

## new QuikChange® シリーズに新メンバー登場!

### 問題点 Problem

様々な変異導入製品が市販されていますが、高効率での形質転換が可能なエレクトロポレーション用のコンピテント・セルを用いた製品はありませんでした。

### 解決法 Solution

ストラタジーン社の新製品 QuikChange® II-E Site-Directed Mutagenesis Kitは、変異導入の分野で6割以上のシェアを持つ QuikChange® シリーズのエレクトロポレーション用のコンピテント・セルを用いた製品で、高効率での形質転換を可能にし、形質転換方法の選択肢を増やします。

### QuikChange® シリーズ

QuikChange® シリーズには大きく分けて、一箇所に変異を入れるSingleタイプと、一度に複数の箇所に変異を入れられるMultiタイプ (QuikChange® Multi) の二種類があり、前者はさらに、通常バージョンであるQuikChange® II、大きなプラスミド (7~8Kb以上) 用の QuikChange® II XL、そして今回新発売された、形質転換にElectroporation用のコンピテント・セルを用いるQuikChange® II-Eの3種類があります。これらのQuikChange® IIシリーズでは、現在市販されているPCR酵素の中で最も正確性の高いPfuUltra™を使用しています。このため、伸長反応中に生じるエラーを最小限に抑制することができます。

現在も継続販売している前バージョンの QuikChange® シリーズではPfuTurbo® DNA Polymeraseを使用していますが、酵素の正確性は対Taq比でPfuTurbo® では約6倍であるのに対して、PfuUltra® では約18倍になっています。このことから、継続販売はしていますが、当社では前バージョンからQuikChange® II シリーズへの移行を推奨しています。

### 原理と実験手順

#### 1. テンプレートの準備

あらかじめ目的の塩基配列を組み込み、ミニプレップ等で精製したプラスミドを用意します。基本的にどのプラスミドでも構いませんが、下記のステップ4でメチル化したアデニンを含む配列を認識し消化する制限酵素のDpn I (5'-G<sup>m</sup>A<sup>m</sup>TC-3') を用いるため、dam<sup>-</sup>の大腸菌株 (JM110やSCS110) から回収したプラスミドは使用できません。

#### 2. プライマーの作製

目的の変異がプライマーの中央部に来るようにプライマーをデザインします。その際に変異を導入する部位の前後に10~20塩基を配し、プライマーのT<sub>m</sub>を78℃以上になるようにします。T<sub>m</sub>は以下のウェブサイトで簡単に計算できます。

<http://www.stratagene.com/QPCR/tmCalc.aspx>

QuikChange® II-E を含むSingleタイプでは、完全に相補的な一組のプライマー・セットを用います (図1)。プライマーはHPLCやPAGE等で精製しているほうが望ましいですが、5'末端をリン酸化する必要はありません。

#### 3. 変異鎖の合成

通常の3ステップ (denature, annealing, extension) のサイクルで変異鎖を合成します。通常のPCRによる増幅とは異なり、プライマーの構造上、テンプレートの増幅のみが行われアンプリコン (変異鎖) からの増幅は行われないため、偶発的に発生してしまった目的以外の変異が他の変異鎖に受け継がれることはありません。

#### 4. Dpn I による消化

変異鎖の合成が終了した後、Dpn I による二本鎖テンプレート (メチル化) およびテンプレート&変異鎖 (ヘミメチル化) の消化を行います。これにより、変異鎖だけから成る環状二本鎖 (図1) が得られますが、この時点では両プライマーの5'末端部にニックが入ったままです。

#### 5. 形質転換

各製品には、それぞれに最適なコンピテント・セルが添付してあるので、それらを形質転換に用います。形質転換後、大腸菌内でニックが修復され、目的の変異を持つ環状二本鎖のベクターが得られます。

### 応用例

Singleタイプでは塩基置換の他に、挿入や欠失も行うことができます。社内データでは、両者共に12b程度であれば90%以上の効率で確認されていますが、論文の中には、1Kbの挿入や3Kbの欠失に成功した例もあります。この他にもDomain Swappingと呼ばれる、メガ・プライマーを用いた異なるテンプレート間でのドメインの交換が可能です。

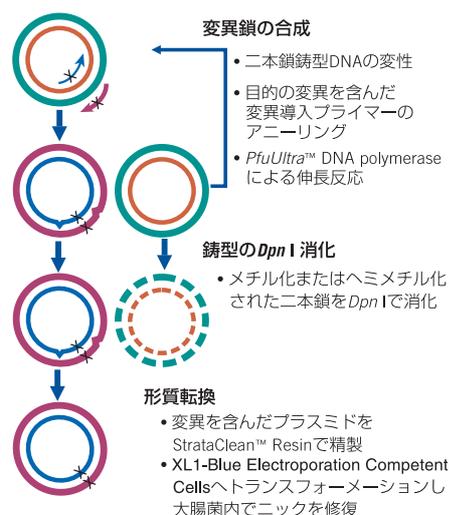


図1 QuikChange® II-E Site-Directed Mutagenesis Kitのメカニズム

### QuikChange® シリーズ

製品	容量	カタログ#	価格(税別)
QuikChange® II-E Site-Directed Mutagenesis Kit	10反応	200555	¥57,000
QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit	10反応	200523	¥52,000
	30反応	200524	¥139,000
QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	10反応	200521	¥59,000
	30反応	200522	¥155,000
QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Academic用)	10反応	200515	¥64,500
	30反応	200514	¥196,000
QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Commercial用)	10反応	200531	¥149,000
	30反応	200513	¥361,000

\*企業及び営利団体の場合は別途ライセンス契約が必要です