

研究用

---

**TaKaRa**

**TaKaRa PCR Amplification Kit**

---

説明書

TaKaRa PCR Amplification Kit は、PCR を行うための高品質の試薬を使いやすい形でそろえた PCR 専用試薬キットです。

## I. 内容 (100 $\mu$ l PCR 反応系の場合 100 回分、50 $\mu$ l PCR 反応系の場合 200 回分)

1.	TaKaRa Taq™ *1	(5 U/ $\mu$ l)	50 $\mu$ l (250 U)
2.	dNTP Mixture*2	(各 2.5 mM)	1.28 ml
3.	10 $\times$ PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)		1 ml
	┌ 100 mM Tris-HCl (pH8.9) ├ 500 mM KCl └ 15 mM MgCl <sub>2</sub>		
4.	10 $\times$ PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> free)		1 ml
	┌ 100 mM Tris-HCl (pH8.9) └ 500 mM KCl		
5.	MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)	1 ml
6.	Control Template	(1 $\mu$ g/ml $\lambda$ DNA)	100 $\mu$ l
7.	Control Primer 1 *3	(20 pmol/ $\mu$ l)	50 $\mu$ l
8.	Control Primer 2 *3	(20 pmol/ $\mu$ l)	50 $\mu$ l
9.	Control Primer 3 *3	(20 pmol/ $\mu$ l)	50 $\mu$ l
10.	$\lambda$ -EcoT14 I Marker*4	(100 ng/ $\mu$ l)	40 $\mu$ l
11.	6 $\times$ Loading Buffer*5		1 ml

\* 1 : TaKaRa Taq について

- 濃度 5 U/ $\mu$ l
- 形状 20 mM Tris-HCl (pH8.0)  
100 mM KCl  
0.1 mM EDTA  
1 mM DTT  
0.5% Tween20  
0.5% NP-40  
50% グリセロール

### ● 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、pH9.3 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。

### ● 活性測定用反応液組成

- 25 mM TAPS 緩衝液 (pH9.3, 25°C)
- 50 mM KCl
- 2 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0.1 mM DTT
- 各 200  $\mu$ M dATP·dGTP·dCTP
- 100  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]-dTTP
- 0.25 mg/ml 活性化サケ精子 DNA

\* 2 : dNTP Mixture について

dATP、dCTP、dGTP、dTTP の等モル混合物で、希釈せずにそのまま PCR に用いることができます。

- 濃度 各 2.5 mM
- 形状 水溶液 (ナトリウム塩)、pH7 ~ 9
- 純度 各 98%以上

\* 3 : Control Primer について

Control Primer 1 : 5'-GATGAGTTCGTGTCGGTACAAC-3'

Control Primer 2 : 5'-CCACATCCATACCGGGTTTCAC-3'

Control Primer 3 : 5'-GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGCC-3'

Control Primer 1、2 を用いると、Control Template の 6,012 bp を増幅できます。  
Control Primer 1、3 を用いると、Control Template の 500 bp を増幅できます。

\* 4 :  $\lambda$ -EcoT14I Marker について

バクテリオファージ  $\lambda$  cl857 Sam 7 の DNA を制限酵素 EcoT14I で分解調製した電気泳動用分子量マーカーです。バンドのサイズは次の通りです。

19,329、7,743、6,223、4,254、3,472、2,690、1,882、1,489、925、421、74 bp

$\lambda$  DNA digest の末端フラグメントは、COS 末端で結合していますので、泳動前に 60°C、5 分間の熱処理を行ってください。

\* 5 : 6 × Loading Buffer について

[組成]      36%    グリセロール  
                 30 mM   EDTA  
                 0.05%   Bromophenol Blue  
                 0.035%   キシレンシアノール

キット以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

1. 遺伝子増幅システム (authorized instruments)  
  TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600)  
  TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice *Touch* (製品コード TP350)
2. 1.5 ml チューブまたは 0.2 ml PCR チューブ  
  0.2ml Single-Tube Dome Cap (製品コード NJ204)  
  0.2 ml 96 well-plate for Real Time(Frosted) (製品コード NJ401)  
  Flat cap for snap plate (製品コード NJ720) など
3. アガロース電気泳動装置  
  Mupid-2plus (製品コード M-2P)  
  Mupid-exU (製品コード EXU-1)  
  Mupid-One (製品コード O1-01)
4. アガロースゲル  
  Agarose L03「TAKARA」(製品コード 5003/5003B)  
  PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A) など
5. DNA 染色剤  
  SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (製品コード 5760A/5761A) または  
  エチジウムブロマイド  
  注) SYBR Green I を使用する場合は専用のフィルターが必要です。
6. マイクロ遠心機
7. マイクロピペットおよびチップ (オートクレーブ処理したもの)
8. 滅菌精製水

