

製品コード R046A

TAKARA

**PrimeSTAR[®] Mutagenesis
Basal Kit**

説明書

v201107Da

目次

I.	キットの内容	3
II.	保存	3
III.	本システムの原理	3
IV.	プライマー設計について	5
V.	操作	8
VI.	実験例	10
VII.	トラブルシューティング	13
VIII.	関連製品	13
IX.	注意	13

PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit は、ハイファイデリティー PCR 酵素 PrimeSTAR Max DNA Polymerase による極めて正確でスピーディーな増幅に基づく新しい変異導入システムです。鋳型であるターゲット領域を含むプラスミド DNA と変異導入用プライマーを用いて PrimeSTAR Max で増幅した PCR 産物を、そのまま直接大腸菌に形質転換するだけの非常に簡単な操作で、変異導入体を高い効率で取得できます。PrimeSTAR Max の有する世界最高の伸長速度 (5 sec/kb) と抜群の正確性により、長鎖のプラスミドでも極めて短時間に増幅でき、さらに目的の変異導入部位以外に PCR 増幅エラーが入ることはほとんどありません。独自のプライマー設計により PCR の過程で PCR 産物が環状構造になるため、リン酸化反応やライゲーション反応を行うことなく PCR 産物を直接形質転換に使用できます (特許出願中)。

I. キットの内容 (25 回分)

PrimeSTAR Max Premix (2 ×)	625 μl
Control template (pUC118 DNA : 50 ng/μl) *	10 μl
Control Primer F (20 pmol/μl) *	10 μl
Control Primer R (20 pmol/μl) *	10 μl
<i>Xho</i> I *	10 μl
10 × <i>Xho</i> I buffer*	10 μl

* : 6 塩基挿入変異のコントロール実験 (10 回分) と結果の確認 (10 クローン分) が行えます。Control template は、滅菌蒸留水で 10 ~ 100 pg/μl に希釈して使用してください (用時調製)。

II. 保存 - 20°C

III. 本システムの原理

プラスミドを鋳型に 5' 側が 15 塩基オーバーラップしたプライマーを用いて外向きに PCR 増幅を行うことで、オーバーラップ部分が 5' 突出した PCR 産物が得られます (図 1)。この増幅産物は形質転換可能な環状構造をとることができます。

本システムでは、オーバーラップ部分に変異を導入したプライマーと PrimeSTAR Max を用いて PCR を行い、増幅した PCR 産物で直接大腸菌を形質転換する簡便な方法で変異導入体を取得します。適切な PCR 増幅産物が形質転換可能な環状構造をとるため、ライゲーション反応や増幅断片のゲルからの回収は不要です。

