

製品コード RR013A

研究用

TaKaRa

TaKaRa LA PCR™ Kit
Ver. 2.1

説明書

v201906Da

TaKaRa LA PCR Kit Ver2.1 は、*TaKaRa LA Taq*[®] の性能を最大に引き出すことができるキットです。*TaKaRa LA Taq* は、LA PCR の原理を応用した 3' → 5' exonuclease 活性 (proof reading 活性) をもつ PCR 用酵素で、本酵素と LA PCR 用に最適化した専用バッファー (LA PCR Buffer II) との組み合わせにより、λ DNA の場合、48 kb、ゲノム DNA の場合、30 kb という長鎖の DNA を増幅することが可能です。また、*TaKaRa LA Taq* は、長鎖 DNA の増幅だけでなく、GC rich 専用のバッファー (GC Buffer I, II) と組み合わせることで、複雑な二次構造 (GC rich) をとるような鑄型の増幅についても威力を発揮します。さらに LA PCR Buffer II の場合、Mg²⁺ free buffer を用いることにより、Mg²⁺ 濃度の条件検討も行えます。

I. 内容 (PCR 反応液 50 μl ; 50 回分)

1. <i>TaKaRa LA Taq</i> *1	(5 U/μl)	125 U
2. dNTP Mixture*2	(各 2.5 mM)	400 μl
3. 10 × LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	(Mg ²⁺ 濃度 25 mM)	250 μl
4. 10 × LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ free)		250 μl
5. MgCl ₂	(25 mM)	500 μl
6. Control Template	(100 ng/μl HL60 由来ゲノム DNA)	10 μl
7. Control Primer LA3*4	(10 μM)	10 μl
8. Control Primer LA4*4	(10 μM)	10 μl
9. λ- <i>Hind</i> III digested MW Marker*5	(100 ng/μl)	20 μl
10. 2 × GC Buffer I (Mg ²⁺ plus)*3	(Mg ²⁺ 濃度 5 mM)	1.25 ml
11. 2 × GC Buffer II (Mg ²⁺ plus)*3	(Mg ²⁺ 濃度 5 mM)	1.25 ml
12. Control Primer GC 1*4	(10 μM)	10 μl
13. Control Primer GC 2*4	(10 μM)	10 μl

* 1 : *TaKaRa LA Taq* について

- 濃度 5 U/μl
- 形状 20 mM Tris-HCl (pH8.0)、100 mM KCl、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、0.5% Tween 20、0.5% NP-40、50%グリセロール溶液
- 活性の定義 活性化サケ精子 DNA を鑄型/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 MgCl₂、0.1 mM DTT、各 200 μM dATP・dGTP・dCTP、100 μM [³H]-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 : 増幅領域が GC rich あるいは強固な二次構造をとると思われる場合、まず 2 × GC Buffer I をご使用ください。Buffer I で増幅しにくい場合には 2 × GC Buffer II をご使用ください。改善される場合があります。

【注意】 GC Buffer I および GC Buffer II を用いた場合、LA PCR Buffer II を用いた場合に比べて、PCR 産物のエラー率が高くなりますのでご注意ください。

* 4 : Control Primer について

Control Primer LA3 : 5'-ACATGATTAGCAAAGGGCCTAGCTTGGACTCAGA-3'
Control Primer LA4 : 5'-TGCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC-3'
Control Template の 17.5 kb を増幅する。

Control Primer GC1 : 5'-GGGAGGGGACCGGGGAACAGAG-3'
Control Primer GC2 : 5'-GAACAGTCCGTCACTTCACGTG-3'
Control Template の GC rich 領域 1,255 bp を増幅する。

