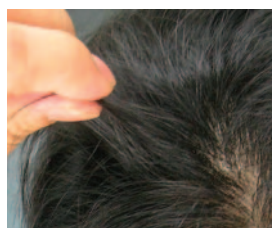
94℃, 2min.

98℃, 10sec.

68℃, 1.5min^{*2} 40 cycles

^{*1} プライマーのTm値が73℃未満の場合は、Tm-5℃、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 18μlを加え、Vortexにて良く攪拌

↓ 95℃ 10min インキュベート

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

↓ 12,000rpm 5min

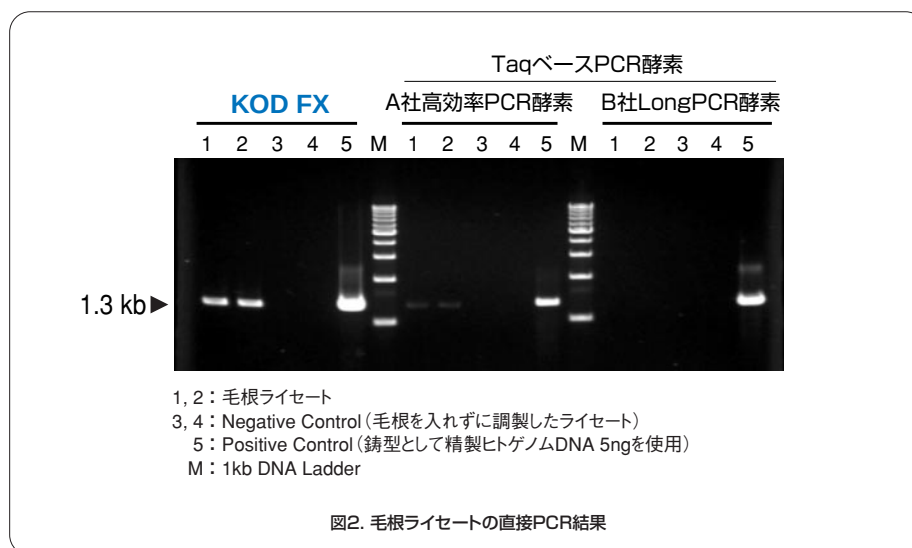
上清2μlをPCR反応に使用

（※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5 μ l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/ μ l) 2 $\times$ PCR Buffer for KOD FX 2mM dNTPs	200U $\times$ 1本 [200回用*]	-20 $^{\circ}$ C	KFX-101	¥35,000
	(200U $\times$ 1本) $\times$ 5 [1,000回用*]	-20 $^{\circ}$ C	KFX-101X5	¥140,000
	(200U $\times$ 1本) $\times$ 10 [2,000回用*]	-20 $^{\circ}$ C	KFX-101X10	¥260,000
2 $\times$ PCR Buffer for KOD FX	1.7ml $\times$ 3本	-20 $^{\circ}$ C	KFX-1B	¥5,000

* 50 μ l反応を行った時の反応回数を表示しています。

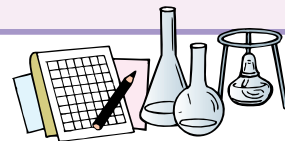
※KOD FXで増幅されたDNA断片は平滑化されているため、通常のTAクローニングはできません。TArget Clone™ -Plus-をお使いください。

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 $^{\circ}$ C	TAK-201	¥16,000

実験のコツ、失敗・成功談



皆様の日々の研究の中で、「こうやったら実験がうまくいった。皆この方法を使えばいいのに…」とか、逆に「あの方法には、実は〇〇〇という欠点が潜んでいる。他の人が失敗しないように、伝えたいのだけど…」といった思いを他人と共有したいという潜在的な要望をお持ちの方は意外と多くいらっしゃるのではないかと思います。このコーナーは、そのような皆様の事例を掲載させていただくことで、今まで共有できなかった情報を共有することを目的とします。

「プラスミドレスキュー作戦」

ペンネーム希望: ネアンデルタール人さん

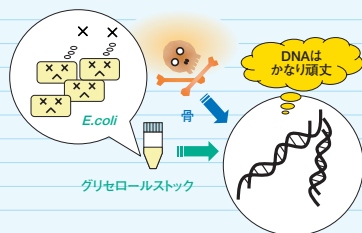
先日、久しぶりに、昔作製したプラスミドを使って実験しようと思い立ちました。しかし、冷凍庫内をどれだけ探しても、目的のチューブが見つかりません。おそらく、この前整理した時にうっかり廃棄してしまったに違いありません。かなりショックでした。