PrimeSTAR Max の極めて高い正確性により、狙った部位のみに確実に変異を導入でき、目的部位以外に PCR エラーが入ることはほとんどありません。

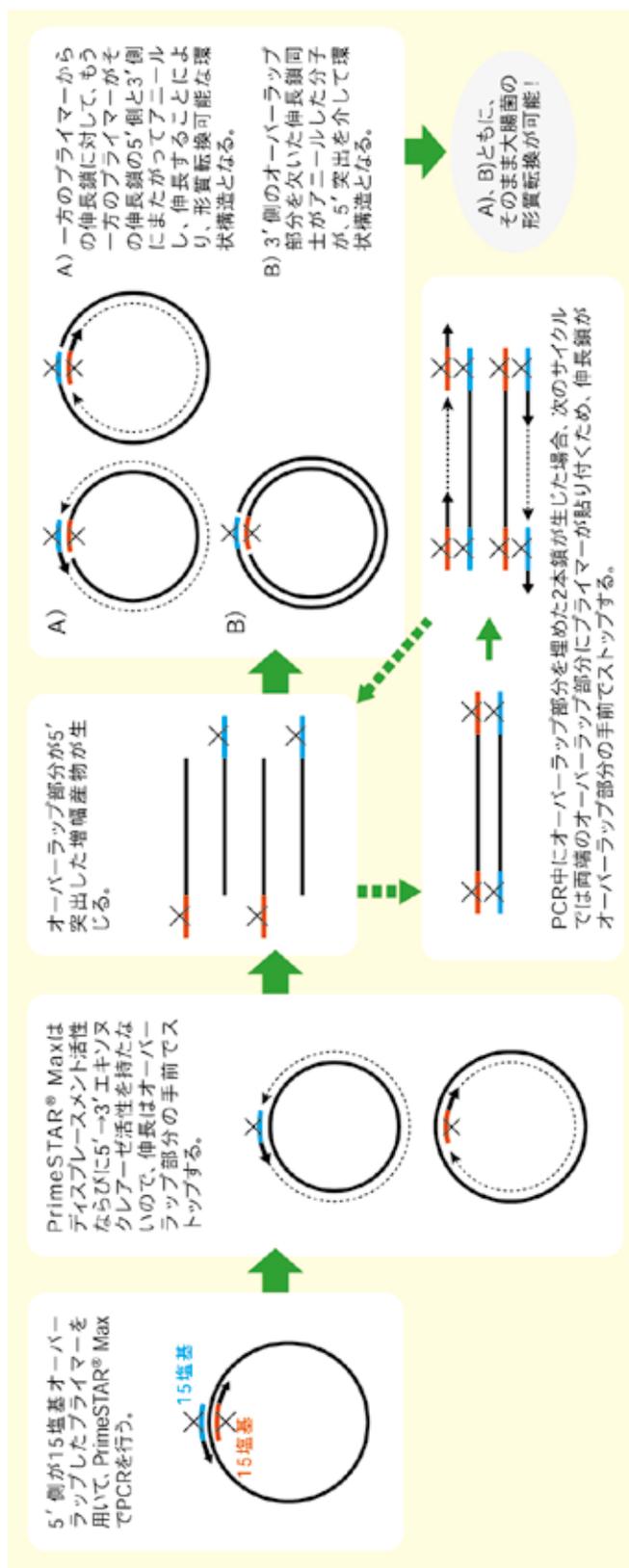
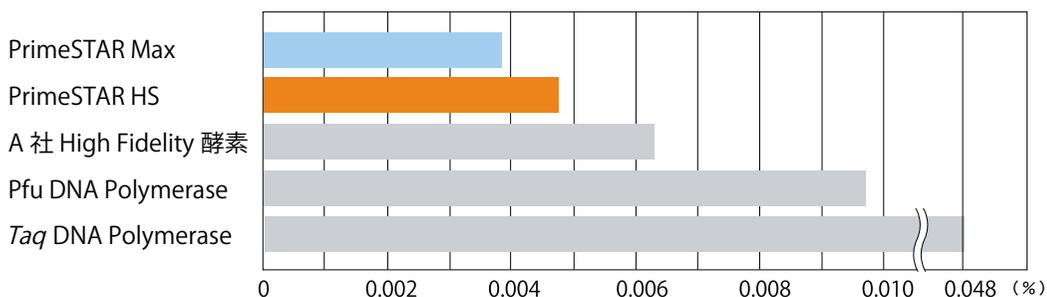


図 1. PCR の過程で形質転換可能な環状二本鎖が得られる原理

◆ PrimeSTAR Max の正確性について

Thermus thermophilus HB8 ゲノム DNA を鋳型として、任意に選択した 8 領域* (増幅サイズはそれぞれ約 500 bp) を PCR 増幅後、ベクターにクローニングし、各配列について複数クローンをピックアップしてそのシーケンスを確認し、mutation frequency を求めました。PrimeSTAR Max DNA Polymerase で増幅した場合、実際に解析した 230、129 塩基のうちエラーはわずか 9 塩基であり、PrimeSTAR HS DNA Polymerase や A 社 High Fidelity PCR 酵素以上の正確性を示しました。この方法は実際の PCR に即した Fidelity の求め方であり、PrimeSTAR Max は正確性が重要な反応に安心して用いることができます。

* : PCR エラーが起こりやすい GC リッチな領域を選択しています。



なお、本キットのコントロール実験において取得したプラスミドの配列を解析した結果、目的部位以外の変異数は、解析した全塩基数 370,656 塩基中わずか 4 塩基のみでした (エラー率: 0.00108%)。 (実験例 2)

