

製品コード R076A

研究用

TAKARA

**MightyAmp™
DNA Polymerase Ver.3**

説明書

v201805Da

MightyAmp DNA Polymerase は、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.3 では、MightyAmp DNA Polymerase を改良した PCR 酵素とバッファーを組み合わせることにより、Ver.2 と比較して PCR 阻害物質に対する抵抗性をさらに増強しています。また、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」の性能も向上しています。

PCR 阻害物質を多く含むクルードなサンプルから 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、さらに、必要に応じてキット付属の 10 × Additive for High Specificity を PCR 反応液に添加することで、PCR 増幅の特異性や感度をアップすることもできます。

なお、本酵素は 98°C 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 Ver.3 (1.25 U/μl)	200 μl
2 × MightyAmp Buffer Ver.3 (Mg ²⁺ , dNTP plus)*2	1 ml × 5
10 × Additive for High Specificity	500 μl × 2

* 1 : 反応容量 50 μl での回数です。

* 2 : Mg²⁺濃度は 4 mM (2 ×)、dNTP 濃度は 600 μM each (2 ×) 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.3	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	適量	
MightyAmp DNA Polymerase Ver.3	1 μl	1.25 U/50 μl
(10 × Additive for High Specificity	5 μl	1 ×)*2
滅菌水	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 ≤ 10 μl
- クエン酸血*3 ≤ 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、ナズナ、ホウレンソウ) ≤ 直径 2 mm
- 生体試料粗抽出液 ≤ 5 μl

* 3 : クエン酸血を用いると反応性が低下する場合があります。

* 2 : まず、10 × Additive for High Specificity を含まない系で増幅を行ってください。増幅特異性や感度をさらにアップしたい場合には、10 × Additive for High Specificity を加えてお試しください。

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。

T_m 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。

$$T_m \text{ 値 (}^\circ\text{C)} = [(A, T \text{ の数}) \times 2] + [(G, C \text{ の数}) \times 4] + 35 - 2 \times [\text{Total base}]$$

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 Ver.3 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 Ver.3 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
	反応液組成	Additive for High Specificity を添加して試す
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
	反応液組成	Additive for High Specificity を添加して試す

※ 10 × Additive for High Specificity の添加による増幅特異性や感度のアップについては、次頁からの実施例をご参照ください。

IX. 実施例

IX-1. 高濃度フミン酸中での PCR

土壤中に存在しているフミン酸は、PCR 反応を強力に阻害することが知られています。本製品はフミン酸に対する耐性が既存の PCR 酵素に比べ格段に高く、土壌成分を多く含むクルードサンプルを用いた PCR でも高い成功率が期待できます。

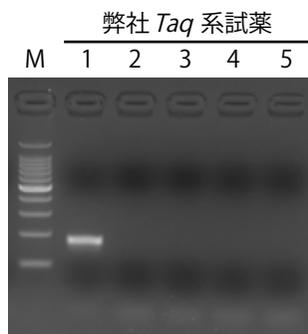
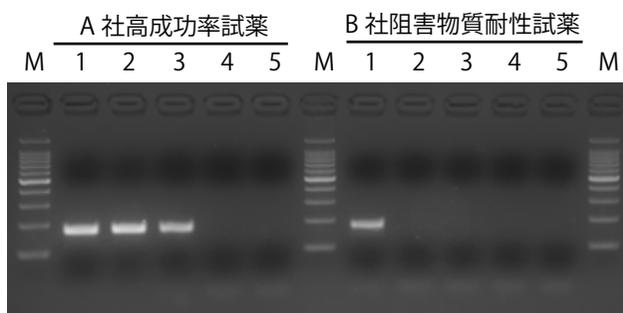
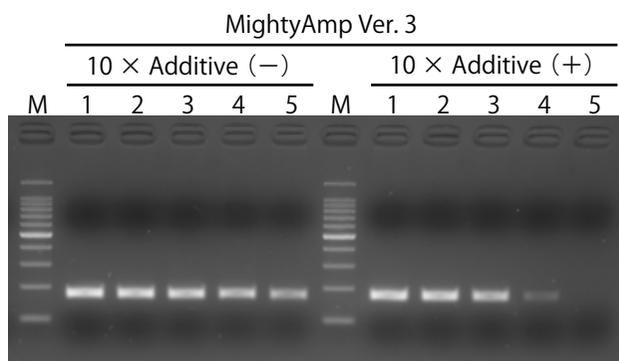
鋳型：*E. coli* genomic DNA (2×10^5 copy 相当)

ターゲット：16S rDNA (173 bp)

10 × Additive for High Specificity：無添加 (-) および添加 (+)

各酵素の推奨条件で反応

MightyAmp Ver.3 の PCR 条件：98°C 2 min.
↓
98°C 10 sec. }
60°C 15 sec. } 30 cycles
68°C 30 sec. }