* 5 : λ-*Hind* III digested MW Marker について

電気泳動用分子量マーカーで、バンドのサイズは以下の通りです。
23,130、9,416、6,557、4,361、2,322、2,027、564、125 bp

●キット以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

1. 遺伝子増幅装置 (authorized instruments)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (製品コード TP600) など
2. マイクロ遠心チューブ (エッペンドルフ型、ポリプロピレン製)
3. アガロース電気泳動装置
Mupid-2plus (製品コード M-2P) など
4. アガロースゲル
PrimeGel™ Agarose LE 1-20K (製品コード 5800A)
PrimeGel Agarose GOLD 3-40K (製品コード 5802A)
5. Loading buffer (6 × : 36% glycerol、0.05% bromophenol blue、0.035% xylene cyanol、30 mM EDTA)
6. DNA 染色剤 *6
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (製品コード 5760A/5761A)
エチジウムブロマイド
* 6 : SYBR Green I を使用する場合は専用のフィルターが必要です。
7. マイクロ遠心機
8. 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)
9. 滅菌精製水
10. 上流 Primer と下流 Primer
タカラバイオ (株) では、プライマーの合成サービスを行っております。
ご注文は FAX : 077-565-6975、または弊社ウェブサイトからも承ります

II. 保存 - 20°C

III. 操作

A. 長鎖 DNA の増幅

1. 下記に示す反応液を調製する。

[10 × LA PCR Buffer II (Mg²⁺ plus) を用いる場合]

試薬	使用量
<i>TaKaRa LA Taq</i> (5 U/μl)	0.5 μl
10 × LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μl
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	8 μl
Template	< 1 μg
Primer 1	0.2 ~ 1.0 μM (final conc.)
Primer 2	0.2 ~ 1.0 μM (final conc.)
滅菌精製水	up to 50 μl

[10 × LA PCR Buffer II (Mg²⁺ free) を用いる場合]

試薬	使用量
<i>TaKaRa LA Taq</i> (5U/μl)	0.5 μl
10 × LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ free)	5 μl
25 mM MgCl ₂ (終濃度 2.5 mM)	5 μl
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	8 μl
Template	< 1 μg
Primer 1	0.2 ~ 1.0 μM (final conc.)
Primer 2	0.2 ~ 1.0 μM (final conc.)
滅菌精製水	up to 50 μl

2. 以下の条件で反応を行う。(17.5 kb を増幅する場合の例)

98°C 10 sec.*1
68°C 15 min.*2 } 30 cycles

3. 反応終了後、反応液の一部 (5 ~ 10 μl) をアガロースゲル電気泳動にかけ、反応産物を確認する。

* 1 : 変性条件は使用機種とチューブの種類に合わせて設定してください。設定の目安としては 98°C の場合は 5 ~ 10 sec.、94°C の場合は 20 ~ 30 sec. です。

* 2 : 増幅サイズに応じて設定してください。設定の目安は 1 kb あたり 30 sec. ~ 1 min. です。

B. GC rich な領域の増幅

1. 下記に示す反応液を調製する。

試薬	使用量
<i>TaKaRa LA Taq</i> (5 U/μl)	0.5 μl
2 × GC Buffer I or II *	25 μl
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	8 μl
Template	< 1 μg
Primer 1	0.2 ~ 1.0 μM (final conc.)
Primer 2	0.2 ~ 1.0 μM (final conc.)
滅菌精製水	up to 50 μl

* : まず 2 × GC Buffer I をご使用ください。Buffer I で増幅しにくい場合には 2 × GC Buffer II をご使用ください。改善される場合があります。

2. 以下の条件で反応を行う。(2 kb を増幅する場合の例)

94°C	1 min.	} 30 cycles
94°C	30 sec.	
60°C	30 sec.	
72°C	2 min. *	
72°C	5 min.	

*：増幅サイズに応じて設定してください。設定の目安は 1 kb あたり 1 min. 程度です。

3. 反応終了後、反応液の一部 (5 ~ 10 μ l) をアガロースゲル電気泳動にかけ、反応産物を確認する。

C. 電気泳動

反応終了後の溶液 5 ~ 10 μ l に 6 \times Loading Buffer を 1/5 量加え、アガロースのウェルに注入し、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 1.0 μ g/ml のエチジウムブロマイド溶液、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。

