

PrimeSTAR® Maxだから可能です！ 驚きの変異導入システムをぜひお試しください

PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit

製品コード R046A 25回

- 狙った部位にのみ、確実に変異を導入できます。
- 操作は非常に簡便！ プラスミドと変異導入プライマーを用意し、PrimeSTAR® Max DNA PolymeraseでPCR増幅した後、大腸菌を形質転換するだけです。
- 長鎖のプラスミドでも極めて短時間で正確に変異導入可能です。
- コントロール実験がすぐに行えるコンポーネント付です。

タカラバイオが自信をもってお勧めするPrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kitは、高フィデリティ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、直接大腸菌へ形質転換するだけの非常に簡単な操作で、変異導入体が高い効率で取得できます。PrimeSTAR® Maxの有する世界最速の伸長速度(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の過程で相補的な突出末端が生じて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わずにPCR産物をそのまま形質転換に使用できます*。とにかく簡単、迅速、そして確実です。「変異導入にPCRを使うのはちょっと心配」とお考えの方もぜひ一度お試しください。PrimeSTAR® Maxなら心配はありません。PCRによる簡単で極めて信頼性の高い変異導入をPrimeSTAR® Maxが実現します。(*特許出願中)

■ キットの内容 (25回)

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

*:6塩基挿入変異のコントロール実験で使用されるコンポーネントです。
Control templateは10~100 pg/μlに希釈してご使用ください。

■ 本システムの基本的な原理

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対を用いてPrimeSTAR® Maxで外向きにPCRを行うと、その過程でオーバーラップ部分を5'突出したPCR産物が生じます。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。オーバーラップ部分に変異を導入することにより、PCR産物で直接大腸菌を形質転換するだけで容易に変異プラスミドを取得できます(図1)。

■ 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2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、次に変異部位から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。

