

高い増幅効率を併せ持った High-Fidelity PCR 酵素が新登場!! PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase

ライブラリーからのクローニングでは、DNA 増幅において高い Fidelity が要求されます。

タカラバイオではそのようなニーズにお応えして、最高レベルの Fidelity を持った PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase を独自に開発、販売を開始しました。

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase は非常に強力な 3' 5' exonuclease 活性を有し、DNA 増幅において抜群の校正力を示す一方、Taq DNA Polymerase に優る高い増幅効率も併せ持ちます。ここでは、本酵素の実際の反応例を示しながら、その優れた性能と反応条件の決め方についてご紹介します。

特長

- (1) PCR における最高レベルの正確性をご提供します。
- (2) Taq DNA Polymerase に優る効率の高い増幅が可能です。
- (3) GC リッチな配列にも対応し、効率よくしかも正確に増幅できます。
- (4) プライミング効率が高いため、アニーリング時間を短く設定することにより特異性の高い増幅が可能です。
- (5) 抗体を加えた Hot Start 用 PCR 酵素です。

内容(200回反応分)

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase(2.5 U/μl)	100 μl
5 × PrimeSTAR™ Buffer (Mg ²⁺ plus)(5 ×)	1 ml × 2
dNTP Mixture(2.5 mM each)	800 μl

* : Mg²⁺ 濃度は 5 mM(5 ×)です。

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase と各種 PCR 酵素との正確性の比較

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase と3種類のPCR 酵素を用いて、GC リッチな *Thermus thermophilus* HB8 genomic 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 増幅しました。増幅産物をそれぞれ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、塩基配列レベルのエラー率を求めました(図1)。PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase は実際に解析した約 25 万塩基中にエラーはわずか 12 塩基であり、rTaq と比べて Fidelity が 10 倍高く、High-Fidelity 酵素として知られる *Thermococcus kodakaraensis* 由来 DNA Polymerase、*Pyrococcus* 属由来 DNA Polymerase をも上回る非常に高い正確性を示しました。

Taq DNA Polymerase の 10 倍という Fidelity は、mutant phenotype をカウントする Kunkel や Cline の方法で求めた従来の表記方法と比べると大きな差には見えないかもしれませんが、これは実際にシーケンス解析を行って得た値であり、実際の PCR 実験にもっとも即した Fidelity の求め方です。正確性が要求される重要な反応にも安心してご使用いただけます。

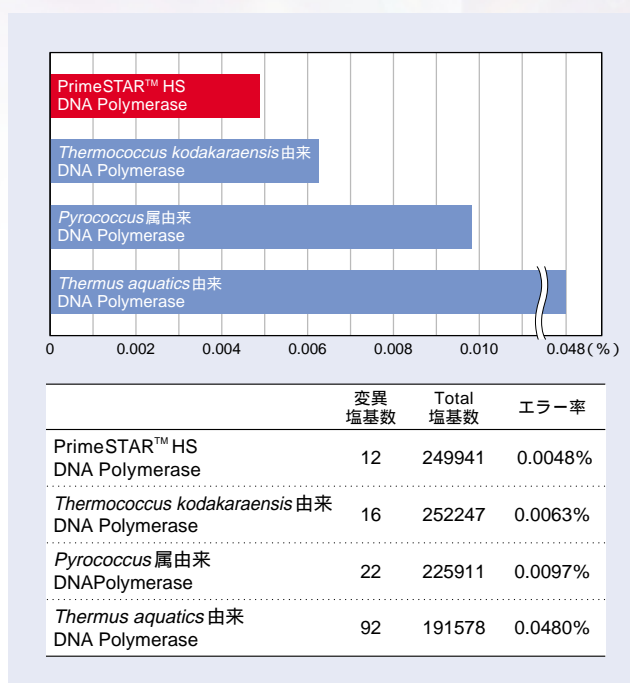


図1 PCR 増幅におけるエラー率の比較

反応液組成および PCR 条件は各酵素の推奨プロトコールに従った。(50 μl 反応系、30 サイクル)

アニーリング時間による特異性の比較

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase には、常温下での DNA Polymerase 活性および 3' 5' exonuclease 活性を抑制するモノクローナル抗体が添加されています。これにより PCR 反応前のミスプライミングやプライマーの消化が抑えられ、PCR 反応の特異性の低下を防ぐことができます。

