

製品コード R050A

研究用

Takara

**PrimeSTAR[®] GXL
DNA Polymerase**

説明書

v201906Da

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 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により 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。

非常に高い正確性を維持しながら、これまでの High Fidelity PCR 酵素では見られない優れた伸長性を有し、30 kb 以上の長鎖の増幅が可能です。増幅が困難であった GC リッチな鋳型においても、バッファの変更や特別な反応条件の設定を行う必要はなく、簡単に高い成功率で増幅産物を得ることができます。また、従来の High Fidelity PCR 酵素では反応が阻害されやすかった多量の核酸を含む反応系でも、鋳型量の許容範囲が格段に広くなり、例えば高濃度の cDNA からの低発現量の遺伝子検出などが容易に行えるようになりました。

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用いたホットスタート PCR にも対応しています。

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

I. 内容 (200 回) *1

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (1.25 U/ μ l) *2	200 μ l
5 \times PrimeSTAR GXL Buffer (Mg ²⁺ plus) *3	1 ml \times 2
dNTP Mixture (2.5 mM each)	800 μ l

* 1 : 標準プロトコール、反応容量 50 μ l での回数です。

* 2 : 【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%	Tween20
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。

* 3 : Mg²⁺濃度は 5 mM (5 \times) です。

II. 保存 - 20°C

III. プロトコール

1 min./kb の条件で伸長を行う標準プロトコールに加え、2 倍量の酵素を用いて 10 sec./kb で伸長を行う高速プロトコールも用意しています。
PCR 反応液の調製は室温でも可能ですが、酵素などの各試薬は氷上に置いて使用してください。

A. 標準プロトコール

● 反応液組成

試薬	使用量	最終濃度
5 × PrimeSTAR GXL Buffer	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	5 ページ IV-(3) 参照	
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	1 μl	1.25 U/50 μl
滅菌精製水	up to 50 μl	

* : 10 kb 以上の長鎖を増幅する場合、final conc. 0.2 μM で反応してください。

● PCR 条件

【増幅鎖長が ≤ 10 kb の場合】

98°C	10 sec.	} 30 cycles
55 or 60°C *1	15 sec.	
68°C *2	1 min./kb	
または		
98°C	10 sec.	} 30 cycles
68°C	1 min./kb	

* 1 : Tm 値 (下記の式※で計算) が 55°C を超える場合はアニーリング温度を 60°C に、Tm 値が 55°C 以下の場合はアニーリング温度を 55°C に設定してください。

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

* 2 : 3 step PCR の場合も、伸長温度は 68°C に設定してください。

【増幅鎖長が 10 kb ~ 30 kb の場合】

98°C	10 sec.	} 30 cycles
68°C	10 min.	

【増幅鎖長が ≥ 30 kb の場合】

98°C	10 sec.	} 30 cycles
68°C	15 min.	

◆ PCR 条件の選択

- 増幅鎖長が 10 kb 以下の場合、まず 3 step PCR をお試しください。
- GC リッチな鋳型や 10 kb 以上の長鎖の増幅には、2 step PCR を推奨します。
- 増幅産物が得られない場合や、スミアや非特異的増幅が見られる場合は、6 ページの VI. トラブルシューティングをご確認ください。

B. 高速 PCR プロトコール

● 反応液組成

試薬	使用量	最終濃度
5 × PrimeSTAR GXL Buffer	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	5 ページ IV-(3) 参照	
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	2 μl	2.5 U/50 μl
滅菌精製水	up to 50 μl	

* : 10 kb 以上の長鎖を増幅する場合、final conc. 0.2 μM で反応してください。

● PCR 条件

【増幅鎖長が ≤ 10 kb の場合】

98°C	10 sec.	} 30 cycles
55 or 60°C *1	15 sec.	
68°C *2	10 sec./kb	

* 1 : Tm 値 (下記の式※で計算) が 55°C を超える場合はアニーリング温度を 60°C に、Tm 値が 55°C 以下の場合はアニーリング温度を 55°C に設定してください。

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

* 2 : 3 step PCR の場合も、伸長温度は 68°C に設定してください。

【増幅鎖長が 10 kb ~ 20 kb の場合】

98°C	10 sec.	} 30 cycles
68°C	20 sec./kb	
または		
98°C	10 sec.	} 30 cycles
60°C	15 sec.	
68°C	10 sec./kb	