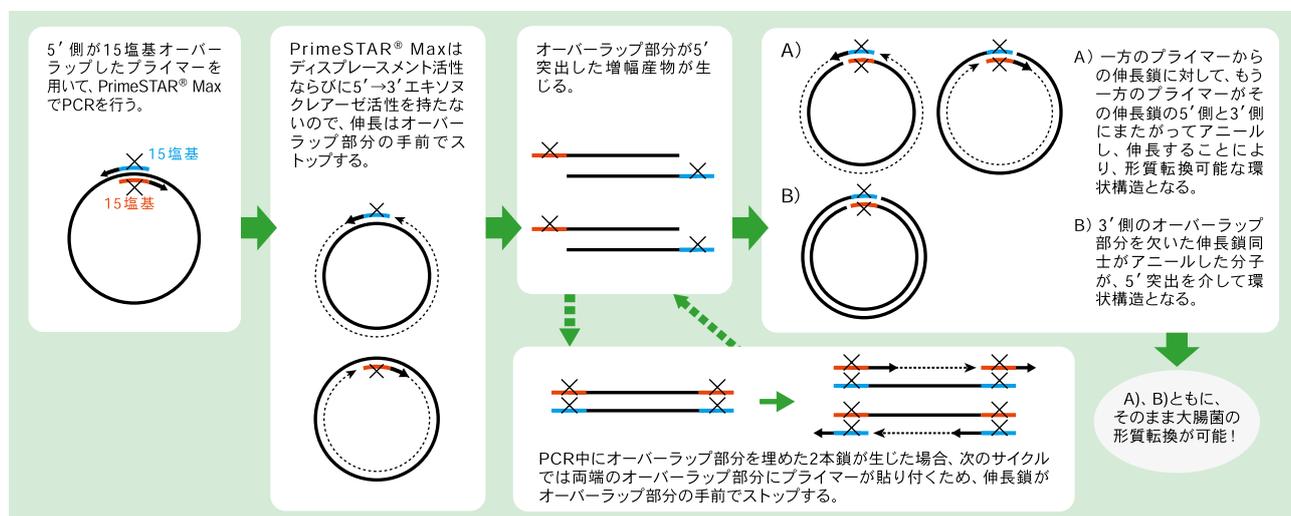


図1 5'突出タイプのPCR産物が得られる原理

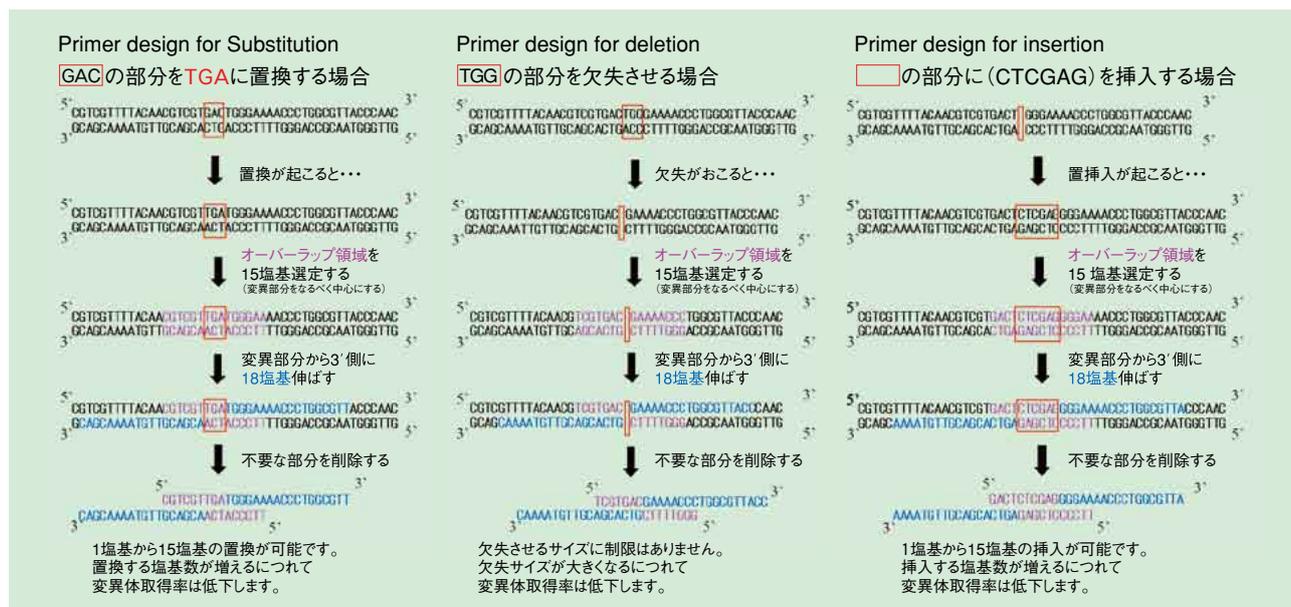


図2 変異導入プライマーの設計方法(置換、欠失、挿入)

■ 実験例-1

(1) 変異導入効率の確認

【方法】

pUC118 DNA 10 pgを鋳型に、前述の各変異導入(置換、欠失、挿入)用プライマーとPrimeSTAR[®] Max Premix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(3 \times 10⁸ 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。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秒	30 サイクル
55 $^{\circ}$ C 15秒	
72 $^{\circ}$ C 20秒	

【結果】

表1に示すように、pUC118 DNA 10 pgを鋳型にした場合、3タイプ(置換、欠失、挿入)の変異導入体を99%以上の非常に高い確率で取得できました。

表1 変異導入効率

変異のタイプ	白コロニー(変異体)	青コロニー(バックグラウンド)	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を、キットのコンポーネント Control primer FとControl primer Rとして含みます。

(2) 変異導入の正確性の検証

【方法】

(1) で得た変異導入体(挿入タイプの白コロニー)117個よりプ

ラスミドを調製し、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、変異導入目的部位以外の変異は全370,656塩基中わずか4塩基のみでした(エラー率:0.00108%)。高フィデリティPCR酵素PrimeSTAR[®] Max DNA PolymeraseによりPCR増幅エラーが非常に低い正確な変異導入が可能となります。

■ 実験例-2: 8.5 kbの欠失変異体の作製例

【方法】

pUC118 DNAのHinc IIサイトに挿入した8.5 kbを欠失させるため、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 PremixによるPCR(50 μ l反応系)*を行った。2 μ lを*E. coli* JM109コンピテントセル(1 \times 10⁸ 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。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(変異体)10個よりプラスミドを調製してHinc II切断を行い、挿入断片の有無を判定した。