レーン 1: フミン酸 0 μg
2: 0.1 μg
3: 0.2 μg
4: 0.3 μg
5: 0.4 μg/25 μl 反応系
M: 100 bp DNA Ladder (製品コード 3407A)

(弊社比較データ)

IX-2. 高濃度 NaCl 中での PCR

海水 (約 500 mM NaCl 含有) などの高塩濃度のサンプルは、PCR 反応を阻害することが知られています。

本製品は塩濃度に対する耐性が既存の PCR 酵素に比べ格段に高く、塩を多く含むクルードサンプルを用いた PCR でも高い成功率が期待できます。

鋳型: *E. coli* genomic DNA (2×10^5 copy 相当)

ターゲット: 16S rDNA 全長領域 (1,465 bp)

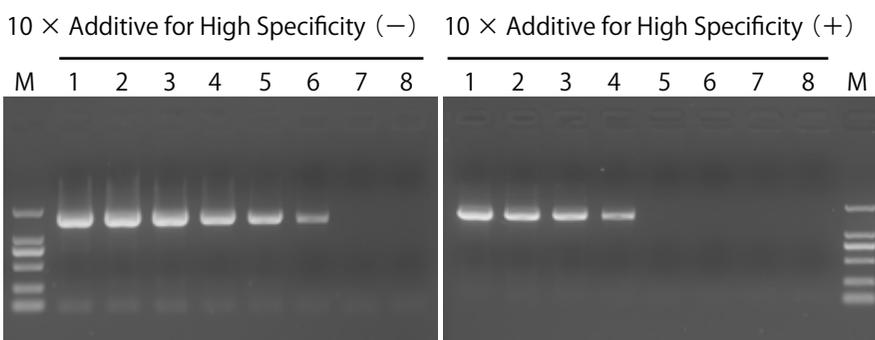
10 × Additive for High Specificity: 無添加 (-) および添加 (+)

各酵素の推奨条件で反応

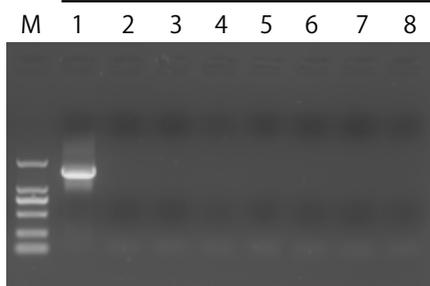
MightyAmp Ver.3 の PCR 条件: 98°C 2 min.

↓

98°C	10 sec.	} 30 cycles
60°C	15 sec.	
68°C	90 sec.	



弊社 Taq 系試薬



レーン 1: NaCl 終濃度 0 mM
2: 50 mM
3: 75 mM
4: 100 mM
5: 125 mM
6: 150 mM
7: 175 mM
8: 200 mM
M: DL 2,000 DNA Marker
(製品コード 3427A)

IX-3. 10 × Additive for High Specificity の添加による増幅特異性の改善

鋳型：Human genomic DNA

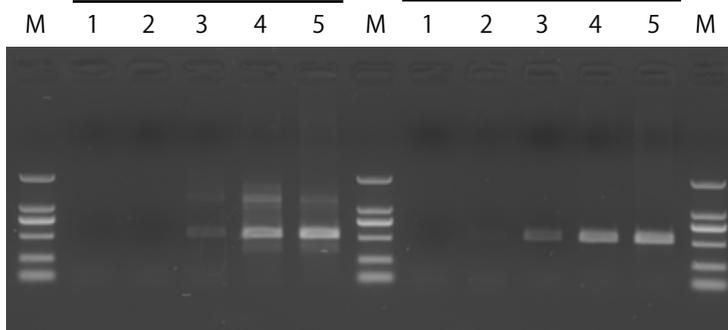
ターゲット：APOE 遺伝子 (520 bp)

10 × Additive for High Specificity：無添加 (-) および添加 (+)

PCR 条件：98°C 2 min.

↓
98°C 10 sec. }
60°C 15 sec. } 30 cycles
68°C 30 sec. }

10 × Additive for High Specificity (-) 10 × Additive for High Specificity (+)



レーン 1: Human genomic DNA 100 pg
2: 1 ng
3: 10 ng
4: 100 ng
5: 500 ng/50 μl 反応系
M: DL 2,000 DNA Marker (製品コード 3427A)

(注) 精製ゲノム DNA を鋳型とする場合など、クールドの程度が低い反応系に使用する際には、10 × Additive for High Specificity の添加を推奨します。

IX-4. 10 × Additive for High Specificity の添加による阻害物質耐性の改善 (タンニン酸存在下)

植物に多く含まれるタンニン酸は、PCR 反応を強力に阻害することが知られています。本製品はタンニン酸に対する耐性が既存の PCR 酵素に比べ格段に高く、植物成分を多く含むクルードサンプルを用いた PCR でも高い成功率が期待できます。

鋳型：Human genomic DNA 100 ng 相当

ターゲット：Human *DCLRE1A* 遺伝子 (1 kb)

