

製品コード R071A

研究用

Takara

**MightyAmp™
DNA Polymerase Ver.2**

説明書

v201906Da

MightyAmp DNA Polymerase は、特に 2 kb 程度までの短鎖の増幅において究極の反応性を追求して開発された PCR 酵素であり、通常の PCR 酵素では増幅が困難な PCR 阻害物質を多く含むクルードな生体粗抽出液を用いる場合にも、その強力な増幅能により良好な反応性を示します。

MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 では、MightyAmp DNA Polymerase に改良したバッファーを組み合わせることにより、血液、動植物組織などの生体試料を直接反応液に加える「ダイレクト PCR」が可能になりました。従来の MightyAmp DNA Polymerase と同様、PCR 阻害物質を多く含むクルードな生体粗抽出液から GC リッチ、AT リッチを問わず、広範囲なターゲットの増幅が可能であり、少量の鋳型からの増幅でも良好な反応性を示します。

なお、本酵素は 98℃までポリメラーゼ活性を抑制する強力なモノクローナル抗体を用いたホットスタート PCR に対応しています。

I. 内容 (200 回用) *1

MightyAmp DNA Polymerase (1.25 U/ μ l) *2	200 μ l
2 \times MightyAmp Buffer Ver.2 (Mg ²⁺ , dNTP plus) *3	1 ml \times 5

* 1 : 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%	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。

* 3 : Mg²⁺濃度は 4 mM (2 \times)、dNTP 濃度は 800 μ M each (2 \times) です。

II. 保存 -20°C

III. 一般的な PCR 反応液組成

試薬	使用量	最終濃度
2 × MightyAmp Buffer Ver.2	25 μl	1 ×
Primer 1	15 pmol	0.3 μM
Primer 2	15 pmol	0.3 μM
生体試料／粗抽出液*1	≤ 5 μl*1	
MightyAmp DNA Polymerase	1 μl	1.25 U/50 μl
滅菌精製水	up to 50 μl	
Total	50 μl	

* 1 : 組織サンプルおよび抽出液の持ち込み量の目安

- EDTA 血、ヘパリン血*2 ≤ 5 μl
- マウス尾 ≤ 1 mm
- マウス耳 ≤ 1.5 mm²
- マウス臓器・脳 ≤ 1.5 mm³
- 植物の葉 (トマト、ナスナ、ホウレンソウ) ≤ 直径 2 mm
- 生体試料粗抽出液 ≤ 5 μl

* 2 : クエン酸血を用いると反応性が著しく低下します。ダイレクト PCR へのクエン酸血の使用はお勧めしません。

IV. プライマー設計について

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。

Tm 値 (下記の式で計算) が 60°C 以上になるように設計することをお勧めします。

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

V. PCR 条件

伸長温度を 68°C に設定した 3 step PCR が標準条件です。GC リッチターゲットを増幅する場合は、2 step PCR をお試しください。

[3 step PCR]

98°C	2 min. *1	
↓		
98°C	10 sec.	} 30 ~ 40 cycles
60°C	15 sec.	
68°C *2	1 min./kb	

[2 step PCR]

98°C	2 min. *1	
↓		
98°C	10 sec.	} 30 ~ 40 cycles
68°C	1 min./kb	

* 1 : 強力なホットスタート抗体を使用しているため、必ず 98°C、2 min. の初期変性を行い、抗体を熱変性させてください。

* 2 : 3 step PCR の場合も、伸長時間は 68°C に設定してください。

VI. 増幅産物の電気泳動

- MightyAmp 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。
- 動物組織 (例: マウス尾) を用いて、ダイレクト PCR で増幅した産物を電気泳動する場合、サンプル溶液中に不溶物 (組織) が存在すると DNA 断片がアガロースゲルのウェルに捕捉され、目的の位置に泳動されないことがあります。以下のように、Loading Buffer に Proteinase K を添加することをお勧めします。
 1. 6 × Loading Buffer (製品コード 9156) と Proteinase K (製品コード 9034) を 10 : 1 (v/v) の割合で混合する。
 2. 電気泳動を行う前に、1. で調製した混合液と PCR 反応液を 1 : 5 (v/v) の割合で混合する。