◆ PCR 条件の選択

- 10 kb 以下の増幅は、3 step PCR で行ってください。2 step PCR での反応はお勧めしません。
- 10 kb 以上の増幅においては、より短時間で反応を求める場合は 3 step PCR、より特異性の高い反応を求める場合には 2 step PCR をお勧めします。
- GC リッチな鋳型については、標準プロトコールをお勧めします。
- 増幅産物が得られない場合や、スミアや非特異的増幅がみられる場合は、6 ページの VI. トラブルシューティングをご確認ください。

IV. 至適パラメーターの設定

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase の性能を最大限に引き出し、より良い 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) プライマー設計

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 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。

【増幅鎖長が ≤ 10 kb の場合】

基本的には 20 ~ 25 mer のプライマーでも良い結果が得られますが、 T_m 値 (III. プロトコール中の式で計算) が 55°C を超えるように、もしくはプライマー長が 25 mer 以上となるよう設計することで PCR の成功率がさらに向上します。

【増幅鎖長が > 10 kb の場合】

T_m 値が 65°C 以上で 25 ~ 35 mer のプライマーを設計することを推奨します。また、プライマーの 3' 端側の GC 含量が高くないように設計してください。

【GC リッチなターゲットの場合】

T_m 値が 60°C を超えるプライマーを推奨します。

なお、PrimeSTAR GXL 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。

(2) dNTP と Mg^{2+}

dNTP にはキレート作用があり、dNTP 濃度を高くすると実効 Mg^{2+} 濃度が下がります。PrimeSTAR GXL DNA Polymerase の場合、添付の 5 × PrimeSTAR GXL Buffer には最終濃度 1 mM の Mg^{2+} が含まれており、dNTP を最終濃度 200 μ 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至適化されています。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、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 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)。

(3) 鋳型

推奨鋳型量は次のとおりです。

		(長鎖増幅の場合)
ヒトゲノム DNA	5 ~ 500 ng	(100 ~ 500 ng)
大腸菌ゲノム DNA	100 pg ~ 200 ng	(10 ~ 200 ng)
プラスミド DNA	10 pg ~ 10 ng	(1 ~ 10 ng)
cDNA	25 ~ 750 ng	(250 ~ 750 ng)

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。

V. 増幅産物の電気泳動、クローニングについて

(1) 増幅産物の電気泳動

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 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

PrimeSTAR GXL 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は、3' 末端への dA 付加反応を行う必要があります。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、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/50/250) を用いる PCR clean-up など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 GXL 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。

VI. トラブルシューティング

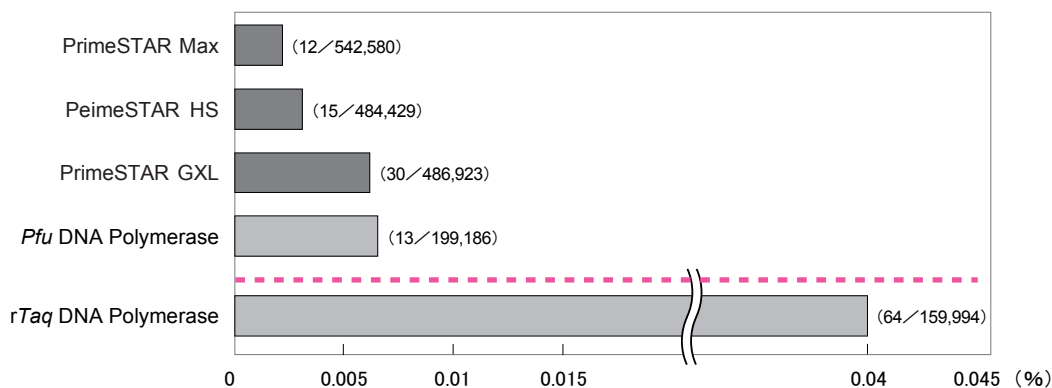
現象	問題点	対策
増幅しない 増幅効率が悪い	プライマーの Tm 値	IV-(1) を参考にプライマー設計する
	アニーリングの温度	2°C ずつ下げしてみる
	プライマーの濃度	0.3 ~ 0.5 μM (final conc.) で検討する
	プロトコール	高速 PCR プロトコールを試す
	サイクル数	35 ~ 40 サイクルに設定する
	鋳型の純度・量	適量の鋳型 DNA を使用する DNA の精製度を上げる
エキストラバンドがでる スメアする	プライマーの Tm 値	IV-(1) を参考にプライマー設計する
	アニーリングの温度	63°C まで 2°C ずつ上げてみる 2 step PCR を試す プライマーの Tm 値が 50°C 以下の場合、50°C ~ 55°C で試す
	伸長時間	増幅サイズが 1 kb 以下の場合、伸長時間を 10 sec./kb まで短くして試す
	プライマー濃度	0.2 μM (final conc.) で行う
	サイクル数	25 ~ 30 サイクルに設定する
	鋳型の純度	DNA の精製度を上げる