## II. 保存

− 20°C

### III. 原理

PCR (Polymerase Chain Reaction) 法とは、

DNA 鎖の熱変性 (denaturation step)  
プライマーのアニーリング (annealing step)  
ポリメラーゼによる伸長反応 (extension step)

を繰り返し行うことにより *in vitro* で DNA を増幅する方法です (図 1 参照)。この方法を用いると、DNA を数時間で少なくとも 100 万倍に増幅できます。本キットで用いている *TaKaRa Taq* (製品コード R001) は、*Thermus aquaticus* YT-1 株より DNA Polymerase 遺伝子をクローニングし、この遺伝子を導入した組換え体大腸菌を用いて大量発現し、高度に精製した 94 kDa の耐熱性 DNA ポリメラーゼで、天然の *Taq* DNA polymerase と同じ性能を持っています。

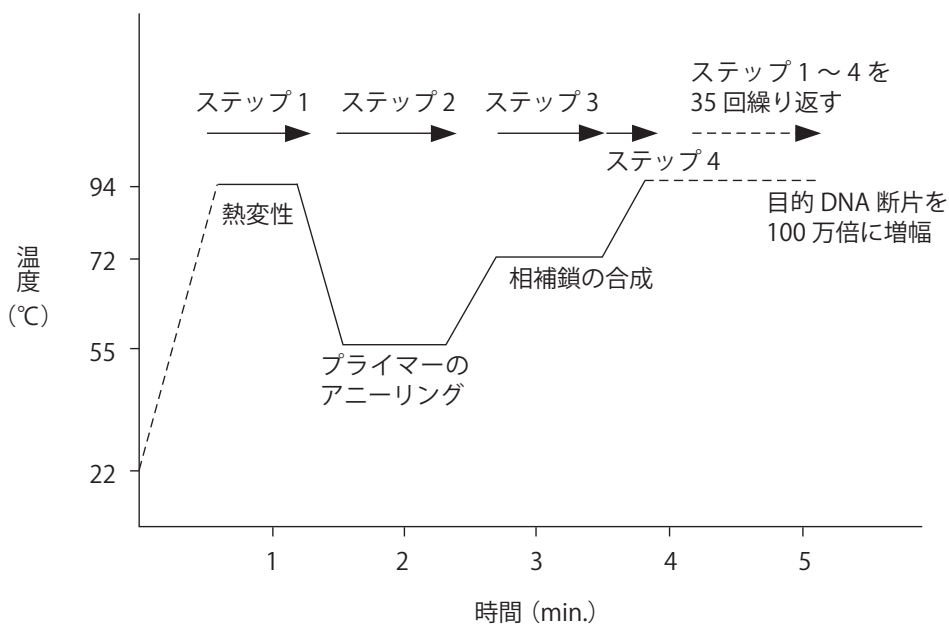


図 1. PCR による DNA 増幅の工程

ステップ 1: プライマー、dNTP、ポリメラーゼを含んだ反応液中で、目的とする 2 本鎖 DNA 断片を熱変性する (94°C、30 sec.)

ステップ 2: 熱変性により生じた 1 本鎖鋳型 DNA にプライマーをアニーリングする (55°C、30 sec.)

ステップ 3: DNA ポリメラーゼを用いて相補鎖 DNA を合成する (72°C、1 min.)

ステップ 4: 増幅産物としての 2 本鎖 DNA を再度熱変性して 1 本鎖にする (ステップ 1 に戻る)

ステップ 1~4 を 1 サイクルとして、25 サイクル繰り返す。ただし、目的 DNA 断片により、増幅の最大効率を得る条件が異なるので、目的 DNA 断片に応じて設定条件を変更する。

## IV. 操作

### 【 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice を使用した場合 】

#### A. コントロール反応

本キットには、コントロールとしてλDNA およびλDNA の 6,012 bp あるいは 500 bp のターゲットシーケンスを増幅するためのプライマーが含まれています。

##### 1. 下記に示す反応液を調製する。

試薬	使用量	終濃度
10× PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)*	5 μl	[1×]
dNTP Mixture	4 μl	各 200 μM
Control Primer 1	0.5 μl	0.2 μM
Control Primer 2 or 3	0.5 μl	0.2 μM
TaKaRa Taq	0.25 μl	1.25 U/50 μl
Control Template	0.5 μl	0.5 ng/50 μl
滅菌精製水	39.25 μl	
Total	50 μl	