IV. プライマー設計について

変異導入に用いるプライマーは、図 3 A ~ C に示すように目的とする変異を導入した配列を想定し、その部位を含む形で設計します。まず変異部位を中心にしてオーバーラップ領域を 15 塩基選定し、次に変異部分から 3' 側に 18 塩基伸ばしたものをプライマー配列として選択します。置換、欠失、挿入のいずれの場合もプライマー設計法は同じです。置換および挿入は 1 ~ 15 塩基の範囲で可能です。欠失の場合、サイズに制限はありません。また、本法は形質転換にライゲーション反応を必要としないので、プライマーのリン酸化は不要です。

◆ プライマー設計上の注意

変異導入プライマーの 5' 側 15 塩基のオーバーラップ配列の GC 含量が 75% を超えると、PCR 効率が低下し変異体が得られない場合があります。その場合には、プライマー設計あるいは PCR 条件の検討が必要です。

また、変異導入プライマーの 5' 側 15 塩基のオーバーラップ配列全長がリピート配列の場合、リピート単位の欠失、挿入が起こる場合があります。

なお、PCR で増幅しない配列を含むプラスミドには本法は利用できません。

GACの部分を TGA に置換する場合

5'-CGTCGTTTTTACAACGTCGTT**GAC**TGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAAC-3'
3'-GCAGCAAAAATGTTTCGAGCA**CTG**ACCCTTTTGGGACCGCAATGGGTTG-5'

↓ 置換を行う

5'-CGTCGTTTTTACAACGTCGTT**TGA**TGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAAC-3'
3'-GCAGCAAAAATGTTTCGAGCA**ACT**ACCCTTTTGGGACCGCAATGGGTTG-5'

↓ **オーバーラップ領域**を 15 base 選定する。
(変異部分をなるべく中心にする)

5'-CGTCGTTTTTACAAC**CGTCGTTGA**TGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAAC-3'
3'-GCAGCAAAAATGTT**CGAGCAACT**ACCCTTTTGGGACCGCAATGGGTTG-5'

↓ 変異部分 から 18 base 3' 側に伸ばす

5'-CGTCGTTTTTACAAC**CGTCGTTGA**TGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAAC-3'
3'-GCAGCAAAAATGTT**CGAGCAACT**ACCCTTTTGGGACCGCAATGGGTTG-5'

↓ 部分を削除して、プライマー配列とする

5'-**CGTCGTTGATGGGAAAACCCTGGCGTT**-3'
3'-**CAGCAAAAATGTTCGAGCAACTACCCTT**-5'

* 1 ~ 15 塩基の置換が可能です。

図 3 A. 置換変異のためのプライマー設計

の部分を欠失させる場合

5'-CGTCGTTTTTACAACGTCGTTGAC**TGG**GAAAACCCTGGCGTTACCCAAC-3'
3'-GCAGCAAAAATGTTTCGAGCACTG**ACC**CTTTTGGGACCGCAATGGGTTG-5'

↓ 欠失を行う

5'-CGTCGTTTTTACAACGTCGTTGACGAAAACCCTGGCGTTACCCAAC-3'
3'-GCAGCAAAAATGTTTCGAGCACTGCTTTTGGGACCGCAATGGGTTG-5'

↓ **オーバーラップ領域**を 15 base 選定する。
(変異部分をなるべく中心にする)

5'-CGTCGTTTTTACAACGTCGTTGACGAAAACCCTGGCGTTACCCAAC-3'
3'-GCAGCAAAAATGTTTCGAGCACTGCTTTTGGGACCGCAATGGGTTG-5'

↓ 変異部分 から 18 base 3' 側に伸ばす。

5'-CGTCGTTTTTACAACGTCGTTGACGAAAACCCTGGCGTTACCCAAC-3'
3'-GCAGCAAAAATGTTTCGAGCACTGCTTTTGGGACCGCAATGGGTTG-5'

↓ 部分を削除して、プライマー配列とする

5'-**TCGTGAC**GAAAACCCTGGCGTTAC-3'
3'-**CAAAAATGTTTCGAGCACTG**CTTTTGGG-5'

* 欠失のサイズに制限はありません。

図 3 B. 欠失変異のためのプライマー設計

□の部分に (CTCGAG) を挿入する場合

5'-CGTCGTTTTACAACGTCGTGACT□GGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAAC-3'
3'-GCAGCAAAATGTTTCGAGCACTGA□CCCTTTTGGGACCGCAATGGGTTG-5'