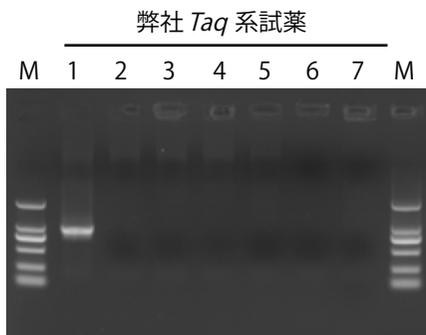
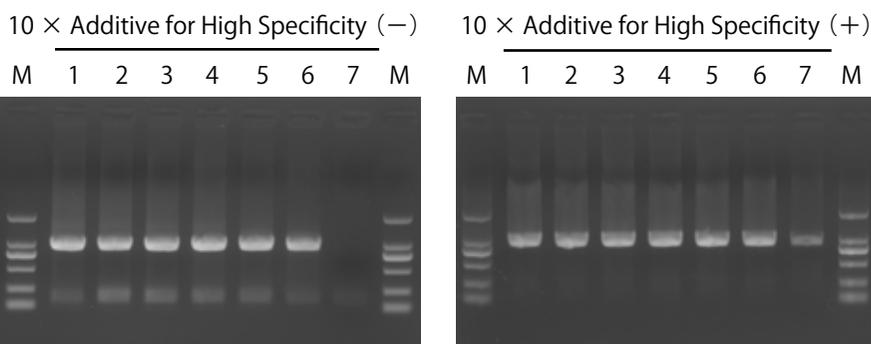
10 × Additive for High Specificity：無添加 (-) および添加 (+)

各酵素の推奨条件で反応

MightyAmp Ver.3 の PCR 条件：98°C 2 min.

↓

98°C 10 sec. }
60°C 15 sec. } 30 cycles
68°C 1 min. }



レーン 1: タンニン酸濃度 0 ng/μl
2: 1 ng/μl
3: 5 ng/μl
4: 10 ng/μl
5: 50 ng/μl
6: 100 ng/μl
7: 250 ng/μl
M: DL 2,000 DNA Marker
(製品コード 3427A)

IX-5. 各種生体試料からのダイレクト PCR 例

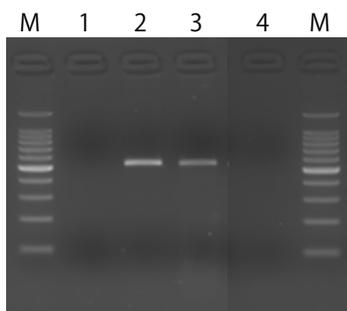
(1) Mouse Blood/FTA Card からのダイレクト PCR

【方法】直径 1.2 mm のパンチでカットした Mouse Blood/FTA Card を 25 μ l 反応系に添加し、Mouse *Hbb-b1* 遺伝子 (542 bp) の増幅 (各酵素の推奨条件：3 step プロトコル、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.3 を用いた Mouse Blood/FTA Card 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。

MightyAmp Ver.3 の PCR 条件：98 $^{\circ}$ C 2 min.

↓
98 $^{\circ}$ C 10 sec. }
60 $^{\circ}$ C 15 sec. } 30 cycles
68 $^{\circ}$ C 30 sec. }



レーン 1：従来製品 (製品コード R071A)
2: MightyAmp Ver.3
10 \times Additive for High Specificity (-)
3: MightyAmp Ver.3
10 \times Additive for High Specificity (+)
4: B 社阻害物質耐性試薬
M: 100 bp DNA Ladder (製品コード 3407A)

(弊社比較データ)

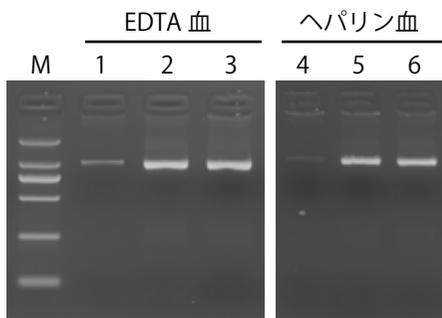
(2) ヒト EDTA 血およびヘパリン血からのダイレクト PCR

【方法】ヒト EDTA 血またはヘパリン血 5 μ l をそれぞれ 25 μ l 反応系に添加し、ヒト *DCLRE1A* 遺伝子 (約 1 kb) の増幅 (3 step プロトコル、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.3 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。

PCR 条件：98 $^{\circ}$ C 2 min.

↓
98 $^{\circ}$ C 10 sec. }
60 $^{\circ}$ C 15 sec. } 30 cycles
68 $^{\circ}$ C 1 min. }



レーン 1, 4：従来製品 (製品コード R071A)
2, 5: MightyAmp Ver.3
10 \times Additive for High Specificity (-)
3, 6: MightyAmp Ver.3
10 \times Additive for High Specificity (+)
M: DL 2,000 DNA Marker (製品コード 3427A)

X. 関連製品

MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.2 (製品コード R071A/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)
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