D. コントロール反応

[LA 編] 本キットには、コントロールとして HL60 由来ゲノム DNA および約 17.5 kb の領域を増幅するためのプライマーが含まれています。

<反応液組成>

試薬	使用量	終濃度
10 \times LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μ l	[1 \times]
dNTP Mixture	8 μ l	各 400 μ M
Control Primer LA3	1 μ l	0.2 μ M
Control Primer LA4	1 μ l	0.2 μ M
TaKaRa LA Taq	0.5 μ l	2.5 U/50 μ l
Control Template	2 μ l	200 ng/50 μ l
滅菌精製水	32.5 μ l	
Total	50 μ l	

<反応条件>

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

*：変性条件は使用機種とチューブの種類に合わせて設定してください。設定の目安としては 98°C の場合は 5 ~ 10 sec.、94°C の場合は 20 ~ 30 sec. です。

< PCR 産物の確認 >

反応後、反応液の一部 (5 ~ 10 μ l) をアガロースゲル電気泳動にかけ、反応産物を確認する。コントロールプライマー LA の場合、約 17.5 kb のバンドが確認される。

[GC rich 編] 本キットには、コントロールとして HL 60 由来ゲノム DNA および 1,255 bp の領域 (GC 含量 65%) を増幅するためのプライマーが含まれています。

<反応液組成>

試薬	使用量	終濃度
2 × GC Buffer I または 2 × GC Buffer II	25 μ l	[1 ×]
dNTP Mixture	8 μ l	各 400 μ M
Control Primer GC1	1 μ l	0.2 μ M
Control Primer GC2	1 μ l	0.2 μ M
<i>TaKaRa LA Taq</i>	0.5 μ l	2.5 U/50 μ l
Control Template	1 μ l	100 ng/50 μ l
滅菌精製水	13.5 μ l	
Total	50 μ l	

<反応条件>

94°C	1 min.	} 30 cycles
94°C	30 sec.	
60°C	30 sec.	
72°C	2 min.	
72°C	5 min.	

< PCR 産物の確認 >

反応終了後、反応液の一部 (5 ~ 10 μ l) をアガロースゲル電気泳動にかけ、反応産物を確認する。コントロールプライマー GC の場合、1,255 bp のバンドが確認される。

E. 実験例

1) ヒトゲノム DNA を鋳型とした LA PCR

Template DNA	: ヒトゲノム DNA
Target	: β -globin cluster region および TPA gene region
増幅サイズ	: 17.5 kb } β -globin cluster region
	: 21.5 kb } TPA gene region
	: 27 kb }

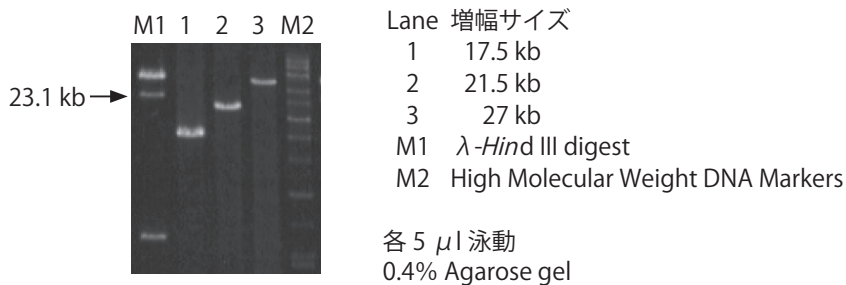
<反応液組成>

試薬	使用量	終濃度
ヒトゲノム DNA (500 ng/ μ l)	1 μ l	500 ng/50 μ l
10 × LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μ l	[1 ×]
dNTP Mixture	8 μ l	各 400 μ M
Sense Primer (20 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M
Antisense Primer (20 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M
<i>TaKaRa LA Taq</i>	0.5 μ l	2.5 U/50 μ l
滅菌精製水	34.5 μ l	
Total	50 μ l	

<反応条件>

94°C 1 min.
↓
98°C 10 sec.
68°C 15 min. (17.5 kb、21.5 kb) or 20 min. (27 kb)] 30 cycles
↓
72°C 10 min.

