

High Fidelity PCR 酵素がヒトゲノム 30 kb を増幅! PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase

製品コード R050A 250 U
R050B 1,000 U(A × 4)

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る PrimeSTAR® シリーズに、新たに PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase が加わりました。PrimeSTAR® GXL は PrimeSTAR® HS DNA Polymerase を改良し、さらに独自の伸長因子を組み合わせることで PCR パフォーマンスを飛躍的に向上させた、画期的な High Fidelity PCR 酵素です。本特集では、High Fidelity PCR 酵素の常識を打ち破る PrimeSTAR® GXL の性能をご紹介します。

■ 特長

- 正確性
Pfu DNA Polymerase を上回ります。
- 長鎖増幅
ヒトゲノム DNA を鋳型として 30 kb、λ DNA では 40 kb を増幅可能。長鎖ターゲットの増幅が得意です!
- GC リッチ対応
バッファーの変更や特別な反応条件の設定なしに、高い成功率で GC リッチターゲットを増幅できます。
- cDNA 増幅
核酸量の多い cDNA を鋳型とする増幅にも威力を発揮します*。

* : 一般的に正確性の高い PCR 酵素は核酸量の影響を受けやすく、cDNA を鋳型とする増幅が苦手とされています。

■ 内容 (200 反応分*1)

PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (1.25 U/μl)	200 μl
5 × PrimeSTAR® GXL Buffer (Mg ²⁺ plus)*2	1 ml × 2
dNTP Mixture (2.5 mM each)	800 μl

*1 : 標準プロトコール、反応容量 50 μl での回数

*2 : Mg²⁺ 濃度は 5 mM (5 ×) です。

■ 各種 PCR 酵素との正確性の比較

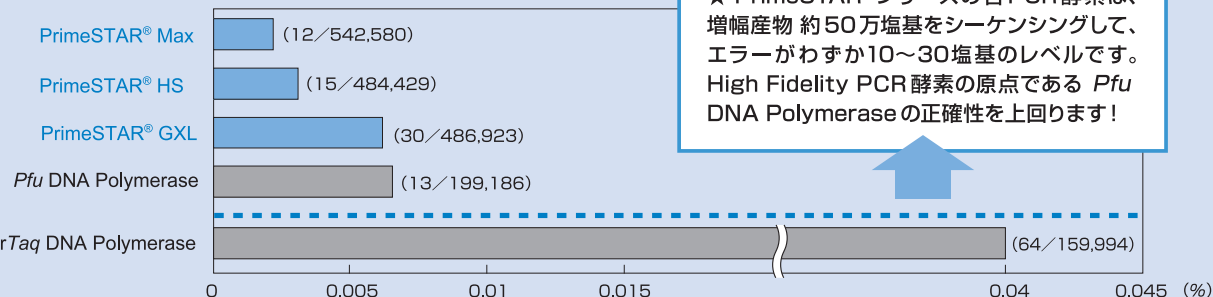
【方法】

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 PrimeSTAR® GXL と各種 PCR 酵素で増幅しました (反応液組成および PCR 条件は各酵素の推奨プロトコールを使用)。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ました。解析した総塩基数に対するエラー塩基数から mutant frequency を求めました。

【結果】

PrimeSTAR® GXL では、解析した総塩基数 486,923 塩基に対しエラーは 30 塩基であり、mutant frequency は 0.0062% となりました。この結果は 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)。

PrimeSTAR® シリーズと各種 PCR 酵素との正確性の比較



★ 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て、エラーがわずか 10~30 塩基のレベルです。High Fidelity PCR 酵素の原点である *Pfu* DNA Polymerase の正確性を上回ります!