\*：必要に応じて、10× PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> free) および MgCl<sub>2</sub> 溶液をご使用ください。

##### 2. TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice の本体にセットする。

##### 3. 以下の条件を設定する。

Control Primer 1、2 を用いた場合 (6,012 bp の増幅)

94°C	1 min.	(denaturation)	} 30 cycles
68°C	4 min.	(annealing and extension)	
↓			
72°C	5 min.		1 cycle

Control Primer 1、3 を用いた場合 (500 bp の増幅)

94°C	30 sec.	(denaturation)	} 25 cycles
55°C	30 sec.	(annealing)	
72°C	30 sec.	(extension)	
↓			
72°C	2 min.		1 cycle

以上の条件で Control Template のターゲットシーケンスが増幅されます。

#### B. 一般の反応

基本的にはコントロール反応と同じです。

PCR 反応は denature、annealing、extension の 3 段階の温度変化を基本としていますが、増幅鎖長が長い場合 (≥ 6 kb) には、annealing と extension を兼ねた 2 段階の温度変化条件 (シャトル PCR) の方が適している場合があります。

ターゲットシーケンスのサイズ、プライマーのサイズや塩基配列に応じた denaturation、annealing、extension の各ステップの最適条件 (温度、時間) をプログラムして PCR を行ってください。

---

## C. 電気泳動

反応終了後の溶液 5 ~ 10  $\mu$ l に 6  $\times$  Loading Buffer を 1/6 量加え、アガロースのスロットに注入し、電気泳動を行います。アガロースゲルの種類、濃度は DNA のサイズによって使い分けてください。電気泳動終了後のゲルを 1  $\mu$ g/ml のエチジウムブロマイド水溶液もしくは SYBR Green I 溶液 (TBE buffer または TAE buffer で 10,000 倍希釈したもの) 中に 20 ~ 30 分間放置、染色後紫外線照射によって DNA のバンドを確認します。

### ● 操作上の注意

1. キットの内容物はボルテックスにて約 2 秒よく攪拌し、遠心してください。ただし、*TaKaRa Taq* は注意深くゆっくりとピペティングしてください。また各内容物は使用前まで氷上で保存してください。
2. サンプル DNA の調製方法によっては、10  $\times$  PCR Buffer ( $Mg^{2+}$  plus) の  $Mg^{2+}$  濃度が至適でない場合があります。この場合は 10  $\times$  PCR Buffer ( $Mg^{2+}$  free) を用いて  $Mg^{2+}$  濃度を変えて予備実験し、至適  $Mg^{2+}$  濃度を決めてください。

## V. Q & A

Q1：増幅産物の末端の形状は？

A1：大部分に A の overhang があります。

Q2：PCR 反応を行う際の反応条件は？

A2：増幅サイズ、反応 volume、使用機器等により至適条件が異なります。

### <サイクル数>

鋳型 DNA 量および増幅サイズを考慮し、25 ~ 30 サイクルの範囲で至適サイクル数を設定してください。

サイクル数が少なすぎると十分な増幅量が得られない場合があります。

また、サイクル数が多すぎると、全体にスミアする場合があります。

### <変性温度と時間>

*TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice* を使用する場合

98 $^{\circ}$ C、10 sec. あるいは 94 $^{\circ}$ C、20 ~ 30 sec.

変性時間が短すぎたり、変性温度が低すぎると全体的にスミアしたり、増幅効率が悪くなる場合があります。また、変性時間が長すぎたり、変性温度が高すぎると増幅産物が全く確認できない場合があります。

### <アニーリングおよび伸長>

至適アニーリング温度 (通常 37 ~ 65 $^{\circ}$ C) は 2 $^{\circ}$ C 間隔で検討してください。また、60 ~ 68 $^{\circ}$ C の間でも *TaKaRa Taq* は十分な活性を示しますので、アニーリング - 伸長温度をこの範囲に設定することにより 2 段階温度 PCR (シャトル PCR) が可能です。

伸長時間はターゲットの鎖長に応じて設定します。通常 *TaKaRa Taq* は 68 ~ 72 $^{\circ}$ C で 1 分間に 1,000 base の割合で伸長を行います。設定温度が 68 $^{\circ}$ C より低い場合、長めの時間設定が必要となりますのでご注意ください。

通常、アニーリング温度が高すぎると全く増幅産物は認められず、低すぎると非特異的な反応が起こりやすくなります。また、伸長時間が短すぎると全く増幅産物が認められないか、あるいは短い非特異的産物が優先的に増幅する場合があります。逆に長すぎるとスミアするようになります。