*PCR条件

98 $^{\circ}$ C 10秒	30 サイクル
55 $^{\circ}$ C 15秒	
72 $^{\circ}$ C 20秒	

【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%の確率で変異体を取得できました。

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、Hinc IIで1カ所切断

され 3.2 kb の DNA 断片が得られることから、正しく変異導入 (欠失) できていることが確認されました (図 3)。

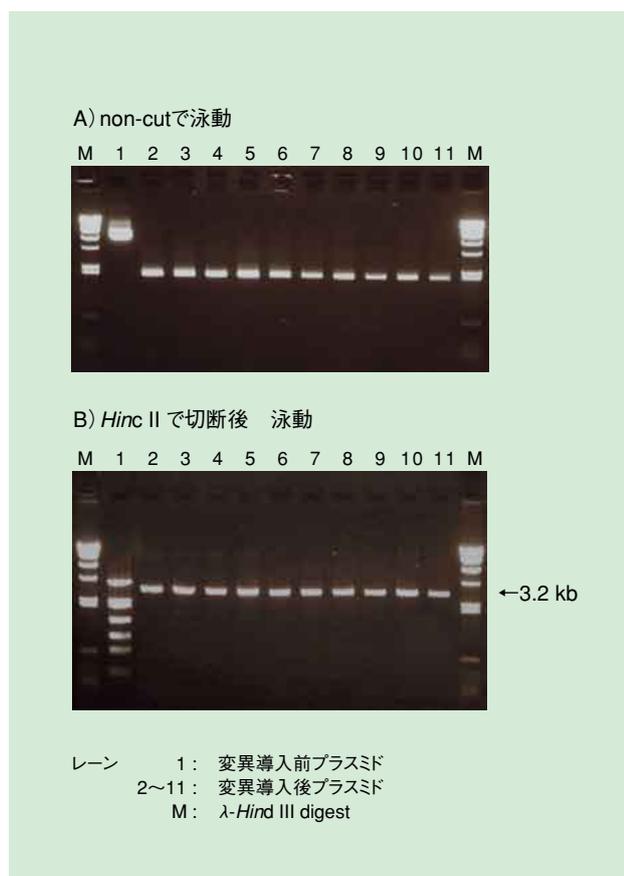


図3 8.5 kb の欠失変異体の作製

■ 実験例-3: 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 + インサート DNA) 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 Premix 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 1 か所で切断される) を判定した。

*PCR 条件

98 $^{\circ}$ C 10 秒	} 30 サイクル
55 $^{\circ}$ C 15 秒	
72 $^{\circ}$ C X	

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率は、それぞれ 100% (10/10)、100% (10/10)、80% (8/10) でした (図 4)。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。

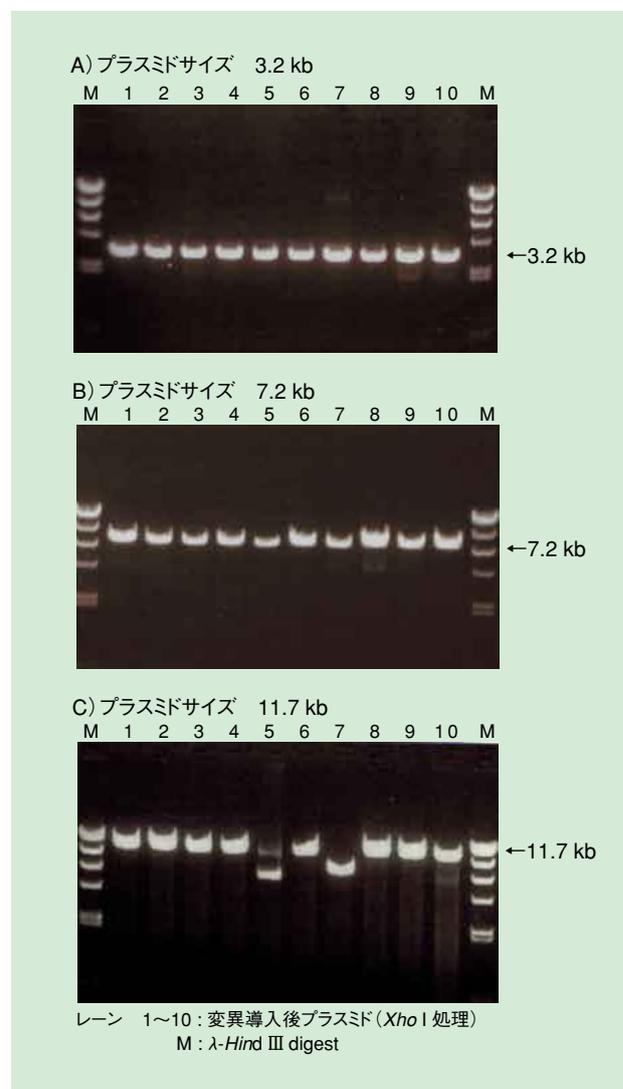


図4 プラスミドサイズによる変異導入効率の比較