エラー率の算出方法: GC リッチで変異が入りやすい *Tth* ゲノム DNA を鋳型として任意に選択した 10 種類の領域を PCR 増幅後、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ました。PrimeSTAR® GXL では、解析した総塩基数 486,923 に対し、エラーは 30 塩基でした。

(弊社比較データ)

図 1 PrimeSTAR® シリーズと各種 PCR 酵素との正確性の比較

High Fidelity PCR 酵素がヒトゲノム 30 kb を増幅! PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase

■ 長鎖ターゲットの増幅

【方法】

ヒトゲノム DNA、λ DNA および cDNA を鋳型として、さまざまなサイズのターゲットを増幅しました (サーマルサイクラーは TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Standard を使用。なお、本稿の PCR はすべて本装置で行いました)。

【結果】

ヒトゲノム DNA を鋳型とした場合は 30 kb、λ DNA では 40 kb、cDNA では 13.5 kb までの増幅が確認できました。高次構造をとりやすいゲノム DNA をはじめ、様々なターゲットに対して非常に良好な伸長性を示すことがわかります (図2)。優れた伸長性を有する PrimeSTAR® GXL を用いることで、これまでの High Fidelity PCR 酵素では増幅できなかった長鎖の増幅が可能です。

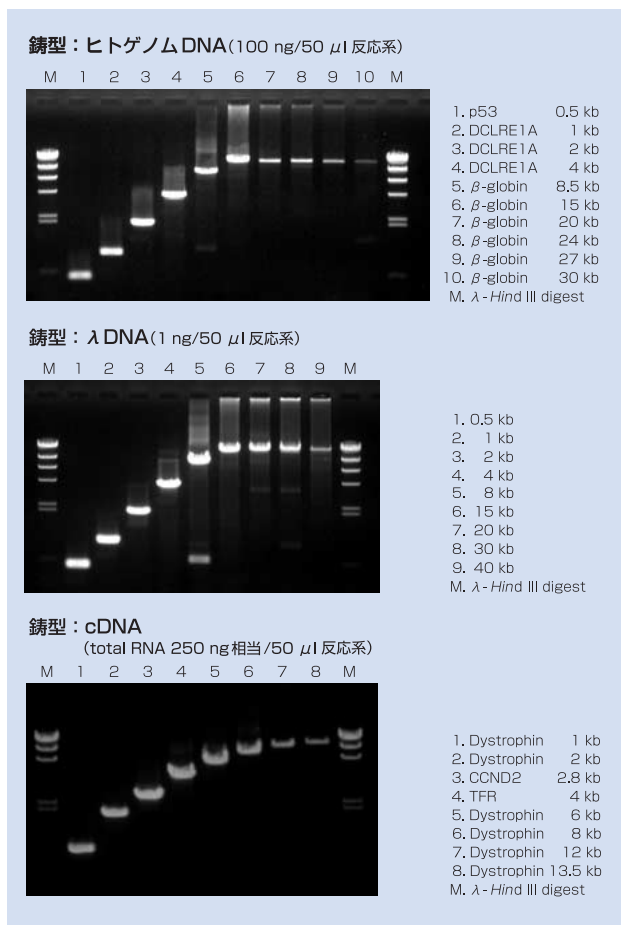


図2 PrimeSTAR® GXL の伸長性の確認

ヒトゲノム DNA を鋳型とした場合は 30 kb、λ DNA では 40 kb、cDNA では 13.5 kb までの増幅が確認でき、様々なターゲットに対して非常に良好な伸長性を示しました。

■ GC リッチなターゲットに対する反応性を 他社 High Fidelity PCR 酵素と比較

【方法】

ヒトゲノム DNA および *T. thermophilus* HB8 ゲノム DNA を鋳型として、増幅領域の GC 含量が 70% 前後の 4 種類の GC リッチなターゲットについて、PrimeSTAR® GXL と他社 High Fidelity PCR 酵素で増幅を行い反応性を比較しました。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いました。

【結果】

PrimeSTAR® GXL は他社 High Fidelity PCR 酵素よりも効率よく、高い反応特異性で目的のターゲットの増幅が可能でした (図3)。非特異的な増幅が occur やすい GC リッチなターゲットでも、PrimeSTAR® GXL を用いれば特別なバッファーや反応条件を設定することなく、特異性の高い増幅が可能です。