↓ Insertion を行う

5'-CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTCTCGAGGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAAC-3'
3'-GCAGCAAAATGTTTCGAGCACTGAGAGCTCCCTTTTGGGACCGCAATGGGTTG-5'

↓ オーバーラップ領域を 15 base 選定する。
(変異部分をなるべく中心にする)

5'-CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTCTCGAGGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAAC-3'
3'-GCAGCAAAATGTTTCGAGCACTGAGAGCTCCCTTTTGGGACCGCAATGGGTTG-5'

↓ 変異部分 □ から 18 base 3' 側に伸ばす

5'-CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTCTCGAGGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAAC-3'
3'-GCAGCAAAATGTTTCGAGCACTGAGAGCTCCCTTTTGGGACCGCAATGGGTTG-5'

↓ □ 部分を削除して、プライマー配列とする

5'-GACTCTCGAGGGGAAAACCCCTGGCGTTA-3'
3'-AAAATGTTTCGAGCACTGAGAGCTCCCTT-5'

* 1 ~ 15 塩基の挿入が可能です。

図 3 C. 挿入変異プライマーの設計

V. 操作

- 1) 精製したプラスミド (～10 kb^{*1}) の濃度を測定して、滅菌蒸留水で10～100 pg/μl^{*2}に希釈する (用時調製)。
- 2) 下記に示す反応液を調製する。

< Mutagenesis PCR 反応液組成 >

	使用量	最終濃度
PrimeSTAR Max Premix (2×)	25 μl	1 ×
Primer 1	10 pmol	0.2 μM
Primer 2	10 pmol	0.2 μM
Plasmid (10～100 pg/μl)	1 μl	
滅菌蒸留水	up to 50 μl	

- 3) 下記の条件で PCR を行う。

PCR 条件

98°C	10 sec	} 30 cycles ^{*3}
55°C	15 sec	
72°C	5 sec./kb	

※ PrimeSTAR Max DNA Polymerase を用いた高速増幅システムでは、伸長因子の効果を最大限に発揮させるために3ステップでの反応をお勧めします。

- 4) 目的サイズの増幅産物を確認後^{*4}、PCR反応液2 μlをコンピテントセル^{*5-7}100 μlに添加し、形質転換を行う。

*1: プラスミドサイズが大きくなるに従い、増幅効率とコンピテントセルの形質転換効率 (cfu/μg プラスミド DNA) が低下し形質転換体の出現数は減少します。プラスミドサイズと形質転換効率の関係の一例を以下に示します。鑄型プラスミド由来のバックグラウンドを見積もる際の参考にしてください。形質転換効率は鑄型の質、配列によっても変化し、プラスミドを PCR サイクルに供した後の形質転換ではさらに小さくなります。コンピテントセルに余裕がある場合は変異導入用プライマーなしで反応した場合の鑄型に由来するバックグラウンドをあらかじめ測定することをお勧めします。

プラスミドサイズ	形質転換効率 (cfu/μg プラスミド)
3.2 kb	1.0 × 10 ⁸
7.2 kb	1.2 × 10 ⁷
11.7 kb	4.1 × 10 ⁶

*2: 【重要】 PCR 反応液 (50 μl) に添加する鑄型プラスミド量は10 pg から100 pg に設定してください。

本法は少量の鑄型プラスミド DNA より、PCR の過程で変異部位を含む形質転換可能な環状二本鎖 DNA 分子を効率よく作製することを特長としています。PCR 反応液 (50 μl) 中のプラスミド DNA 量が100 pg を超えると、鑄型プラスミド由来のバックグラウンドのため形質転換後の変異導入体の取得率が低下する恐れがあります。

*3: 鑄型プラスミド DNA (10～100 pg) から大腸菌を効率よく形質転換するために十分な変異導入環状二本鎖 DNA 分子を得るためには、30 サイクルの反応が必要です。

*4: 目的サイズの増幅産物が少なくとも電気泳動で増幅が確認できる場合は操作を継続してください。非特異的増幅産物が混在していても、多くの場合、目的の変異導入体を得ることが出来ます。目的サイズの増幅産物が電気泳動で確認できない場合はトラブルシューティングに従い PCR からやり直すことをお勧めします。