しかし、幸運なことに、プラスミドを形質転換した大腸菌のグリセロールストックはしっかり残っていました。そこで、そのグリセロールストックをLB培地にストリークして家に帰りました。ところが、翌朝、全くコロニーが生じていないことが分かりました。-20℃保存しておいたのが悪かったのか、すべて死滅してしまったようでした。これで万事休すです。あのコンストラクトを作製するのにどれだけの時間を要したかが走馬灯のように脳裏によみがえりました。

そのとき、一筋の光が差ししました。もしかしたら、この死滅した大腸菌からプラスミドが抽出できるかも、というアイデアが浮かんだのです。早速、そのグリセロールストックを遠心分離し、集めた菌体から通常の方法を用いてプラスミドを抽出してみました。すると、量は少ないのですが、分解など受けていないきれいなプラスミドが抽出されてきました。

その結果を見て、「DNAって、なんて頑丈なんだ」という感謝にも似た気持ちが湧き上がってきました。後から、ネアンデルタール人の骨などからDNAが抽出できたという話も聞くと、納得しました。

その晩、そのプラスミドを大腸菌に形質転換して帰ったところ、翌朝、大量のコロニーが得られ、実験を再開することができました。「DNAよ、丈夫でありがとう!」と心の中で思いました。



編集部からのコメント: DNAは酸には弱いですが、その他の過酷な条件ではかなり安定なようです。あきらめなくて良かったですね! 死滅したプレート上のコロニー(4℃保存)からでもプラスミドが取れたという話も聞いたことがあります。

実験川柳特集 9

本コーナーは、弊社ウェブサイト (www.toyobo.co.jp/bio) 「読者のコーナー」で最新の作品を確認いただけます。

お財布と 一緒に飛び出す ゴム手かな

匿名希望 ちさん

【句評】 テーマは「研究生活と日常の融合」ってところでしょうか? その融合が見事に表現されています。思わず生協の食堂を思い出してしまいました。見事です。

細胞を 見てると なぜか母ごころ

匿名希望 バニちゃん さん

【句評】 この気持ち分かります。でも、検鏡しすぎて子供たちを弱らせないように気をつけてくださいね。

IgG 薬になる頃 オレ爺

匿名希望 透明人参 さん

【句評】 I(オレ)gG(じい)ですか…。薬の開発は一生をささげるに値する仕事ではないかと思います。頑張ってください!

錆びてゆく 古びた機器と オレの腕

匿名希望 Type A さん

【句評】 うー。その気持ち分かります。私も発想だけは枯れないようにと願う毎日です。

●Type Aさんのコメント: 慣れないデスクワークが増え、実験をする間隔が空くため、時折行方不明な実験が成功するか不安を感じる今日この頃…。

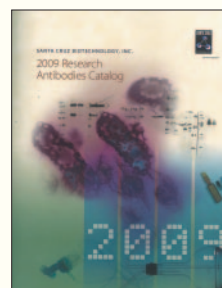
⇒弊社ウェブサイト(読者のコーナー)でご投稿コーナー)からご投稿、投句いただけます。

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

採用になった方には、図書カード(実験のコツ、失敗・成功談:¥10,000、実験川柳:¥2,000)をご進呈いたします(詳しくはサイトをご覧ください)。奮って投稿・投句ください。

●実施例集、新カタログ発刊のお知らせ

KOD FX実施例集、Can Get Signal®実施例集、及びSanta Cruz Biotechnology社 カタログ '09を発刊いたしました。弊社ウェブサイトの [お問い合わせ・ご請求](#) のコーナーより、ご請求・ダウンロードいただけます。



●大包装品およびバッファー発売のご案内

ご好評いただいております、高成功率PCR酵素『KOD FX』、ホットスタート法対応・色素入りTaq Master Mix『Quick Taq™ HS DyeMix』の複数パック包装での販売およびKOD FXのバッファーの別売りを開始しました。

品 名	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

*50μl反応を行ったときの反応回数を表示しています。

品 名	包 装	保存温度	Code No.	価 格
Quick Taq™ HS DyeMix	1.25ml×2本 [100回用*]	-20℃	DTM-101	¥9,800
	(1.25ml×2本) × 10 [1,000回用*]	-20℃	DTM-101X10	¥70,000

*50μl反応を行ったときの反応回数を表示しています。

NOTICE TO PURCHASER : LIMITED LICENSE

●PCR関連商品のラベルライセンスについての詳細は、弊社ウェブサイト (www.toyobo.co.jp/bio) をご覧ください。

- 本ページ掲載の試薬類は全て一般研究用の目的にのみ販売しており、医薬品、診断用医薬品、化粧品、食品用等には使用できませんので、十分ご注意ください。誤用による事故については、当社は一切の責任を負いません。
- 本ページ掲載商品には消費税は含まれておりません。実際のご購入価格については弊社代理店へお問い合わせください。
- 本ページ中の略号：
 - ☞印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外毒物です。
 - ☞印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外劇物です。
 - ☞印は消防法に基づく危険物です。