Q3：プライマーの使用量は？

A3：最終濃度 0.1 ~ 1.0  $\mu\text{M}$  の範囲で至適濃度を検討してください。プライマー濃度が低すぎると、増幅量が少なくなる場合があります。プライマー濃度が高すぎると、非特異的な反応が助長、結果的に特異的な増幅反応が起こりにくくなる場合があります。通常、鋳型 DNA 量が多い場合、あるいは High Complexity DNA (例：ヒトゲノム DNA) を鋳型にする場合、プライマー濃度は低めに設定します。また鋳型 DNA 量が少ない場合、あるいは Low Complexity DNA (例：プラスミド等) を鋳型にする場合、プライマー濃度は高めに設定します。

Q4：至適酵素量は？

A4：通常 1.25 U/50  $\mu\text{l}$  PCR をお勧めします。しかし、至適酵素量は鋳型 DNA 量あるいは complexity、そして増幅サイズ等により影響される場合があります。酵素量が多すぎると非特異的な反応が起りやすくなったり、全体的にスミアすることがあります。また、酵素量が少なすぎると増幅効率が悪くなる場合があります。

Q5：泳動した際に全体的にスミアする、なぜか？

A5：スミアの原因としては次のことが考えられます。

原因	対策
使用酵素量が多すぎる	0.5 U 間隔で酵素量を減らしていく
変性時間が短すぎる	変性時間を 5 秒間隔で長くする
変性温度が低すぎる	変性温度を 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 間隔で上げていく
dNTP 量が少なすぎる	50 $\mu\text{M}$ 間隔で上げていく
伸長時間が長すぎる	1 分間隔で短くしていく
サイクル数が多すぎる	2 サイクル間隔で減らしていく
鋳型量が多すぎる	鋳型量を 20% ずつ減らしていく

Q6：非特異的に反応したバンドが多く見られる、なぜか？

A6：原因として次のことが考えられます。

原因	対策
プライマー濃度が高すぎる	0.1 $\mu\text{M}$ 間隔で濃度を变化させる
プライマーのデザインが悪い	プライマーの場所を変更し、特異性を高める プライマーの長さを 25 ~ 30 mer にし、特異性を高める
酵素量が多すぎる	0.5 U 間隔で酵素量を減らしていく
サイクル数が多すぎる	2 サイクル間隔で減らしていく
アニーリング温度が低すぎる	2 $^{\circ}\text{C}$ 間隔で上げていく
室温から変性温度 (94 ~ 98 $^{\circ}\text{C}$ ) に達する間に起こる、プライマーの非特異的なアニーリング	Taq Antibody (製品コード 9002A/B) 等を利用した Hot Start 法を行う
伸長時間が短すぎる	1 分間隔で上げていく
変性が不十分である	温度を 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 間隔で、時間を 5 秒間隔で増やしていく
鋳型量が多すぎる	鋳型量を 20% ずつ減らしていく

## VI. 参考文献

- 1) Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, Scharf S J, Higuchi R, Horn G T, Mullis K B, and Erlich H A. *Science*. (1988) **239**: 487-491.
- 2) Scharf S J, Horn G T, and Erlich H A. *Science*. (1986) **233**: 1076-1078.
- 3) Gyllensten U B and Erlich H A. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1988) **85**: 7652-7656.
- 4) Kawasaki E S, Clark S C, Coyne M Y, Smith S D, Champlin R, Whitte O N, and Mc Cormick F P. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1988) **85**: 5698-5702.
- 5) Lawyer F C, Stoffel S, Saiki R K, Myambo K B, Drummomd R, and Gelfand D H. *J Biol Chem*. (1989) **264**: 6427-6437.

## VII. 関連製品

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600)  
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Touch (製品コード TP350)  
0.2ml Single-Tube Dome Cap (製品コード NJ204)  
0.2 ml Hi-8-Tube (製品コード NJ300)  
0.2 ml Hi-8-Tube Dome Cap (製品コード NJ301)  
0.2 ml 96 well-plate for Real Time(Frosted) (製品コード NJ401)  
Flat cap for snap plate (製品コード NJ720)  
Taq Antibody (製品コード 9002A/B)  
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (製品コード 5760A/5761A)  
Agarose L03「TAKARA」(製品コード 5003/5003B)  
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)

プライマーの合成はタカラバイオ (株) 受託窓口までお問い合わせください。  
TEL : 077-565-6999

## VIII. 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。
- ・ Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の、SYBR は Life Technologies Corporation の登録商標です。TaKaRa Taq、PrimeGel はタカラバイオ株式会社の商標です。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**