-
- * 5：プラスミドサイズが大きい場合や PCR 後の目的サイズの増幅産物量が少ない場合に形質転換体が得にくいことがあります。10⁸ cfu/μg pUC118 以上の形質転換効率を持つコンピテントセルを使用してください。
- * 6：エレクトロポレーションにより形質転換を行う場合は、エタノール沈殿などにより DNA を回収してから行ってください。
エレクトロポレーションにおいても高い陽性率で変異体を取得することができませんが、変異導入プライマーが効率よく働かず、環状構造をとる PCR 産物が少ない場合に、直鎖状の PCR 産物が末端の平滑部で連結した（変異導入部位がタンデムに連結した）プラスミドを有するコロニーがバックグラウンドとして生じる場合がありますので、ご注意ください。
(通常のケミカルコンピテントセルを使用した場合には、このようなバックグラウンドが生じることはほとんどありません。)
- * 7：コンピテントセルの種類により、PCR 反応液をそのまま添加すると、反応液組成の影響で形質転換が阻害される場合が稀にあります。この場合、PCR 反応液を 5 倍希釈した溶液を使用するか、またはエタノール沈殿により DNA を回収してから使用することで形質転換体を効率よく取得することができます。タカラバイオの *E. coli* HST08 Premium、JM109、DH5α、HST02 Competent cells を使用する場合は、PCR 反応液をそのまま使用しても問題ありません。

< コントロール反応 >

pUC118 DNA を鋳型にしたコントロール反応の場合、β-ガラクトシダーゼの α 相補性が利用できる大腸菌を形質転換すると、X-Gal、IPTG を含む L-Amp プレート上で変異導入体は白コロニーとなり、鋳型由来のバックグラウンドは青コロニーとなります。

また、白コロニーより調製したプラスミドを制限酵素 *Xho*I で切断することにより変異導入を確認することができます。実験例 1 および 2 を参考にしてください。

VI. 実験例

実験例 - 1；変異導入効率の確認

【方法】

pUC118 DNA 10 pg を鋳型に、前述の「プライマー設計について」で例示した各変異導入（置換、欠失、挿入）用プライマーと PrimeSTAR Max を用いて PCR (50 μ l) を行った。その 2 μ l を *E.coli* JM109 コンピテントセル (3×10^8 cfu/ μ g pUC118) 100 μ l に添加し、0 $^{\circ}$ C 30 分、42 $^{\circ}$ C 45 秒の処理後 SOC 培地 1 ml を加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間振とう培養した。そのうち 100 μ l を選択プレート (LB + Amp、IPTG、X-gal) 上で培養し、白コロニー（変異体）と青コロニー（バックグラウンド）をカウントした。

PCR 条件

98 $^{\circ}$ C	10 sec	} 30 cycles
55 $^{\circ}$ C	15 sec	
72 $^{\circ}$ C	20 sec	

【結果】

表 1. 変異導入効率

変異のタイプ	白コロニー	青コロニー	変異導入効率
置換 (3 塩基)	1,948	6	99.69%
欠失 (3 塩基)	2,024	1	99.95%
挿入 (6 塩基)	1,280	2	99.84%

※ 6 塩基挿入に用いたプライマーは、キットコンポーネントの Control primer F と Control primer R に相当します。

表 1 に示すように pUC118 DNA 10 pg を鋳型にした場合、3 種類の変異導入体（置換、欠失、挿入）が 99% 以上の非常に高い確率で取得できることを確認しました。

実験例 - 2；変異導入の正確性の検証

【方法】

実験例 - 1 で得た挿入変異導入体の白コロニー 117 個よりそれぞれプラスミドを調製し、そのすべてのプラスミドについて全長の塩基配列を解析した。

【結果】

117 クローンすべてにおいて目的の変異導入が確認されました。また、目的部位以外の変異は全塩基数 370,656 塩基中わずか 4 塩基のみでした（エラー率：0.00108%）。ハイファイデリティ PCR 酵素 PrimeSTAR Max DNA Polymerase では PCR 増幅エラーがほとんど無いため、非常に正確な変異導入が可能です。