さらに本酵素は非常に高いプライミング効率を有しているため、アニーリング時間を短時間(5秒または15秒)に設定することで特異性の高い増幅が実現すると同時に反応時間を短縮することができます。一例として、ヒト p53 遺伝子の 0.5 kbp および 4 kbp を、アニーリング時間を変えて PCR 増幅した結果を図2に示します。

なお、PCR 条件設定の詳細に関しては、後述の【PCR 条件】の項をご参照ください。

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase

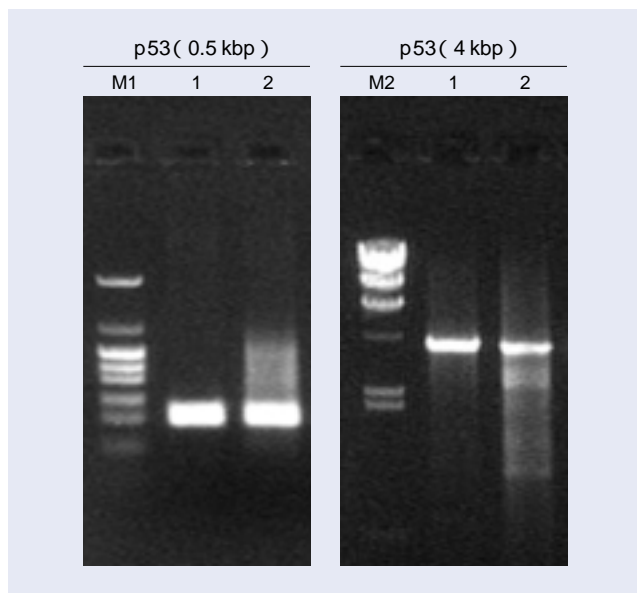


図2 アニール時間による特異性の比較

鋳型 : ヒト genomic DNA 100 ng/50 μl 反応系

PCR 条件 : 3 step PCR

98	10 秒	
55	X 秒	
72	30 秒(0.5 kbp)	30 サイクル
	または 4 分(4 kbp)	

(TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient 使用)

レーン M1 : pHY Marker

M2 : λ-Hind III digest

1 : アニール 5 秒

2 : アニール 30 秒

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase と各社 PCR 酵素との増幅効率の比較

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase では、酵素自身が備えている性能に加え、反応バッファーを高度に至適化することで、幅広いターゲットに対する高感度のPCR増幅が可能です。

(1) ヒト DCLRE1A 遺伝子 2 kbp をターゲットとした PCR 増幅

ヒト DCLRE1A 遺伝子 2 kbp をターゲットとして、*rTaq* および他社 High-Fidelity 酵素と PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase の反応性を比較しました(図3)。

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase は良好な反応性を示し、*rTaq* および他社 High-Fidelity 酵素よりも特異性が高く、1 オーダー高い検出感度が得られました。

(2) GC 含量の高い領域をターゲットとした PCR 増幅

Thermus thermophilus HB8 genomic DNA を鋳型に用い GC リッチ領域(増幅サイズ 537 bp、GC 含量約 70%)をターゲットとして、*rTaq* および他社 High-Fidelity 酵素と反応性を比較しました(図4)。

GC リッチな領域に対しても、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase は良好な反応性を示し、*rTaq* および他社 High-Fidelity 酵素よりも高い検出感度が得られました。

なお、この増幅において PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase のエラー率は 0.0056% であり、高い正確性を維持していました。

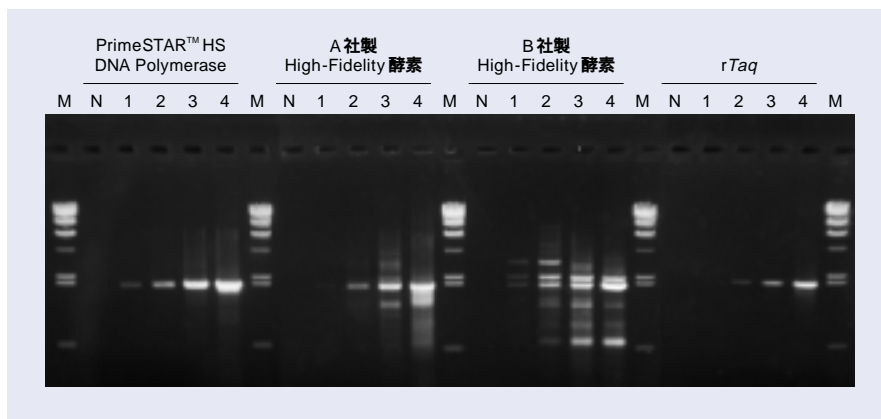


図3 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase と各種 PCR 酵素との増幅効率の比較

反応液組成および PCR 条件は各酵素の推奨プロトコールに従った。

(50 μl 反応系、30 サイクル; TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient を使用)

