

製品コード R010A

研究用

---

# Takara

## PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA Polymerase

---

説明書

v201905Da

---

PrimeSTAR HS DNA Polymerase は、タカラバイオが独自に開発した高い正確性と高い増幅効率を併せ持つ DNA polymerase です。本酵素は非常に強力な 3' → 5' exonuclease 活性を有し、DNA 合成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示します。常温下での DNA Polymerase 活性および 3' → 5' exonuclease 活性を抑えるモノクローナル抗体を添加しているため、PCR 反応前のミスプライミングやプライマーの消化を防ぐことができます。また、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に設定でき、反応時間を短縮することができます。さらに、反応バッファーを高度に最適化することで、幅広いターゲットに対して高 Fidelity、高感度、高特異性、高い成功率が実現しました。

## I. 内容 (200 反応分、50 $\mu$ l 反応系)

PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l) *1	100 $\mu$ l
5 × PrimeSTAR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus) *2	1 ml × 2
dNTP Mixture (2.5 mM each)	800 $\mu$ l

### \* 1 : 【酵素の形状】

50 mM	Tris-HCl 緩衝液 (pH8.2 at 4°C)
100 mM	NaCl
0.1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0.1%	Tween 20
0.1%	NP-40
50%	Glycerol

### 【活性の定義】

活性化サケ精子 DNA を鋳型／プライマーとして用い、74°Cにおいて 30 分間に 10 nmol の全ヌクレオチドを酸不溶性沈殿物に取り込む活性を 1 U とする。

\* 2 : Mg<sup>2+</sup>濃度は 5 mM (5 ×) です。

## II. 保存 — 20°C

### III. 特長

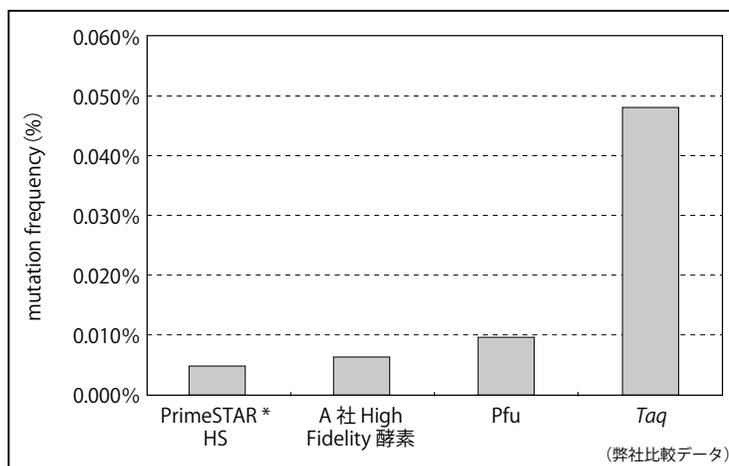
#### A. 正確性

GC rich 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そのシーケンスを確認し、mutation frequency を求めました。

その結果、PrimeSTAR HS DNA Polymerase は *Taq* DNA Polymerase と比べて 10 倍 Fidelity が高く、A 社 High Fidelity PCR 酵素に比べても同等以上の正確性を示しました。

この方法は、実際の PCR に最も即した Fidelity の求め方です。正確性が重要な反応に安心してご使用いただけます。

各酵素のFidelity 比較

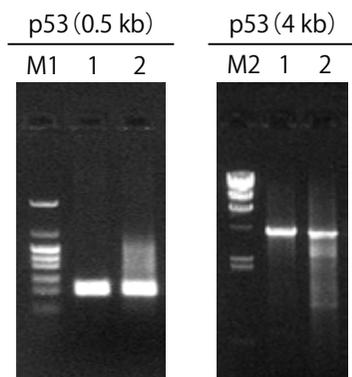


\* : PrimeSTAR HS で増幅した場合、実際に解析した 249,941 塩基のうち、エラーはわずかに 12 塩基でした。

#### B. アニール時間

PrimeSTAR HS DNA Polymerase は、非常に高いプライミング効率を有しています。そのため、アニール時間を短時間 (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します。

