

製品コード R040A

研究用

Takara

PrimeSTAR[®] HS (Premix)

説明書

v201803Da

PrimeSTAR HS (Premix) は、タカラバイオが独自に開発した High Fidelity PCR 酵素である PrimeSTAR HS DNA Polymerase と反応液バッファー、dNTP Mixture をあらかじめ 2 倍濃度で混合したプレミックス PCR 酵素です。反応液調製の手間が大幅に減少し、また、コンタミネーションの危険性も軽減しますので、ハイスループットな実験系にも有用です。

本製品に使用している PrimeSTAR HS DNA Polymerase 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。また本酵素は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、従来の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 High Fidelity、高感度、高特異性、高い成功率が実現しました。

I. 内容 (100 回分、50 μ l 反応系)

PrimeSTAR HS (Premix)	500 μ l \times 5
組成： PrimeSTAR HS DNA Polymerase	1.25 U/25 μ l
dNTP Mixture	2 \times conc. ; 各 0.4 mM
PrimeSTAR Buffer	2 \times conc. ; Mg ²⁺ = 2 mM

II. 保存

— 20°C 保存 (4°C で 3 ヶ月保存可能)

※ 過度な凍結融解の繰り返しは活性が低下する場合があります。使用頻度が高い場合、いったん融解したものは 4°C 保存をお勧めします。
使用前には、転倒混和後スピンドアウンしてください。

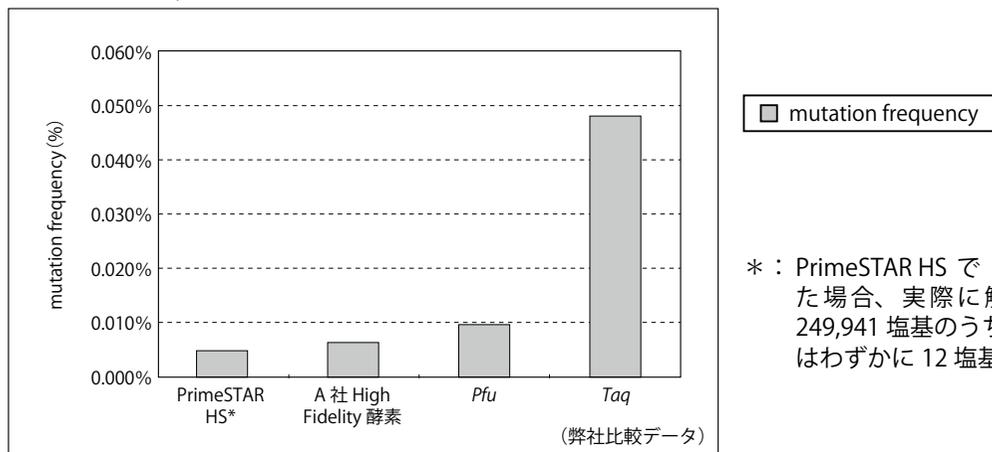
III. 特長

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 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。