VII. PrimeSTAR GXL の特長と実施例

A. 正確性

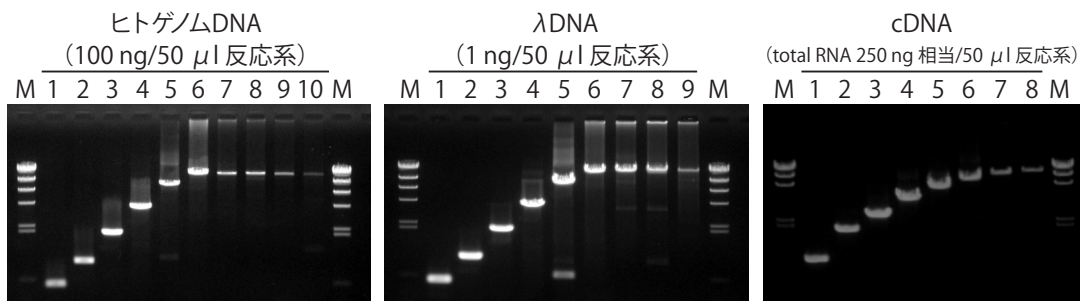
GC リッチで変異が入りやすい *Thermus thermophilus* HB8 ゲノム DNA を鋳型として、任意に選択した 10 領域 (増幅サイズはそれぞれ約 500 bp) を PCR 増幅後、ベクターにクローニングし、各配列について複数クローンをピックアップしてシーケンシングにより塩基配列を確認しました。解析した総塩基数に対するエラー塩基数から、mutant frequency を求めました。

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。この結果は *Pfu* DNA Polymerase の正確性を上回っています。



B. 伸長性

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase は優れた伸長性を有し、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となりました。ヒトゲノム DNA を鋳型にした場合は 30 kb、 λ DNA を鋳型にした場合は 40 kb、cDNA では 13.5 kb までの増幅を確認しています。



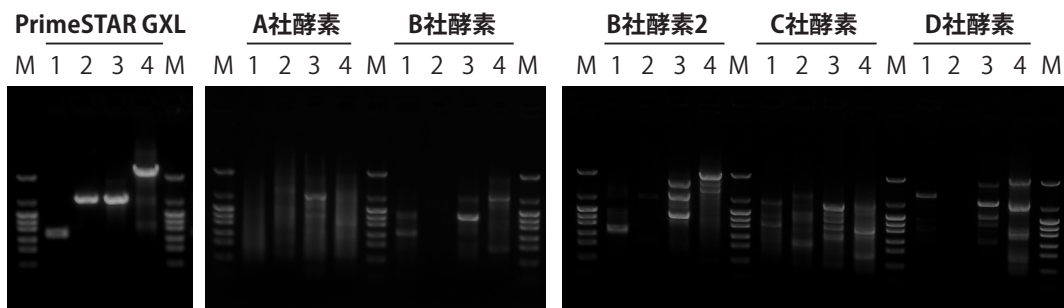
- | | | |
|-----|----------------------------|--------|
| 1. | p53 | 0.5 kb |
| 2. | DCLRE 1A | 1 kb |
| 3. | DCLRE 1A | 2 kb |
| 4. | DCLRE 1A | 4 kb |
| 5. | β -globin | 8.5 kb |
| 6. | β -globin | 15 kb |
| 7. | β -globin | 20 kb |
| 8. | β -globin | 24 kb |
| 9. | β -globin | 27 kb |
| 10. | β -globin | 30 kb |
| M. | λ -Hind III digest | |

- | | |
|----|----------------------------|
| 1. | 0.5 kb |
| 2. | 1 kb |
| 3. | 2 kb |
| 4. | 4 kb |
| 5. | 8 kb |
| 6. | 15 kb |
| 7. | 20 kb |
| 8. | 30 kb |
| 9. | 40 kb |
| M. | λ -Hind III digest |

- | | | |
|----|----------------------------|---------|
| 1. | Dystrophin | 1 kb |
| 2. | Dystrophin | 2 kb |
| 3. | CCND2 | 2.8 kb |
| 4. | TFR | 4 kb |
| 5. | Dystrophin | 6 kb |
| 6. | Dystrophin | 8 kb |
| 7. | Dystrophin | 12 kb |
| 8. | Dystrophin | 13.5 kb |
| M. | λ -Hind III digest | |