条件設定の詳細に関しては、V. PCR 条件 (6 ページ) でご確認ください。



1 : アニール時間 55°C 5 秒  
2 : アニール時間 55°C 30 秒

M1 : pHY Marker  
M2 :  $\lambda$ -*Hind* III digest

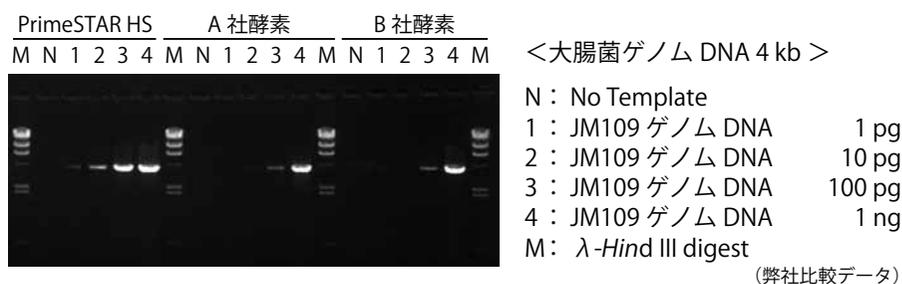
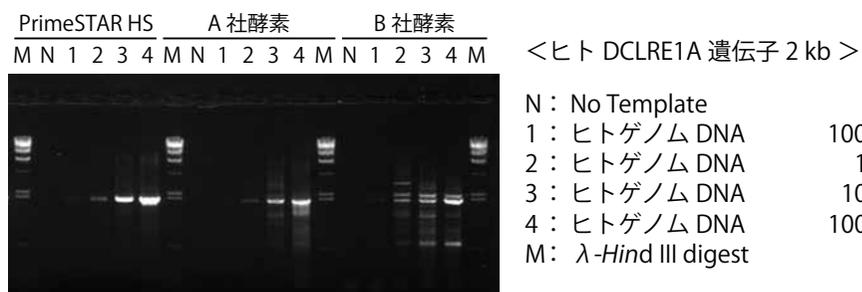
Template : ヒトゲノム DNA 100 ng  
反応系 : 50  $\mu$ l  
PCR 条件 : 3 step PCR、30 cycles

### C. 増幅効率

- (1) ヒト DCLRE1A 遺伝子 2 kb、大腸菌ゲノム DNA の 4 kb 領域をターゲットとして、A 社および B 社 High Fidelity PCR 酵素と反応性を比較しました。

反応液組成：それぞれの至適反応液組成（反応系 50  $\mu$ l）

PCR 条件：それぞれの推奨条件（3 step PCR、30 cycles）



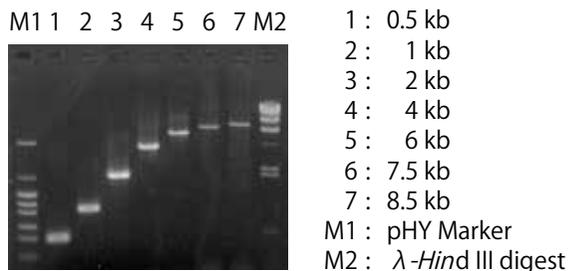
PrimeSTAR HS DNA Polymerase は良好な反応性を示し、他社 High Fidelity PCR 酵素よりも特異性が高く、1 オーダー高い検出感度が得られました。

- (2) ヒトゲノム DNA、大腸菌ゲノム DNA を鋳型として、PrimeSTAR HS DNA Polymerase で各サイズの増幅を行いました。

鋳型：ヒトゲノム DNA 50 ng/50  $\mu$ l 反応系

サーマルサイクラー：TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup>

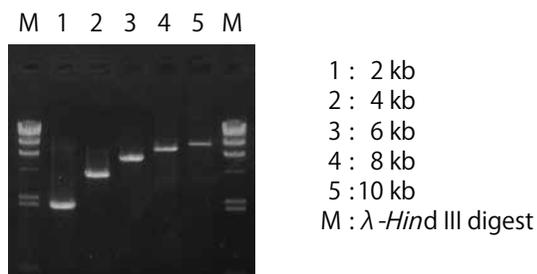
PCR 条件：0.5 ~ 6 kb ; 3 step PCR      7.5 ~ 8.5 kb ; 2 step PCR  
98 $^{\circ}$ C 10 sec.      98 $^{\circ}$ C 10 sec.      30 cycles  
60 $^{\circ}$ C 5 sec.      68 $^{\circ}$ C 8 min.      30 cycles  
72 $^{\circ}$ C 1 min./kb      ]



鋳型：大腸菌ゲノム DNA 100 pg/50  $\mu$ l 反応系

サーマルサイクラー：TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice

PCR 条件：3 step PCR  
98 $^{\circ}$ C 10 sec.      30 cycles  
60 $^{\circ}$ C 5 sec.      ]  
72 $^{\circ}$ C 1 min./kb      ]



#### D. 耐熱性

- (1) 3 step (98 $^{\circ}$ C 10 sec./55 $^{\circ}$ C 15 sec./72 $^{\circ}$ C 4 min.) で PCR を行った場合、30 サイクル後の残存活性は約 80%です。
- (2) 2 step (98 $^{\circ}$ C 10 sec./68 $^{\circ}$ C 4 min.) で PCR を行った場合、30 サイクル後の残存活性は約 85%です。

