

High Fidelity PCR 酵素 PrimeSTAR® シリーズ ～正確性の検証～

タカラバイオは PCR のリーディングカンパニーとして研究者の皆様のさまざまなニーズにお応えするべく、各種 PCR 酵素をラインナップしています。その中で PrimeSTAR® シリーズは高い正確性と優れた増幅効率を兼ね備え、「使いやすい High Fidelity PCR 酵素」として多くの研究者の皆様からご好評をいただいています。本稿では実際にリピート配列の増幅を行った例や長鎖ターゲットへ部位特異的変異導入を行った例をご紹介します。PrimeSTAR® シリーズの正確性を検証いたします。

■ 実験例 1: 各種 PCR 酵素との正確性の比較 (1) ～ GC リッチターゲット～

まずご紹介するのは、これまでも BIO VIEW やパンフレットなどでご紹介している「正確性の比較」です。弊社では PCR 酵素の正確性を検証するために、複数の増幅産物をシーケンシングしてエラー率を比較するというもっとも実際に近い方法を選択しています。増幅するターゲット配列は、あえて変異が入りやすい GC リッチ領域に設定しています。

【方法】

GC リッチで変異が入りやすい *Thermus thermophilus* HB8 ゲノム DNA を鋳型として、任意に選択した 10 領域 (増幅サイズはそれぞれ約 500 bp) を各種 PCR 酵素で増幅した (反応液組成および PCR 条件は各酵素の推奨プロトコルを使用)。増幅産物を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シーケンシングにより塩基配列を確認した。解析した総塩基数に対するエラー塩基数から mutant frequency を求めた。

【結果】

PrimeSTAR® シリーズの各 PCR 酵素は、増幅産物約 50 万塩基をシーケンシングした結果、エラーがわずか 10～30 塩基でした。High Fidelity PCR 酵素の原点である *Pfu* DNA Polymerase の正確性を上回っています (図 1)。

■ 実験例 2: 各種 PCR 酵素との正確性の比較 (2) ～リピート配列～

【方法 1】

–(GA)₈–あるいは–(CA)₈–のリピート配列を含む 500 bp (λ DNA 由来の配列にリピート配列を挿入したもの)を、各種 PCR 酵素でそれぞれの推奨プロトコルに従って増幅した。増幅産物を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シーケンシングにより塩基配列を確認し、リピート配列に生じた欠失や挿入などエラーの割合を求めた。

【方法 2】

–T₂₆–のリピート配列を含む 555 bp (ヒトゲノム由来配列をプラスミドにクローン化したもの)について方法 1 と同様に各種 PCR 酵素で増幅、クローニング、複数クローンのシーケンシングを行い、T の数をカウントした。