レーン M : λ-Hind III digest

N : No template

1 : ヒト genomic DNA 100 pg

2 : ヒト genomic DNA 1 ng

3 : ヒト genomic DNA 10 ng

4 : ヒト genomic DNA 100 ng

各 3 μl を泳動

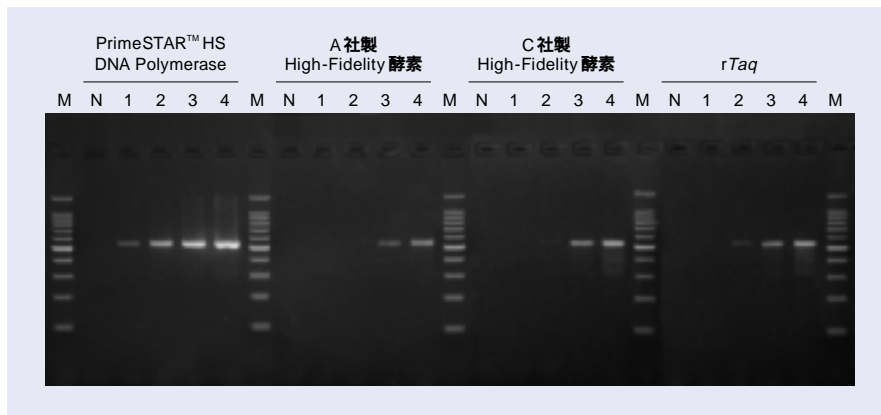


図4 GC リッチな領域での反応性の比較

反応液組成および PCR 条件は各酵素の推奨プロトコールに従った。

(50 μl 反応系、30 サイクル; TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient を使用)

レーン M : 100 bp DNA Ladder

N : No template

1 : Template 10 pg

2 : Template 100 pg

3 : Template 1 ng

4 : Template 10 ng

各 3 μl を泳動

高い増幅効率を併せ持ったHigh-Fidelity PCR酵素が新登場!!

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase

(3) 長鎖 DNA の PCR 増幅

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase は、Fidelity や増幅効率が高いだけでなく、長鎖 DNA の増幅にも適しています。ここではヒトゲノムおよび大腸菌ゲノムを鋳型として、各種サイズの増幅を行った例を示します(図5、6)。

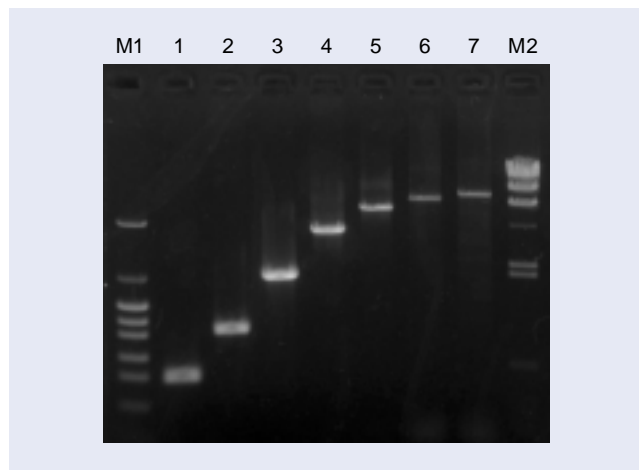


図5 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase を用いたヒトゲノム DNA の増幅

鋳型 : ヒト Genomic DNA 50 ng/50 μl 反応系

PCR 条件 : 0.5 ~ 6 kbp の場合 7.5 ~ 8.5 kbp の場合
 98 10秒 98 10秒
 60 5秒 30 サイクル 68 8分 30 サイクル
 72 1分/kb

(TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient 使用)