#### IV. 一般的な PCR 反応液組成 (Total 50 $\mu$ l)

試薬	使用量	最終濃度
5 $\times$ PrimeSTAR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	10 $\mu$ l	1 $\times$
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 $\mu$ l	200 $\mu$ M each
primer 1	10 ~ 15 pmol	0.2 ~ 0.3 $\mu$ M
primer 2	10 ~ 15 pmol	0.2 ~ 0.3 $\mu$ M
Template	< 200 ng	
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	1.25 U/50 $\mu$ l
滅菌精製水	up to 50 $\mu$ l	

※ 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。

#### V. PCR 条件

(A) 3 step PCR の場合

98°C 10 sec.  
55°C 5 sec. または 15 sec. } 30 cycles  
72°C 1 min./kb

(B) 2 step PCR の場合

98°C 10 sec. } 30 cycles  
68°C 1 min./kb

本酵素の場合、通常は 3 step PCR での反応をお勧めします。

- 変性条件 98°C 5 ~ 10 sec. を推奨します。94°C で行う場合は 10 ~ 15 sec. に設定してください。
- アニーリング温度 まず 55°C で試してください。
- アニーリング時間 T<sub>m</sub> 値 (下記の式で計算) が 55°C 以上の場合 → 5 sec. に設定  
T<sub>m</sub> 値 (下記の式で計算) が 55°C 未満の場合 → 15 sec. に設定

※ T<sub>m</sub> 値計算方法

$$T_m \text{ 値 (}^\circ\text{C)} = [(A, T \text{ の数}) \times 2] + [(G, C \text{ の数}) \times 4] - 5$$

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 sec. に設定してください。

<重要> 本酵素はプライミング効率が非常に高い酵素ですので、アニーリング時間は 5 sec. もしくは 15 sec. に設定して反応を行ってください。アニーリング時間が長くなると、スミアが生じる場合があります。

3 step でスミアになる場合、もしくは T<sub>m</sub> 値が 70°C 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。

VI. 至適パラメーターの設定、VIII. トラブルシューティングもご確認ください。

---

## VI. 至適パラメーターの設定

PrimeSTAR HS DNA Polymerase の性能を最大限に引き出し、よりよい PCR 増幅結果を得るために、至適パラメーターの設定が必要な場合があります。

### (1) 酵素量

通常 1.25 U/50  $\mu$ l 反応系をお勧めします。ただし、増幅サイズ、鋳型の純度および量により若干増減した方がよい場合があります。

### (2) 鋳型 DNA 量

鋳型 DNA の推奨使用量は次のとおりです。(50  $\mu$ l 反応系の場合)

ヒトゲノム DNA の場合	5 ~ 200 ng
大腸菌ゲノム DNA の場合	100 pg ~ 100 ng
cDNA ライブラリー	1 ~ 200 ng
$\lambda$ DNA の場合	10 pg ~ 10 ng
プラスミド DNA の場合	10 pg ~ 1 ng

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

バイサルファイト処理した DNA などのウラシルを含む鋳型は使用できません。

### (3) dNTP と Mg<sup>2+</sup>

dNTP にはキレート作用があり、dNTP 濃度を高くすると実効 Mg<sup>2+</sup>濃度が下がります。本酵素の場合、添付の 5 × PrimeSTAR Buffer には最終濃度 1 mM の Mg<sup>2+</sup>が含まれており、dNTP を最終濃度 200  $\mu$ M each で使用することで良好な結果が得られるように反応系が最適化されています。dNTP 濃度を変更することはできるだけ避けてください。

また、本酵素の場合、dTTP の代わりに dUTP を使用することはできません (著しく反応性が低下します)。

### (4) プライマーと PCR 条件

プライマーは、できるだけプライマー設計ソフト (OLIGO Primer Analysis Software : Molecular Biology Insights 社) などを利用して、最適な配列を選択するようにしてください。

基本的には 20 ~ 25 mer のプライマーで十分な結果が得られます。長鎖を増幅する場合には 25 ~ 30 mer に設定することで良い結果が得られる場合があります。

V. PCR 条件に基づいて、PCR 条件を選択してください。

本酵素の場合、イノシンを含むプライマーの使用は避けてください。degenerated primer は使用可能です。

### (5) アニーリング条件

V. PCR 条件に基づいて設定してください。良好な結果が得られない場合は、以下の方法で検討してください。

<スミア、エキストラバンドが生じる場合>

- (1) アニーリング時間を短くする。15 sec. で行っている場合は 5 sec. に設定する。
- (2) 既に 5 sec. に設定している場合は、アニーリング温度を 58 ~ 65°C に上げる。
- (3) 2 step PCR にする。

