



クールドサンプルPlant PCRの最適化



植物由来のダイレクトPCRは、植物組織の種類が多岐にわたること、また、その組織に含まれるPCR阻害物質の影響を受けることにより、難しいアプリケーションとなっています。

阻害物質は少量の植物試料の中にも高い濃度で含まれており、ダイレクトPCRの成功率は通常低く、サンプル量の厳密な管理が必要とされます。

このアプリケーションノートでは、KAPA3G Plant PCRキットを用いた反応の最適化と、クールドサンプルPCRを成功させる方法についてご紹介します。

はじめに

植物組織からのダイレクトPCRによる増幅は、植物組織の種類が多岐にわたること、またその組織に含まれるPCR阻害物質の影響を受けることにより、難しいアプリケーションとなっています。KAPA3G Plant PCRキットは、精製DNAだけでなく、ダイレクトPCR (直接PCR反応液にサンプルを添加)、クールドPCR (粗抽出したDNAを添加) の増幅に成功するよう最適化されています。

KAPA3G Plant PCRキットには、一般的な植物由来のPCR阻害物質 (ポリフェノール類や多糖類など) に対する耐性向上を目的として、directed evolution (KAPA社独自のスクリーニング法) を通じて開発された新規KAPA3G DNAポリメラーゼが含まれています。この酵素のユニークな特性により、多様な種類の植物サンプル、テンプレート、アンプリコンサイズからの強固な増幅が可能となりました。

ほとんど種類の植物では、ごく少量のサンプル内でも阻害物質が高濃度で存在しています。このため、KAPA3G Plant DNAポリメラーゼの阻害物質耐性が向上したものの、ダイレクトPCRの成功率は低いのが通常です。この問題は、サンプリングツールを用いてPCRに使用するサンプルの量をコントロールするか、あるいは、粗抽出法を用いてDNAを溶液中に溶出させ、阻害物質をPCRに影響を与えないレベルにまで希釈するクールドPCRを行うことで対処できます。このアプリケーションノートでは、KAPA3G Plant PCRキットを用いたPlant PCRの最適化、およびクールドPCRの迅速で簡単な方法をご紹介します。

この方法では、精製DNAをテンプレートとして用いた最初の最適化反応条件 (特にアニーリング温度) が必要です。これが達成されれば、特定のアッセイをダイレクトPCRに変換することができるかどうかの判定を行うことが可能となります。ダイレクトPCRが不可能である、あるいは好ましくないといった場合には、クールドPCR法をご検討いただけます。この方法は、ダイレクトPCRと比較し、幅広い植物種やサンプルタイプで成功率が高い、ひとつのサンプルから複数のPCRを実行することが可能である、サンプル量の厳密なコントロールの必要性が低くなるなど多くの利点があります。

精製DNAからのPCR

アニーリング温度の最適化は、*trnL*イントロンをターゲットにしたTab a/b と Tab c/d の2つのユニバーサルプライマーセットで行われました (Taberlet et al)。テンプレートには、*Erica cerinthoides* と *Cinnamomum camphora* から精製したゲノムDNAを使用しました。その結果、TAB a/bプライマーセットはアニーリング温度が56°Cで最適になりましたが、Tab c/dプライマーセットは試験したアニーリング温度の全域で正常に増幅しました (図1)。このテストでは、Tab c/dのアニーリング温度は55°Cが選択されました。次の実験 (図2) では、多様な種類の植物からとった18種類の植物サンプルタイプから精製したゲノムDNAにTab c/dプライマーセットが使用されました。実験対象の18種類の植物全てで期待どおりの増幅が見られました。

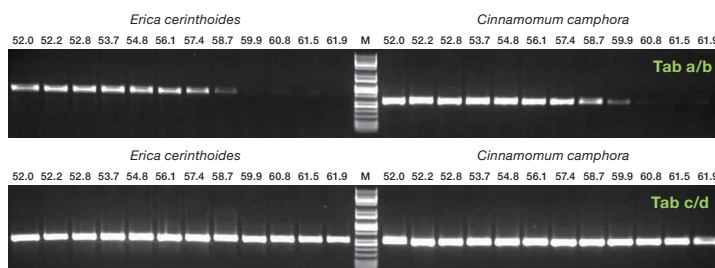


図1. 精製DNAを用いたアニーリング温度の最適化

*trnL*イントロンをターゲットとした2つのプライマーセット (Tab a/b および Tab c/d) (Taberlet et al.) の最適アニーリング温度を決定するため、アニーリング温度でグラジエントPCR (52~62°C) を実行しました。反応 (50 μ l) には、1 X KAPA Plant PCRバッファー (MgCl₂ (1.5 mM) および各dNTP (0.2mM))、各プライマー (0.3 μ M)、KAPA3G Plant DNAポリメラーゼ (1 ユニット)、Qiagen DNeasy Plant ミニキットを用いて *Erica cerinthoides* および *Cinnamomum camphora* より抽出した精製DNA (1 μ l) (反応あたり10 ng) が含まれています。