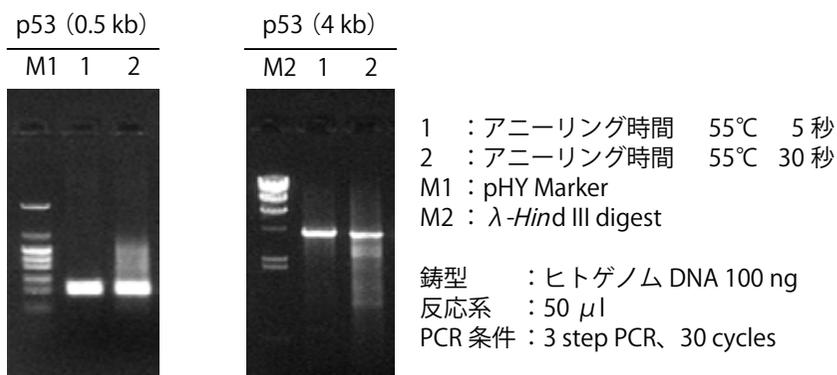
各酵素の Fidelity 比較



B. アニーリング時間

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します。

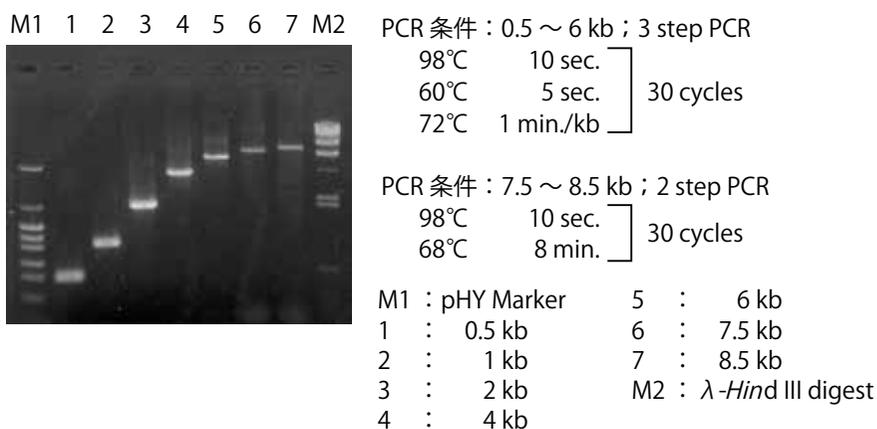
条件設定の詳細に関しては、V. PCR 条件（4 ページ）でご確認ください。



C. ヒトゲノム、大腸菌ゲノムを鋳型とした増幅

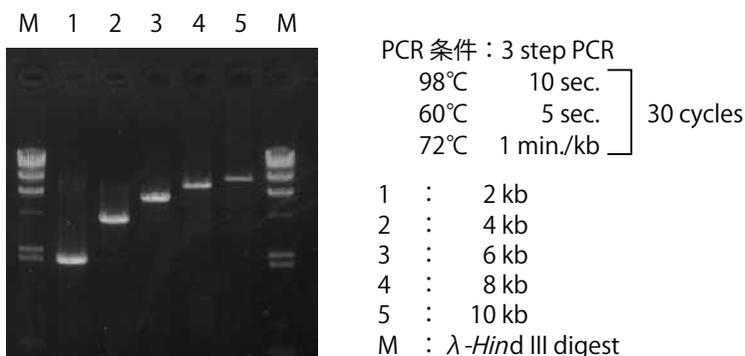
鋳型 : ヒトゲノム DNA 50 ng/50 μ l 反応系

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



鋳型 : 大腸菌ゲノム DNA 100 pg/50 μ l 反応系

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



IV. 一般的な PCR 反応液組成

試薬	使用量	最終濃度
PrimeSTAR HS (Premix)	25 μ l	1 \times
Primer 1	10 ~ 15 pmol	0.2 ~ 0.3 μ M
Primer 2	10 ~ 15 pmol	0.2 ~ 0.3 μ M
Template	< 200 ng	
滅菌精製水	up to 50 μ l	
Total	50 μ l	

V. PCR 条件

(A) 3 step PCR の場合

98°C	10 sec.	} 30 cycles
55°C	5 sec. または 15 sec.	
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 Tm 値 (下記の式で計算) が 55°C以上の場合 → 5 sec. に設定
Tm 値 (下記の式で計算) が 55°C未満の場合 → 15 sec. に設定

※ Tm 値計算方法

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

その他、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 (Premix) でよりよい 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) 鋳型 DNA 量

至適鋳型 DNA 量は次のとおりです。(50 μ l 反応系の場合)

ヒトゲノム DNA	5 ~ 200 ng
大腸菌ゲノム DNA	100 pg ~ 100 ng
cDNA ライブラリー	1 ~ 200 ng
λ DNA	10 pg ~ 10 ng
プラスミド DNA	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。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。

(2) 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) を利用するなどして、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。

PrimeSTAR HS DNA Polymerase 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。

(3) アニール条件

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。

<スメア、エキストラバンドが生じる場合>

- (1) アニール時間を短くする。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、アニール温度を 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) アニール時間を長くする。5 sec. で行っている場合は 15 sec. に設定する。
- (2) アニール温度を 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

PrimeSTAR HS (Premix) 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) 増幅産物のクローニング

PrimeSTAR HS (Premix) 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 にクローニングしたい場合には 3' 末端への dA 付加反応が必要です。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/クロロホルム処理や 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で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、PrimeSTAR HS DNA Polymerase 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

本酵素は強力な 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/クロロホルム処理や 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 スミアする	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。
	プライマー濃度	0.2 ~ 0.3 μM (final conc.) で 検討する。

IX. 関連製品

PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (製品コード R010A/B)
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (製品コード R050A/B)
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)
PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR Kit (製品コード R022A/B)
PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit (製品コード R023A/B)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027)
Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR® (製品コード 6019)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)

X. 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 はタカラバイオの登録商標です。PrimeScript 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