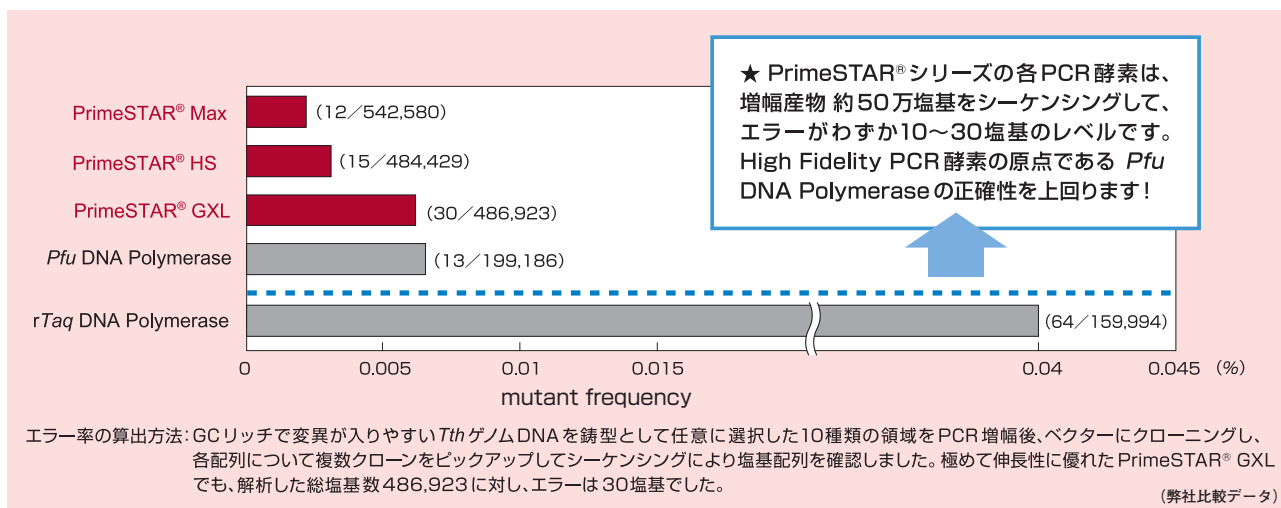


図 1 PrimeSTAR® シリーズと各種 PCR 酵素との正確性の比較

【結果】

リピート配列における複製エラーは酵素の鋳型認識におけるスリッピングによるものであるため、校正活性(3' → 5' exonuclease 活性)では修復できません。従って校正活性を持ち高い正確性を謳う α 型 DNA polymerase であっても、校正活性を持たない Taq DNA polymerase に比べてリピート配列複製の正確性が優れているとは限りません。

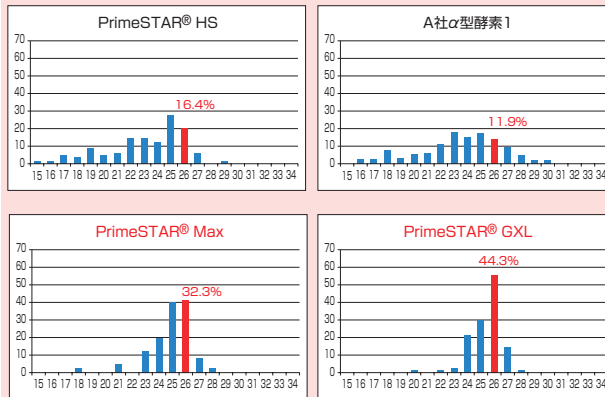
今回の結果から、独自の伸長因子を組み合わせることにより酵素のプロセッシビティー (processivity) を大きく向上させた PrimeSTAR® Max と PrimeSTAR® GXL が、リピート配列の増幅において正確性に優れていることがわかります (表 1、図 2)。

表 1 各種 PCR 酵素のリピート配列 [-(GA)₈-、-(CA)₈-] に対する正確性

	全クローン数	リピート配列の欠失・挿入			変異クローン数	変異クローンの割合
		(GA)2組欠失	(GA)1組欠失	(GA)1組挿入		
Taq	261	3	21	2	26	10.00 %
PrimeSTAR® HS	250	5	25	2	32	12.80 %
PrimeSTAR® Max	201	0	5	0	5	2.49 %
PrimeSTAR® GXL	167	0	4	0	4	2.40 %
A社α型酵素1	131	2	15	1	18	13.74 %
A社α型酵素2	172	2	15	9	26	15.12 %

	全クローン数	リピート配列の欠失・挿入			変異クローン数	変異クローンの割合
		(CA)2組欠失	(CA)1組欠失	(CA)1組挿入		
Taq	269	0	12	2	14	5.20 %
PrimeSTAR® HS	253	1	8	3	12	4.74 %
PrimeSTAR® Max	212	0	3	1	4	1.89 %
PrimeSTAR® GXL	167	0	3	0	3	1.80 %
A社α型酵素1	131	0	8	1	9	6.87 %
A社α型酵素2	179	1	7	10	18	10.06 %

(弊社比較データ)



(弊社比較データ)

縦軸：クローン数 横軸：Tの数
数字(赤字)は -T₂₆-クローンの割合

-T₂₆-のリピート配列を含む555 bp (ヒトゲノム由来配列をプラスミドにクローン化したもの)を各種PCR酵素で増幅してクローニングし、シーケンシングにより各クローンのTの数をカウントし、その分布をグラフ化しました。