VII. 増幅産物の末端形状

MightyAmp DNA Polymerase を用いて増幅した PCR 産物のほとんどは 3' 末端に A が 1 塩基付加されています。したがって、PCR 産物をそのまま T-Vector (pMD20 : 製品コード 3270、pMD19 (Simple) : 製品コード 3271 など) にクローニングすることができます。また、Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027) で平滑末端化およびリン酸化を行って、平滑末端のベクターにクローニングすることも可能です。

VIII. 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. を参考にプライマー設計する
	2 step PCR	3 step PCR を試す
	3 step PCR	2 step PCR を試す (3 step PCR で増幅しないものが 2 step で増幅する場合があります)
	アニーリング温度	2°C ずつ下げしてみる
	サイクル数	サイクル数を最大 40 cycles まで増やす
	Sample の量・調製法	Sample の使用量を減らす、または増やす Sample の調製方法を検討
非特異的増幅が著しい	プライマーの Tm 値	IV. を参考にプライマー設計する
	3 step PCR	2 step PCR を試す
	サイクル数	サイクル数を 25 ~ 30 cycles に設定
	Sample の調製法	Sample の調製方法を検討

IX. 実施例

以下に、様々な生体試料からのダイレクト PCR の例を示します。

IX-1. マウス EDTA 血およびヘパリン血からのダイレクト PCR

【方法】マウス EDTA 血またはヘパリン血 1 μ l をそれぞれ 20 μ l 反応系に添加し、マウス *Ccnd2* 遺伝子 (0.5 kb) および *TfrC* 遺伝子 (2 kb) の増幅 (3 step プロトコール、30 cycles) を行った。各反応液 3 μ l を電気泳動に供した。

【結果】MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 を用いた EDTA 血およびヘパリン血からのダイレクト PCR で、目的の遺伝子を良好に増幅できました。

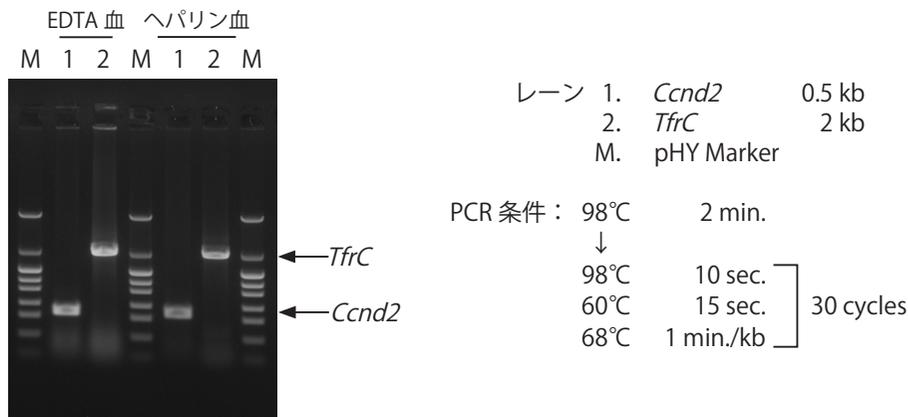


図 1. マウス EDTA 血およびヘパリン血からのダイレクト PCR

IX-2. トマトおよびハウレンソウの葉からのダイレクト PCR

【方法】直径 0.5 mm または直径 1.2 mm のパンチでカットしたトマトまたはハウレンソウの葉を 20 μ l 反応系に添加し、*cox1* 遺伝子 (約 0.5 kb) の増幅 (3 step プロトコール、30 cycles) を行った。各反応液 5 μ l を電気泳動に供した。

【結果】MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 を用いたトマトおよびハウレンソウの葉からのダイレクト PCR で、目的の遺伝子を良好に増幅できました。