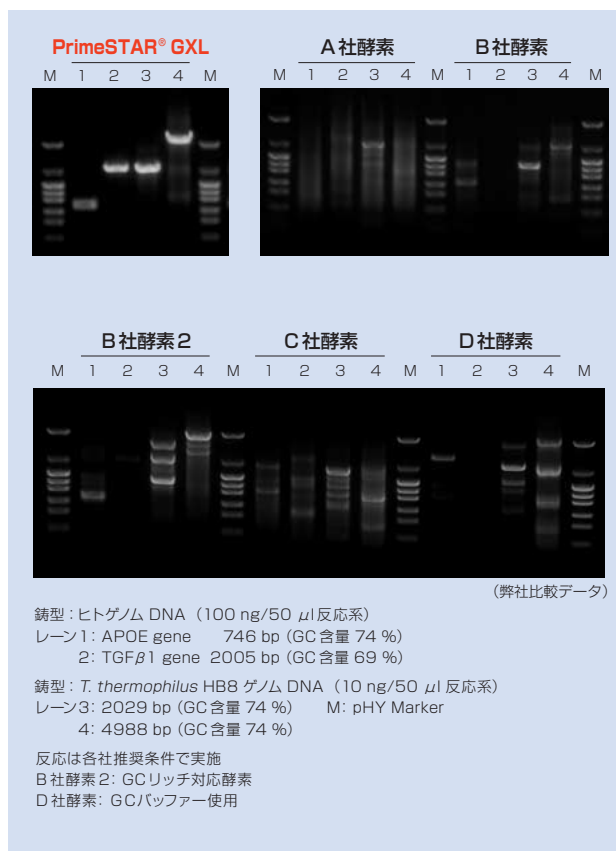


図3 GC リッチターゲットに対する PrimeSTAR® GXL と他社 High Fidelity PCR 酵素との反応性の比較

PrimeSTAR® GXL は様々な GC リッチターゲットをもっとも効率よく増幅し、かつ、高い反応特異性を示しました。

High Fidelity PCR 酵素がヒトゲノム 30 kb を増幅!

PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase

■ cDNA を鋳型とする反応

【方法】

様々な量の HL60 細胞由来 total RNA を逆転写して得られた cDNA を鋳型に、トランスフェリンレセプター (TFR) 領域 4 kb を PrimeSTAR® シリーズの各酵素で増幅し、感度および鋳型量に対する許容性を比較しました。

【結果】

一般に、正確性の高い PCR 酵素は反応液中の核酸量に影響を受けやすく、cDNA を鋳型とする増幅が比較的苦手です。しかし、PrimeSTAR® GXL では 2.5 ng ~ 1 µg にわたる鋳型 cDNA の非常に広い濃度範囲において良好な増幅が見られ、感度、鋳型量許容性とも優れていることがわかりました (図 4)。

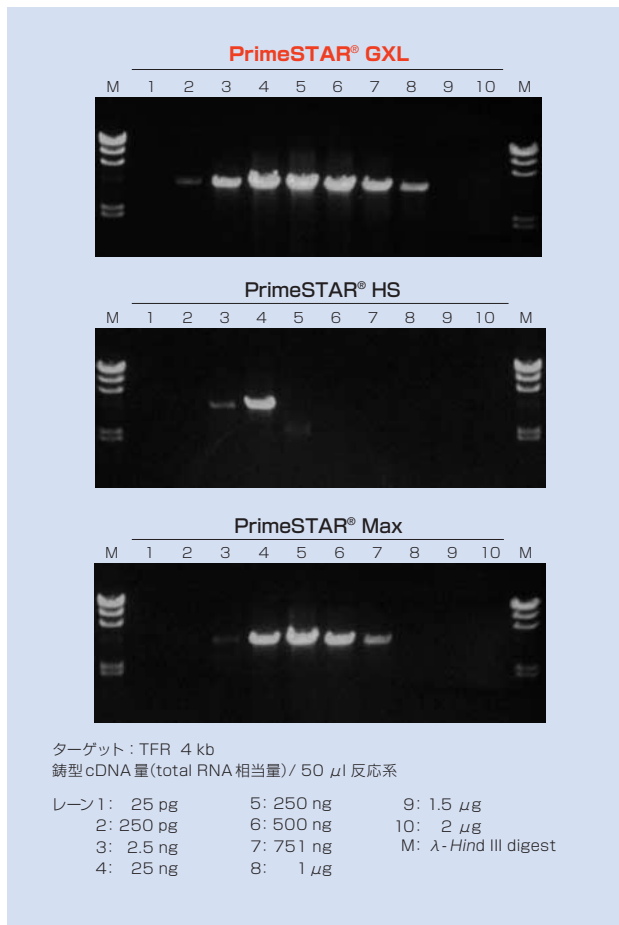


図 4 cDNA を鋳型とする反応: 鋳型量への適応性の比較

正確性の高い PCR 酵素は核酸量の影響を受けやすく、cDNA を鋳型とする増幅が比較的苦手です。しかし、PrimeSTAR® GXL は鋳型 cDNA 量が多い場合でも高い反応性を示しました。