実験例 - 3 ; 8.5 kb の欠失変異体の作製

【方法】

pUC118 DNA の *Hinc* II サイトに 8.5 kb 断片を挿入したプラスミドを鋳型とし、その 8.5 kb を欠失した変異体の取得を試みた。前述のプライマー設計方法に基づいて作製した変異導入プライマーを用い、プラスミド 100 pg を鋳型として PrimeSTAR Max による PCR 増幅を行った (50 μ l 反応系)。その 2 μ l を *E.coli* JM109 コンピテントセル (1×10^8 cfu/ μ g pUC118) 100 μ l に添加し、0°C 30 分、42°C 45 秒の処理後、SOC 培地 1 ml を加えて 37°C で 1 時間振とう培養した。そのうち 100 μ l を選択プレート (LB + Amp, IPTG, X-gal) 上で培養し、青コロニー (変異導入体) と白コロニー (バックグラウンド) をカウントした。さらに、得られた青コロニー (変異導入体) 10 個よりそれぞれプラスミドを調製し、プラスミドサイズおよび *Hinc* II サイト復活の確認した。

PCR 条件

98°C	10 sec	} 30 cycles
55°C	15 sec	
72°C	20 sec	

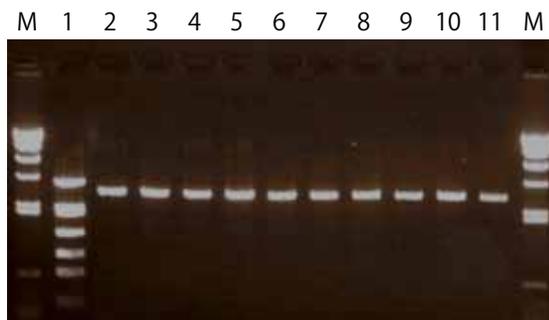
【結果】

プラスミド 100 pg を鋳型とした場合、変異導入体 (青コロニー) 158 個に対しバックグラウンド (白コロニー) は 3 個で、98% の確率で変異体が取得できました。変異導入体 (青コロニー) 10 個より取得したプラスミドはすべて 8.5 kb が欠失したサイズのプラスミドであり (図 4A)、*Hinc* II で 1 箇所切断され 3.2 kb の DNA 断片が得られることから (図 4B)、正しく変異導入 (欠失) できていることが確認されました。



レーン 1: 変異導入前
2~11: 変異導入後
M: λ -*Hind* III digest

図 4 A. プラスミドサイズの確認 (non-cut で電気泳動)



レーン 1: 変異導入前
2~11: 変異導入後
M: λ -*Hind* III digest

図 4 B. *Hinc* II 切断後の電気泳動

実験例 - 4 ; プラスミドサイズによる変異導入効率の変動

【方法】

サイズが 3.2 kb、7.2 kb、11.7 kb のプラスミド（いずれも pUC118 DNA ベース）それぞれ 100 pg を鋳型に、*Xho*I サイトを導入する変異導入プライマーと PrimeSTAR Max を用いて PCR (50 μ l 反応系) を行った。その 2 μ l を *E.coli* JM109 コンピテントセル (4×10^8 cfu/ μ g pUC118) 100 μ l に添加し、0 $^{\circ}$ C 30 分、42 $^{\circ}$ C 45 秒の処理後 SOC 培地 1 ml を加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間振とうした。そのうち 100 μ l を選択プレート (LB + Amp) 上で培養し、コロニーをカウントした。さらに、得られたコロニー (変異導入体) 各 10 個よりプラスミドを調製して *Xho*I 切断を行い、*Xho*I サイトの有無ならびに変異導入の成否 (正しく変異導入が起こった場合、プラスミドはそれぞれ一箇所切断される) を判定した。

PCR 条件

98 $^{\circ}$ C	10 sec	} 30 cycles
55 $^{\circ}$ C	15 sec	
72 $^{\circ}$ C	X sec	

X : 20 秒 (3.2 kb)、40 秒 (7.2 kb)、60 秒 (11.7 kb)