PrimeSTAR® GXLおよびPrimeSTAR® Maxは、有意に高い-T₂₆-クローンの割合を示しました。

図 2 各種 PCR 酵素のリピート配列 [-T₂₆-] に対する正確性

■ 実験例 3 : PrimeSTAR® GXL を用いた長鎖ターゲットに対する変異導入

本実験では、PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit (製品コード R046A: Prime STAR® Max を使用) の原理に基づき、変異導入を行いました (PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit は BIO VIEW 53 号で詳しく紹介しています)。

【方法】

ヒト Dystrophin 遺伝子 13.5 kb を pUC118 にクローニングしたプラスミド 10 pg を鋳型に、Dystrophin 遺伝子の 215 番目のプロリンをグルタミン酸に変換する変異導入プライマーと PrimeSTAR® GXL を用いてプラスミド全長 (約 16.6 kb) の PCR を行った (50 μl 反応系)。その増幅産物 2 μl を直接 E. coli JM109 コンピテントセル 100 μl に添加して常法に従って形質転換を行い、1/10 量を選択プレート (LB + Amp) にプレーティングした。得られたコロニー 15 個のうち、任意に 4 個をピックアップしてプラスミドを調製し、インサート部分 13.5 kb の全長シーケンシングを行い、配列を確認した。

【結果】

シーケンシングの結果、4クローンとも正しく変異導入できたことが確認されました。そのうち2クローンについては変異導入箇所以外の変異はまったくなく、残る2クローンもそれぞれ1カ所の point mutation があるのみでした。PrimeSTAR® GXLを用いることにより、長鎖のターゲットの場合でもPCRによる目的部位のみの変異導入を簡単に、効率よく行えることが証明されました(図3)。

■ まとめ

以上のようにPrimeSTAR® GXLやPrimeSTAR® Maxはリピート配列の増幅において高い正確性を示しました。これは他のHigh Fidelity PCR酵素にはない優れた特長です。また、PrimeSTAR® GXLは長鎖増幅においても高い正確性と増幅効率の良さを示します。cDNAライブラリーからのクローニングなど正確性と増幅効率の両方を求められるPCRには最適です。ぜひ一度お試しください、その高い性能をお確かめください。

(PrimeSTAR® シリーズのPCR酵素については、BIO VIEW 50号特集、54号特集1もご参照ください。)

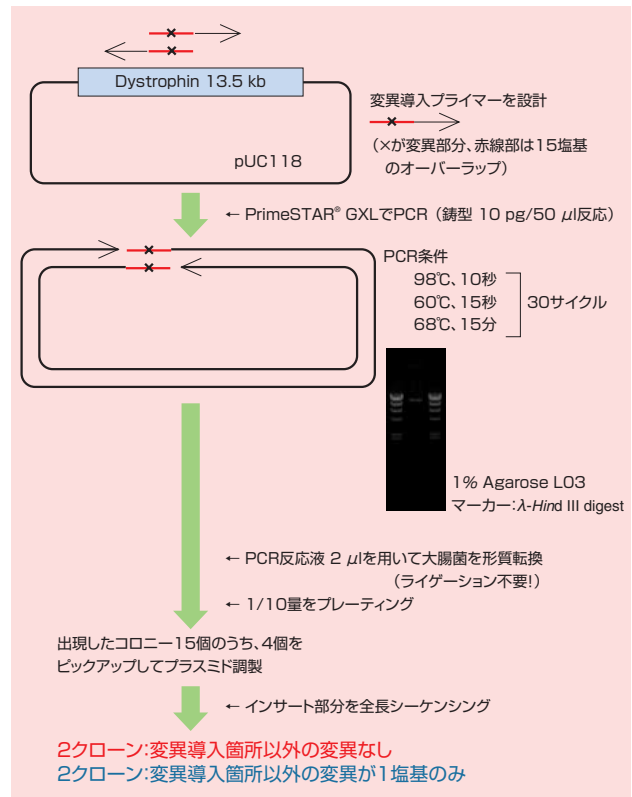


図3 PrimeSTAR® GXLを用いたヒト Dystrophin 遺伝子 13.5 kb への変異導入例