C. GC リッチターゲットの増幅

非特異的な増幅がocこりやすいGC リッチな鋳型でも、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実現します。



(弊社比較データ)

鋳型：ヒトゲノム DNA (100 ng/50 μ l 反応系)

1. APOE gene 746 bp (GC 含量 74%)
2. TGF β 1 gene 2,005 bp (GC 含量 69%)

反応は各社推奨条件で実践

- B社酵素 2: GC リッチ対応酵素
D社酵素 : GC バッファー使用

鋳型：*T. thermophilus* HB8 ゲノム DNA (10 ng/50 μ l 反応系)

3. 2,029 bp (GC 含量 74%)
4. 4,988 bp (GC 含量 74%)

M : pHY Marker

D. 感度と鋳型許容量

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 を鋳型とする増幅などが比較的苦手です。しかし、PrimeSTAR GXL は鋳型量に対する許容範囲が広く、cDNA を鋳型とする反応も効率よく行うことができます。

- (1) さまざまな量の 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) 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。

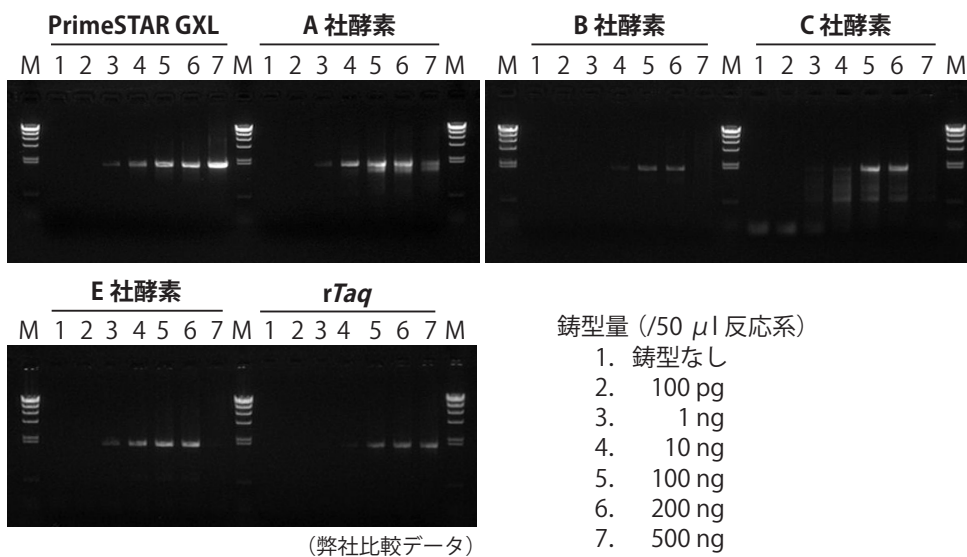


鋳型 cDNA 量 (total RNA 相当量) / 50 μ l 反応系

- | | |
|-----------|-------------------------------|
| 1. 25 pg | 7. 750 ng |
| 2. 250 pg | 8. 1 μ g |
| 3. 2.5 ng | 9. 1.5 μ g |
| 4. 25 ng | 10. 2 μ g |
| 5. 250 ng | M. λ -Hind III digest |
| 6. 500 ng | |

PrimeSTAR GXL では、鋳型 cDNA の非常に広い濃度範囲で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。

(2) さまざまな量のヒトゲノム DNA を鋳型として、PrimeSTAR GXL と各社 High Fidelity PCR 酵素および *rTaq* の増幅効率を比較しました。



(弊社比較データ)

鋳型：ヒトゲノム DNA
 ターゲット：DCLRE 1A 遺伝子 (2 kb)
 反応は各社推薦条件で実施

鋳型量 (/50 μ l 反応系)

1. 鋳型なし
2. 100 pg
3. 1 ng
4. 10 ng
5. 100 ng
6. 200 ng
7. 500 ng
- M. λ -Hind III digest

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た鋳型量が多い条件下でも PrimeSTAR GXL では高い反応性が見られました。

VIII. 関連製品

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (製品コード R010A/B)
PrimeSTAR® HS (Premix) (製品コード R040A)
Tks Gflex™ DNA Polymerase (製品コード R060A/B)
PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit (製品コード R023A/B)
PrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (製品コード R026A/B)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600)
Agarose L03「TAKARA」(製品コード 5003/5003B)
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
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)

IX. 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。Tks Gflex、PrimeScript、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