■ 他社 High Fidelity PCR 酵素および rTaq との増幅効率の比較

【方法】

様々な量のヒトゲノム DNA を鋳型として、PrimeSTAR® GXL と他社 High Fidelity PCR 酵素および rTaq の増幅効率を比較しました。

【結果】

PrimeSTAR® GXL では他社 High Fidelity PCR 酵素や rTaq より高感度かつ良好な増幅が見られました。また、他社 High Fidelity PCR 酵素が反応阻害を受けた鋳型量が多い条件下 (ヒトゲノム DNA 500 ng/50 µl 反応系) でも高い反応性を示しました (図 5)。

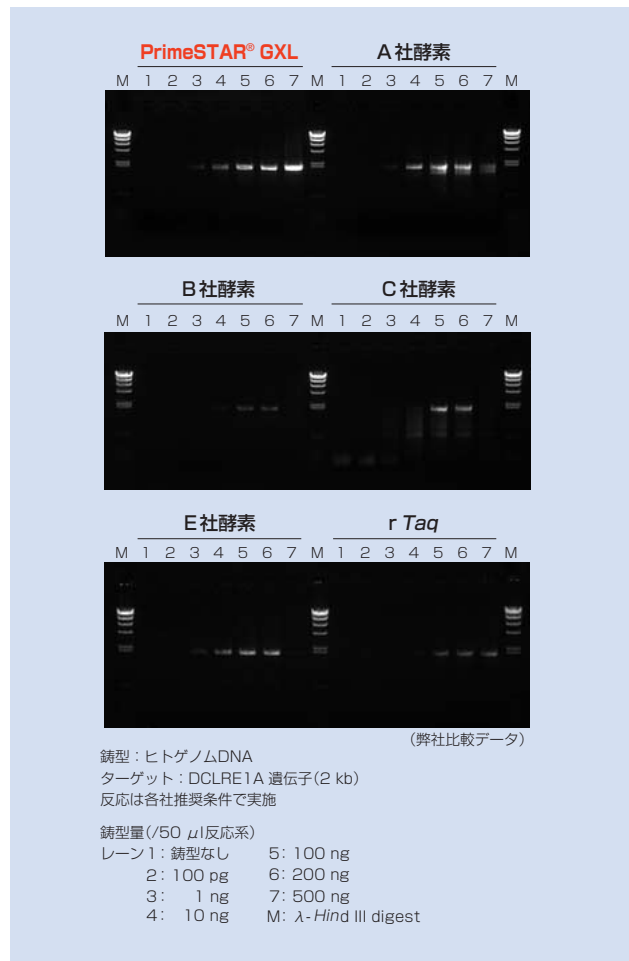


図 5 PrimeSTAR® GXL と他社 High Fidelity PCR 酵素および rTaq との増幅効率の比較

PrimeSTAR® GXL は、他社 High Fidelity PCR 酵素や rTaq より高感度かつ良好な増幅性を示しました。また、他社 High Fidelity PCR 酵素が反応抑制を受ける鋳型量が多い条件下でも高い反応性が見られました。

High Fidelity PCR 酵素がヒトゲノム 30 kb を増幅!
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase

■ **高速 PCR プロトコールでの反応**

PrimeSTAR® GXL は、伸長時間が 1分/kb のスタンダードな PCR 条件を標準プロトコールとしていますが、酵素を 2 倍量使用することにより、伸長時間 10秒/kb の高速 PCR を幅広いターゲットに対して行うことができます。

【方法】

ヒトゲノム DNA を鋳型として、高速プロトコールで各サイズのターゲットを増幅しました。また、様々な濃度の HL60 細胞由来 total RNA を逆転写して得られた cDNA を鋳型に、トランスフェリンレセプター (TFR) 領域 4 kb を高速プロトコールで増幅し、感度および鋳型量に対する許容性を確認しました。