【結果】

3.2 kb、7.2 kb、11.7 kb の各プラスミドを用いた変異導入 (挿入) 実験でそれぞれ 1,496 個、534 個、21 個のコロニーが得られました。それらより任意に取得したプラスミドの変異導入効率は、それぞれ 100% (10/10)、100% (10/10)、80% (8/10) でした (図 5)。鋳型のプラスミドサイズが大きくなるに従い得られる変異体の数は減少しますが、変異導入効率は 7.2 kb のプラスミドで 100%、11.7 kb のプラスミドでも 80% と高効率であることが確認できました。

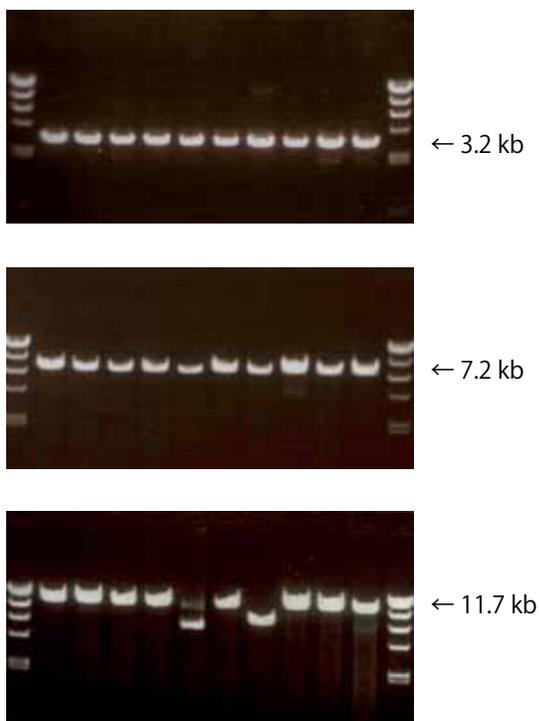


図 5. *Xho*I 切断後の電気泳動
(上 ; 3.2 kb、中 ; 7.2 kb、下 ; 11.7 kb)

VII. トラブルシューティング

現象	改善するポイント	対策
PCRにおいて目的サイズの増幅が全く見られない、少ない。	アニーリング温度	2℃ずつ下げてみる。 2℃ずつ上げてみる。 2 step PCR (98℃ 10 sec/ 68℃ 5 ~ 10 sec/kb)を試す。
	サイクル数	35 ~ 40 サイクルに設定する。
	エクステンション時間	エクステンション時間を 10 sec/kb に設定する。
	鋳型の純度	DNA の精製度を上げる。
PCRにおいてエクストラバンドがでる、スメアする。	アニーリング温度	2℃ずつ上げてみる。 2 step PCR (98℃ 10 sec/ 68℃ 5 ~ 10 sec/kb)を試す。
	アニーリング時間	5 sec に設定する。
	エクステンション時間	エクステンション時間を 10 sec/kb に設定する。
	鋳型の純度	DNA の精製度を上げる。
形質転換体を得られない、少ない。	コンピテントセルの形質転換効率	10 ⁸ cfu/μg pUC118 以上の効率のコンピテントセルを使用する。 形質転換に使用する PCR 溶液を 4 μl に増やす。
	サイクル数	35 ~ 40 サイクルに設定する。
	タンパク質発現が大腸菌に致命的	適切な宿主 - ベクター系で行う。
変異を含まない形質転換体が多い。	PCR 反応液中の鋳型プラスミド量が多い	PCR (50 μl) を鋳型プラスミド量 10 ~ 100 pg の範囲で行う。

VIII. 関連製品

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (製品コード R045A)
E. coli HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)
E. coli JM109 Competent Cells (製品コード 9052)
E. coli DH5 α Competent Cells (製品コード 9057)
E. coli HST2 Competent Cells (製品コード 9127)

IX. 注意

- ・本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・本説明書に記載されている商品名などは、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。

NOTICE TO PURCHASER : LIMITED LICENSE

[L15] Hot Start PCR

Licensed under U.S. Patent No. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

[M54] PrimeSTAR® HS DNA Polymerase

This product is the subject of the pending U.S. patent application and its foreign counterparts.

[M70] PrimeSTAR® Mutagenesis

This product is the subject of the pending Japanese patent application.

製品についての技術的なお問い合わせ先

TakaRa テクニカルサポートライン

Tel 077-543-6116 Fax 077-543-1977

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社