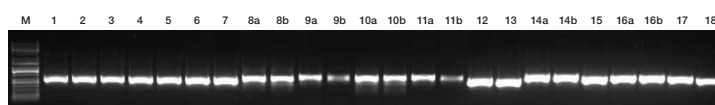


図2. 18種のサンプルから得た精製DNAを用いたPlant PCR

反応 (50 μ l) には、1 X KAPA Plant PCRバッファー (MgCl₂ (1.5 mM) および各dNTP (0.2mM))、*trnL* intron (Taberlet et al.) に標的をあたえたTab c/dプライマーセットに対する各プライマー (0.3 μ M)、KAPA3G Plant DNAポリメラーゼ (1 ユニット)、Qiagen DNeasy Plant ミニキットを用いて抽出した精製DNA (1 μ l) (反応あたり1~10 ng) が含まれています。使用した植物は、1~7: *Erica* spp. (葉)、8~12: *Euphorbia* spp. (葉 (a)、トゲ (b))、13: *Euryops tysonii* (葉)、14: *Schotia brachypetala* (葉 (a) および豆果 (b))、15: *Hyaenanche globosa* (葉)、16: *Acacia sieberiana* (葉 (a) および豆果 (b))、17: *Cinnamomum camphora* (葉)、18: *Fragaria ananassa* (葉) です。アニーリング温度55°C、72°Cで15秒の伸長という条件下で標準の35サイクルPlant PCRが行われました。

クールドサンプルPlant PCRの最適化

ダイレクトPCR

複数の作物を含む8植物種でのダイレクトPCRの成功率を葉あるいは種子(0.35 mmあるいは0.5 mm片)を用いて評価しました(結果は図3)。葉のサンプルの増幅は、ブドウのツルと *Eucalyptus* sppを除き概ね良好でした。種子の成功率は葉よりも低く、非特異的な増幅にいたる傾向がありました。

クールドサンプルの抽出とPCR

ダイレクトPCRに使用した8植物種の葉と種子からクールド抽出サンプルを調製しました。クールド抽出サンプルは、KAPA3G Plant PCRキットのTDSに示された方法で、熱処理(95°Cで5分)をした場合としない場合の両方で行いました。このクールド抽出サンプルでは、PCRのテンプレートとして1 μ lを使用しました。その結果(図4)、全てのサンプルで増幅が良好に行われました。熱処理により、*Eucalyptus* の場合を除いた全ての植物種で収量がわずかに上昇しました。

クールドサンプルPCRの最適化

クールドサンプルのPCRは概ね成功率が高いですが、精製DNAの初期最適化に加えて、クールドサンプルの最適化が必要な場合があります。最適化の対象となる反応パラメータには、酵素やMgCl₂濃度、KAPA Plant PCR エンハンサーの使用などがあります。サイクルパラメータは、通常、最適化の必要はほとんどありませんが、サイクル数や変性時間を増やす必要がある場合もあります。アニーリング温度の再最適化が必要となることもあります。

最適化のプロセスを示すため、アマの種子から得たクールド抽出サンプルを酵素(1または2ユニット)、MgCl₂(2あるいは3 mM)、およびKAPA Plant PCRエンハンサー(0または0.2 X)の8通りの組み合わせで増幅しました。表1にその詳細が示されています。それぞれの条件でこれをアニーリング温度でのグラジエントPCRと組み合わせ、初期に最適化された温度がその後も最適であるかを判断しました。反応条件のうち2つ(5Fおよび5G。表1では緑で表示)はPCR産物の増幅が示されています(このアッセイでの最適アニーリング温度は継続して55°C)。結果の向上は、酵素:2ユニットとMgCl₂:3 mM(パネルは5G)の組み合わせ、また、酵素:2ユニット、MgCl₂:2 mM、0.2 X KAPA Plant PCRエンハンサー(パネル:5F)の組み合わせで見られました。試験を行った組み合わせで結果が十分に向上しなかった場合は、その後の最適化でサイクル数および伸長時間を増やします。

結論

KAPA3G Plant PCRキットを用いたダイレクトPCRは、一部の植物種では迅速かつ簡単な方法ですが、サンプル量の正確なコントロールを行っても、一部のサンプルでは増幅の成功にいたることができませんでした。KAPA3G Plant PCRキットを用いたクールドサンプルPCRは、最も難易度の高い植物種においても、強固で迅速、簡単な植物PCR法です。クールドサンプルPCRでは、広い範囲の植物種とサンプルタイプで、成功率が大幅に上がり、同じPCRから複数のPCRを行うことが可能となり、サンプルサイズの正確なコントロールが不要となります。