<目的産物が増幅しない (少ない) 場合>

- (1) アニーリング時間を長くする。5 sec. で行っている場合は 15 sec. に設定する。
- (2) アニーリング温度を 50 ~ 53°C に下げる。

## VII. 増幅産物の電気泳動、クローニング、シーケンスについて

### (1) 増幅産物の電気泳動

本製品を用いて増幅した PCR 産物を電気泳動する場合は TAE Buffer の使用を推奨します。TBE Buffer を使用すると、泳動パターンがやや裾広がりになり、きれいな泳動結果が得られない場合があります。

### (2) 増幅産物の末端形状

本製品を用いて増幅した PCR 産物のほとんどは平滑末端になっています。したがって、PCR 産物をそのまま (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可能です。平滑末端ベクターへのクローニングには Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027) をご利用ください。T-vector にクローニングする場合は、PCR 産物の 3' 末端に dA を付加する必要があります。T-vector へのクローニングには Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (製品コード 6019) をご利用ください。

### (3) 制限酵素処理を行う場合

増幅産物を制限酵素処理する場合は、フェノール/クロロホルム処理、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250) を用いる PCR クリーンアップなどのタンパク質除去操作を行ってください。特に 3'-突出型の制限酵素 (例えば *Pst*I など) の場合、本酵素の 3' → 5' exonuclease 活性が残存していると、制限酵素処理中に 3'-突出末端が削られてしまいます。

### (4) ダイレクトシーケンスを行う場合

本酵素は 3' → 5' exonuclease 活性を有するため、ダイレクトシーケンシングを行う前にフェノール/クロロホルム処理、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up を用いる PCR クリーンアップなどでタンパク質除去操作を行うことをお勧めします。

## VIII. トラブルシューティング

現象	問題点	対策
全く増幅しない 増幅効率が悪い	伸長時間	1 min./kb 以上に設定する。
	アニーリング時間	15 sec. に設定する。
	アニーリング温度	2°C ずつ下げしてみる。 3 step PCR で行う。
	鋳型 DNA の純度・量	適量の鋳型 DNA を使用する。 DNA の精製度を上げる。
	プライマー濃度	0.2 ~ 0.5 μM (final conc.) で検討する。
エキストラバンドがでる スメアする	アニーリング時間	5 sec. に設定する。
	アニーリング温度	2°C ずつ上げてみる。 2 step PCR を試す。
	伸長時間	1 min./kb に設定する。 必要以上に長くしない。
	鋳型 DNA 量	適量の鋳型 DNA を使用する。 必要以上に使用しない。
	サイクル数	25 ~ 30 cycles に設定する。
	酵素量	~ 0.625 U/50 μl 反応系程度まで下げしてみる。
	プライマー濃度	0.2 ~ 0.3 μM (final conc.) で検討する。

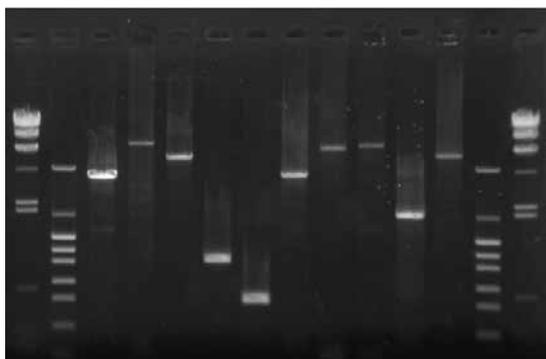
## IX. 実施例

ヒトゲノム DNA を鋳型として、様々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。

鋳型：ヒトゲノム DNA 100 ng/50  $\mu$ l 反応系

PCR 条件：  $98^{\circ}\text{C}$  10 sec.   
  $68^{\circ}\text{C}$  8 min. } 30 cycles

M2 M1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M1 M2



1:	DCLRE1A	4 kb
2:	$\beta$ -globin	8.5 kb
3:	$\beta$ -globin	6 kb
4:	DCLRE1A	1 kb
5:	p53	0.5 kb
6:	p53	4 kb
7:	$\beta$ -globin	7.5 kb
8:	DCLRE1A	8 kb
9:	DCLRE1A	2 kb
10:	p53	6 kb
M1:	pHY Marker	
M2:	$\lambda$ -Hind III digest	

このように同一 PCR 条件でも 0.5 kb から 8.5 kb 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。

## X. 関連製品

PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)  
PrimeSTAR<sup>®</sup> GXL DNA Polymerase (製品コード R050A/B)  
PrimeSTAR<sup>®</sup> HS (Premix) (製品コード R040A)  
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027)  
Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR<sup>®</sup> (製品コード 6019)  
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)

## XI. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・PrimeSTAR、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**テクニカルサポートライン**

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

---

**タカラバイオ株式会社**