レーン M1 : pHY Marker 3 : 2 kbp 6 : 7.5 kbp
 1 : 0.5 kbp 4 : 4 kbp 7 : 8.5 kbp
 2 : 1 kbp 5 : 6 kbp M2 : λ-Hind III digest

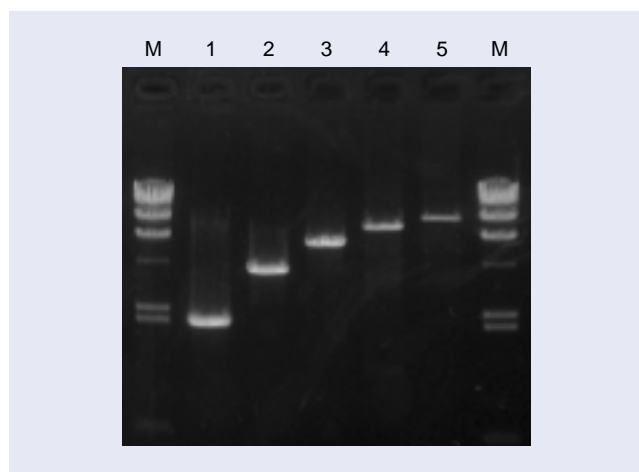


図6 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase を用いた大腸菌ゲノム DNA の増幅

鋳型 : *E. coli* genomic DNA 100 pg/50 μl 反応系

PCR 条件 : 98 10秒
 60 5秒 30 サイクル
 72 1分/kb

(TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice 使用)

レーン M : λ-Hind III digest 3 : 6 kbp
 1 : 2 kbp 4 : 8 kbp
 2 : 4 kbp 5 : 10 kbp

少なくともヒトゲノムで8.5 kbp、大腸菌ゲノムでは10 kbpの増幅が良好に見られました。高次構造をとりやすいゲノムを鋳型にした場合でも、長鎖の増幅が効率よく行えることがわかります。

反応条件の決め方

【一般的な PCR 反応液組成(Total 50 μl)】

	使用量	最終濃度
5 × PrimeSTAR™ Buffer(Mg ²⁺ plus)	10 μl	1 ×
dNTP Mixture(2.5 mM each)	4 μl	200 μM each
primer 1	10 ~ 15 pmol	0.2 ~ 0.3 μM
primer 2	10 ~ 15 pmol	0.2 ~ 0.3 μM
Template	< 200 ng	
PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase(2.5 U/μl)	0.5 μl	1.25 U/50 μl
滅菌蒸留水	up to 50 μl	

PCR 反応液の調製は室温でも可能です。ただし、酵素などの各試薬は氷上に置いて使用してください。

至適鋳型 DNA 量は次のとおりです(50 μl 反応系の場合)。

- ヒト genomic DNA の場合 5 ~ 200 ng(< 200 ng)
- *E. coli* genomic DNA の場合 100 pg ~ 100 ng
- λDNA の場合 10 pg ~ 10 ng
- プラスミド DNA の場合 10 pg ~ 1 ng

必要以上の鋳型 DNA 量を使用することは避けてください。かえって反応性が低下する場合があります。

【 PCR 条件 】

- 3 step PCR の場合
 98 10秒
 55 5秒または15秒 30 サイクル
 72 1分/kb
- 2 step PCR の場合
 98 10秒 30 サイクル
 68 1分/kb

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase を用いた増幅には、基本的に3 step PCR をお勧めします。

- 変性条件
 98、5 ~ 10秒を推奨します。94 で行う場合は10 ~ 15秒に設定してください。
- アニーリング温度
 まず55 で試してください。
- アニーリング時間
 T_m 値(下記の式*で計算)が55 以上の場合
 5秒に設定

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase

Tm 値(下記の式*で計算)が 55 未満の場合
15秒に設定

$$* : Tm \text{ 値}(\quad) = 2(NA + NT) + 4(NC + NG) - 5$$

プライマーの長さが 25 mer 以下の場合に適用してください。25 mer を越える場合は、アニーリング時間を 5 秒に設定してください。

3 step でスミアになる場合、もしくは Tm 値が 70 以上のプライマーを使用する場合には 2 step での反応をお試しください。

【応用例：同一 PCR 条件での増幅】

ヒトゲノムを鋳型として、さまざまな長さのターゲット遺伝子を同一 PCR 条件で増幅しました。

Template : ヒト genomic DNA 100 ng / 50 μl 反応系

PCR 条件 : 98 10 秒
68 8 分 30 サイクル

(TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient 使用)