<結果>

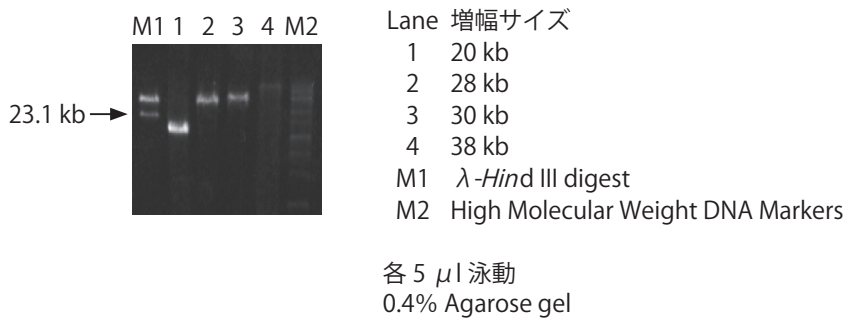


2) 大腸菌ゲノム DNA を鋳型とした LA PCR

Template DNA : 大腸菌ゲノム DNA
増幅サイズ : 20 kb、28 kb、30 kb、38 kb

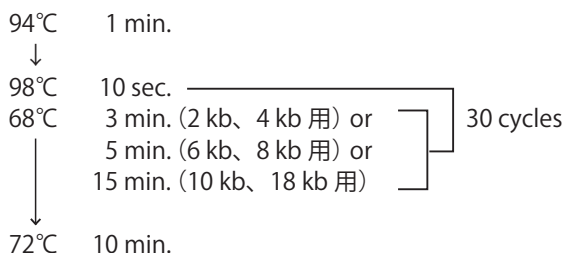
反応組成および反応条件は実験例 1) と同じ。
ただし鋳型 DNA 濃度は 100 ng/50 μ l PCR

<結果>

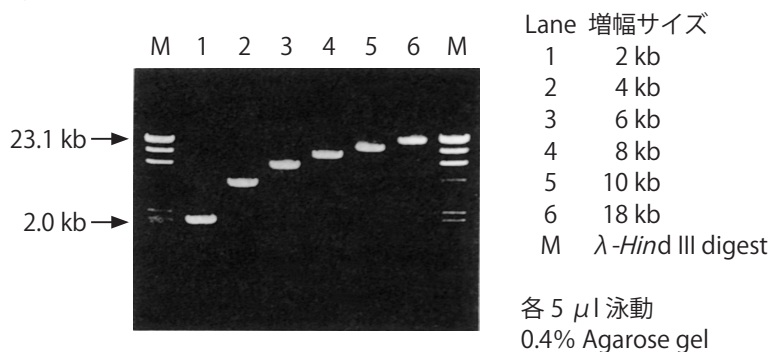


3) 大腸菌ゲノム DNA を鋳型とした LA PCR (≦ 18 kb)

<反応条件>



<結果>



●操作上の注意

1. キットの内容物は室温～37°Cで完全に溶解したのち、ピペッティングあるいは転倒混和することにより良く攪拌してください。ボルテックスの使用はなるべくさけてください。Buffer 類と *TaKaRa LA Taq* を混合する場合は、泡立ちあるいは酵素の失活を防ぐために特に注意深く、ゆっくりとピペッティングしてください。また、各内容物は使用するまで氷上で保存してください。
2. 反応液は、反応開始前にピペッティングにより軽く攪拌してください。この際、ボルテックスは絶対に使用しないでください。
3. 長鎖 DNA を増幅する場合のプライマーは、特異性の高いものをご使用ください。特異性を高めるために 25～30 mer のプライマーが効果的です。
4. 鋳型 DNA はなるべく精製度の高いものをご使用ください。また、長鎖 DNA を増幅する場合は鋳型 DNA 量を多めにご使用ください。

IV. Q & A

1. LA PCR 反応を行う際の反応条件は？

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 ～ 35 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。

<初期変性>

ゲノム DNA を鋳型とする場合でも、94℃、1 ～ 2 分で十分です。

<サイクル中の変性温度と時間>

0.2 ml マイクロチューブを使用する場合には、98℃、10 秒あるいは 94℃、20 秒を推奨します。

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出来ない場合があります。

なお、Thermo Fisher Scientific 社のサーマルサイクラー 9700 を使用する場合には、98℃での変性は避け、94℃、20 秒で行ってください。