一般に、クールドサンプルPCRを行う前に精製DNAを用いて反応条件が最適化されていれば、再度最適化が必要な場合はほとんどありません。追加的に最適化が必要なサンプルに関しては、よりよい酵素とMgCl₂の組み合わせ、およびKAPA Plant PCRエンハンサーの使用を評価して最適な反応条件を決定することが可能です。例外として、サイクルパラメータの最適化が合わせて必要となる場合があります。

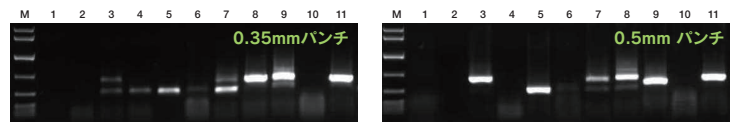


図3. ダイレクトPCRの結果

Tab c/dプライマーペアのダイレクトPCRを0.35 mm (左) あるいは0.5 mm (右) のパンチを用いてサンプリングした8種の植物の葉や種子で行いました。反応は、KAPA3G Plant PCR キットのTDSに従ってセットし、アニーリング温度55°C、72°Cでサイクル当たり20秒の伸長で、45サイクルのPCRを行いました。

1: *Eucalyptus*, 2: ブドウのツル, 3: コムギの葉, 4: コムギの種子, 5: アブラナの葉, 6: アブラナの種子, 7: コメの種子, 8: オオムギの種子, 9: トウモロコシの穀粒, 10: ワタの種子, 11: ワタの葉

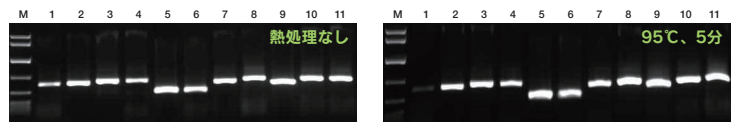


図4. クールドサンプルPCRの結果

Tab c/dプライマーペアのクールドサンプルPCRを熱処理せずに準備した1 μ lのクールド抽出サンプル(左)、熱処理して調製した1 μ lのクールド抽出サンプル(右)を用いて8種の植物の葉や種子で行いました。反応は、KAPA3G Plant PCR キットのTDSに従ってセットし、アニーリング温度55°C、72°Cでサイクル当たり20秒の伸長で、45サイクルのPCRを行いました。

1: *Eucalyptus*, 2: ブドウのツル, 3: コムギの葉, 4: コムギの種子, 5: アブラナの葉, 6: アブラナの種子, 7: コメの種子, 8: オオムギの種子, 9: トウモロコシの穀粒, 10: ワタの種子, 11: ワタの葉

表1. アマの種子から得たクールドサンプルPCRに最適化されたパラメータ

パネル	5A	5B	5C	5D	5E	5F	5G	5H
酵素	1ユニット	1ユニット	1ユニット	1ユニット	2ユニット	2ユニット	2ユニット	2ユニット
MgCl ₂	2 mM	2 mM	3 mM	3 mM	2 mM	2 mM	3 mM	3 mM
エンハンサー	0	0.2X	0	0.2X	0	0.2X	0	0.2X

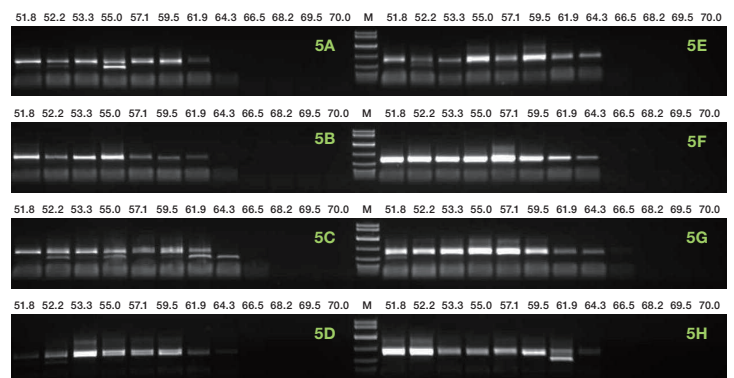


図5. アマの種から得たクールドサンプルの最適化の結果

全て1 μ lのクールド抽出サンプル(熱処理無し)を含む8組のアニーリング温度のグラジエントPCR(52 ~ 70°C)を行って、アマの種子から得たクールドサンプルPCRを最適化しました。反応は、下の表に示すように、酵素、MgCl₂、およびKAPA Plant PCRエンハンサーを様々な組み合わせで行いました。

5Fおよび5Gの条件で最良の結果が得られました。

引用文献

Taberlet et al. *Plant Molecular Biology*. 1991; 17: 1105 – 1109.

反応のセットアップ、サイクルパラメータおよび最適化、およびこれらの方法の確認に用いた植物に関するより詳細な情報は、KAPA3G Plant PCR キットのテクニカルデータシートおよびFAQを参照してください(www.kapabiosystems.com)。