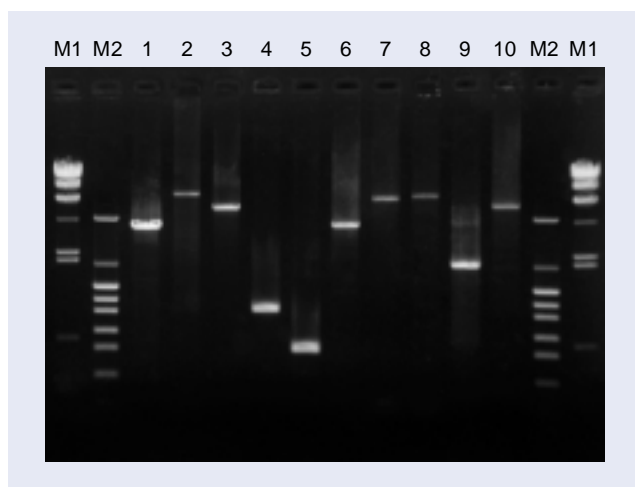


図7 同一 PCR 条件下でのさまざまなサイズの増幅

レーン	内容	長さ
M1	λ-Hind III digest	5 : p53 0.5 kbp
M2	pHY Marker	6 : p53 4 kbp
1	DCLRE1A	4 kbp
2	β-globin	8.5 kbp
3	β-globin	6 kbp
4	DCLRE1A	1 kbp
7	β-globin	7.5 kbp
8	DCLRE1A	8 kbp
9	DCLRE1A	2 kbp
10	p53	6 kbp

このように同一 PCR 条件でも 0.5 kbp から 8.5 kbp までの各種ターゲットを増幅することができました。本酵素は高い Fidelity も兼ね備えており、ライブラリーからのクローニングなどに最適です。

以上のように、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase はこれまでの High-Fidelity 酵素に比べて増幅効率がよく Fidelity も高い、非常に使い勝手のよい酵素です。本酵素が皆様の研究の一助になれば幸いです。

関連製品のご紹介

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase を用いて増幅した PCR 産物のほとんどは平滑末端になります。したがって、PCR 産物をそのまま、あるいは必要に応じてリン酸化を行って平滑末端のベクターにクローニングすることができます (T-vector へのクローニングはできません)

平滑末端ベクターへのクローニングには、別売の Mighty Cloning Kit (Blunt End) (製品コード 6026) の使用をお勧めします。

本キットは、PCR 産物を精製することなく末端平滑化とリン酸化を 1 step で行うことができます。反応後、タンパク質除去フィルターを装着した遠心チューブ Micropure™-EZ で処理し、ろ液をライゲーションに用います。ライゲーション試薬として平滑末端のライゲーションに優れた Ligation Mighty Mix を用いているため、脱リン酸化平滑末端ベクターへの簡便で高効率なクローニングが可能です。

【 Mighty Cloning Kit (Blunt End) のコンポーネント 】

• Reagent Set for Mighty Cloning Kit (Blunt End)	20 回分
1. 10 × Blunting Kination Buffer	40 μl
2. Blunting Kination Enzyme Mix	20 μl
3. Ligation Mighty Mix	120 μl
4. Control Vector (pUC118-Hinc II / BAP)	20 μl
5. Control Insert (200 ng / μl)	10 μl
6. ddH ₂ O	340 μl
• Micropure™-EZ	24 個

Reagent Set for Mighty Cloning Kit (Blunt End) (製品コード 6027) と Micropure™-EZ (製品コード AM003) はそれぞれ単品としても販売しています。

本稿でご紹介した製品

• PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase		
製品コード R010A	250 U	¥30,000
製品コード R010B	250 U × 4	¥96,000
• Mighty Cloning Kit (Blunt End)		
製品コード 6026	20 回	¥30,000

* PCR 酵素につきましては、5,000 U 以上を一括して購入される場合にはバルクディスカウントいたしますので、弊社販売課または弊社試薬取扱店までご相談ください。

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は 48 ページをご覧ください。 [1](#) [2](#)