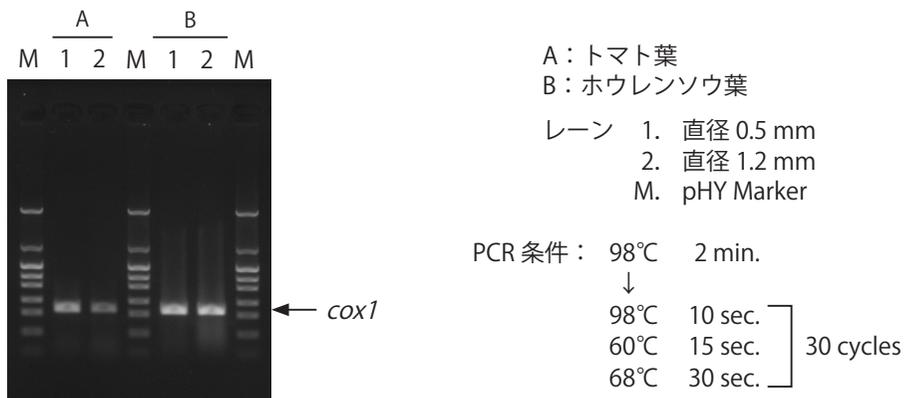


図 2. トマトおよびハウレンソウの葉からのダイレクト PCR

IX-3. マウス尾および耳からのダイレクト PCR

【方法】マウス尾の先端 1 mm および耳 1.5 mm 角をそれぞれ 50 μ l 反応系に添加し、マウス *Ywhaz* 遺伝子 (1 kb) の増幅 (3 step プロトコール、30 cycles) を行った。各反応液 4 μ l を Proteinase K 無添加または添加の Loading Buffer と混合し、電気泳動に供した。

【結果】反応液を Proteinase K 無添加の Loading Buffer と混合して電気泳動を行うと、アガロースゲルのウェルに DNA 断片が捕捉され、目的の位置に泳動されませんでした。Proteinase K 添加の Loading Buffer と混合したものは、目的の位置に泳動されました。

MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 を用いたマウス尾および耳からのダイレクト PCR で、目的の遺伝子を良好に増幅できました。

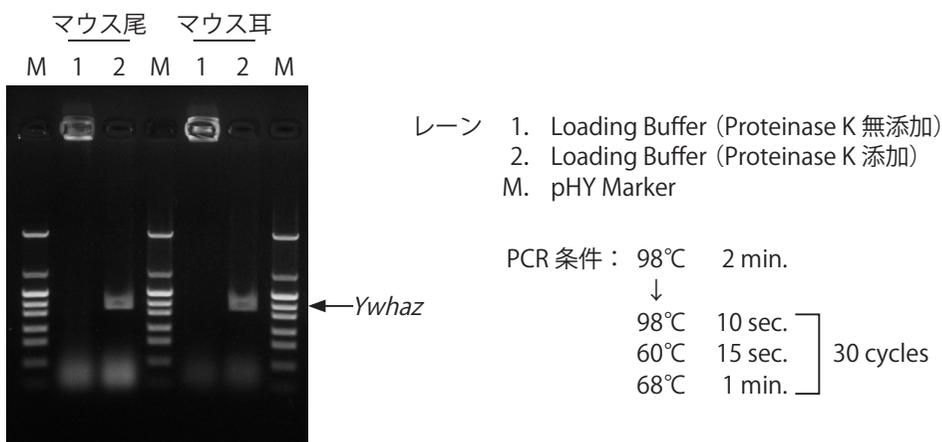


図 3. マウス尾および耳からのダイレクト PCR

◆ タカラバイオウェブサイトの「アプリの部屋 (製品使用例)」で、本酵素を用いた各種実験例をご紹介します。

X. 関連製品

MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 (製品コード R076A/B)
MightyAmp™ Genotyping Kit (製品コード R074A)
Tks Gflex™ DNA Polymerase (製品コード R060A/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/B)
T-Vector pMD20 (製品コード 3270)
T-Vector pMD19 (Simple) (製品コード 3271)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027)
Lysis Buffer for PCR (製品コード 9170A)
SimplePrep™ reagent for DNA (製品コード 9180)
Plant DNA Isolation Reagent (製品コード 9194)
Proteinase K (製品コード 9034)
6 × Loading Buffer (製品コード 9156)

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。
- ・ Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。MightyAmp、Tks Gflex、SimplePrep 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