【結果】

ヒトゲノム DNA を鋳型とした反応では、20 kb までの増幅が確認できました (図 6)。また cDNA を鋳型とする反応では、標準プロトコールと同等の感度、鋳型量許容性を維持しながら反応時間を 3 時間から半分以下の 1 時間 20 分に短縮することができました (図 7)。

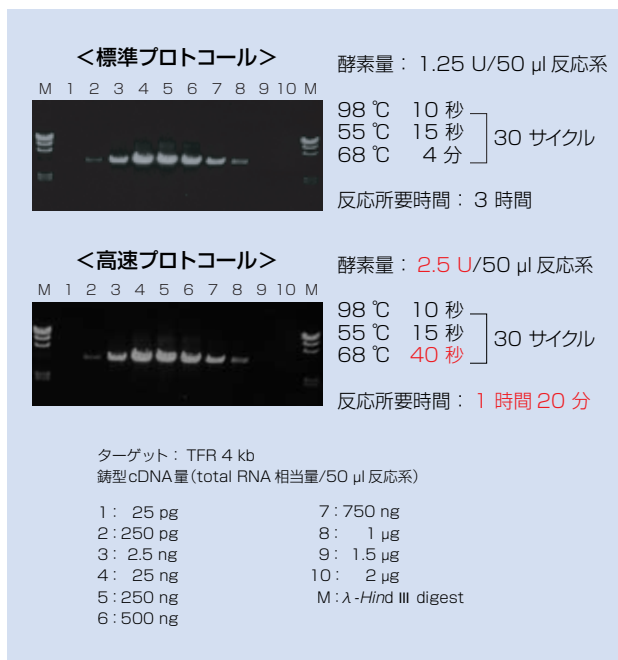


図 7 cDNA を鋳型とした標準プロトコールと高速プロトコールの比較 (2)

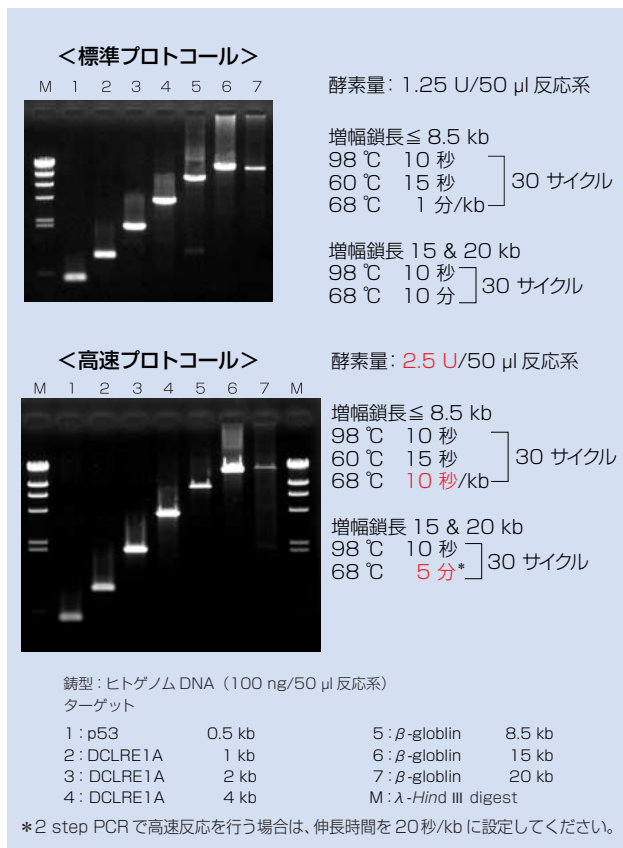


図 6 ヒトゲノム DNA を鋳型とした標準プロトコールと高速プロトコールの比較 (1)

■ **最後に**

以上のように PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase は長鎖の増幅や GC リッチターゲット、cDNA を鋳型とする増幅に威力を発揮し、これまでの High Fidelity PCR 酵素の不可能を可能にします。ぜひ一度皆様の研究にもお試しいただき、その高い性能をお確かめください。