<アニーリングおよび伸長>

至適アニーリング温度（通常 55 ～ 68℃）は、2℃間隔で検討してください。また、60 ～ 68℃の間でも *TaKaRa LA 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。

伸長温度が 68 ～ 72℃の場合には、1 kb あたりおおよそ 30 秒～1 分間の設定をお勧めします。設定温度が 68℃以下の場合、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は認められないか、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。

長鎖 DNA を増幅する場合、サイクルの後半でアニーリング伸長時間をサイクル毎に徐々に延ばしていくと、反応性が改善されることがあります。

例) 27 kb の増幅

```
94℃ 1 min.
↓
98℃ 10 sec.
68℃ 20 min. ] 14 cycles
↓
98℃ 10 sec.
68℃ 20 min.+ 15sec./cycle ] 16 cycles
↓
72℃ 10 min.
```

2. LA PCR のプライマーを選ぶ際の注意点は？

特異性が非常に重要です。20 mer 程度のプライマーでも、特異性が高ければ 20 kb 以上の増幅反応に使用できます。ただし、可能ならば 25 ~ 30 mer 程度のプライマーを設計することをお勧めします。特異性の低いプライマーの場合、非常に多くのエキストラバンドを生ずることになります。プライマー設計の注意点としては、GC 含量が 40 ~ 60% くらいで、3' 末端部が GC リッチにならないこと、上流・下流プライマーの Tm 値を揃えるなどがあります。

また、イノシンを含むプライマーはお勧めできません。

3. プライマーの使用量は？

最終濃度 0.1 ~ 1.0 μ 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、非特異的な反応を助長し、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 (ヒトゲノム DNA 等) 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 (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。

4. LA PCR を行う際の至適酵素量は？

TaKaRa LA PCR Kit Ver. 2.1 の場合、50 μ l の反応の際には 2.5 U の *TaKaRa LA Taq* 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。

5. LA PCR を行う際の鋳型 DNA の調製法および使用量は？

鋳型 DNA の状態は、LA PCR の成否に重要なファクターです。

10 kb を越える増幅反応を行う場合には、簡便な方法 (例えば cell を熱処理あるいは protease 処理のみ) で調製したサンプル DNA は鋳型としては適さないようです。十分に精製した完全な形の DNA (nick 等が入っていないもの) を使用することをお勧めします。

培養細胞や動物組織からは NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250)、全血からは NucleoSpin Blood (製品コード 740951.10/.50/.250)、酵母からは Gen とるくん™ (酵母用) High Recovery (製品コード 9082) を用いると、PCR に適した DNA を調製することができます。

以下には、市販のキットを使用しないヒトゲノム DNA の調製例および *E. coli* ゲノム DNA の調製例を示します。

【標準プロトコール-1 (ヒトゲノム DNA の精製法)】

- 1) 15 枚のペトリ皿より、HL60 細胞 (1.5×10^9 cells) を収集し、0.7% NaCl で 2 回洗浄。
- 2) 10 mM Tris-HCl (pH8.3) 15 ml に細胞を懸濁。
- 3) 細胞懸濁液に、10 mg/ml Proteinase K 150 μ l と 10% SDS 150 μ l を加え、60°C で 1 時間インキュベートした後、37°C で 16 時間インキュベートする。
- 4) フェノール (0.1 M Tris-HCl、pH8.0 で飽和したもの) 15 ml を加え、おだやかに 15 分間混合する。
- 5) 9,000 rpm (約 6,000 $\times g$) で 10 分間遠心分離。
- 6) 上清を別チューブに移し、Tris-HCl、pH8.0 で飽和したフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 15 ml を加え、15 分間おだやかに混合する。
- 7) 9,000 rpm (約 6,000 $\times g$) で 10 分間遠心分離。
- 8) 上清を別のチューブに移し、クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) 15 ml を加え、チューブを上下させながらおだやかに 15 分間混合する。
- 9) 9,000 rpm (約 6,000 $\times g$) で 10 分間遠心分離。
- 10) 上清を別のチューブに移し、3 M 酢酸ナトリウム (pH5.2) 1.5 ml とエタノール 30 ml を加え、おだやかに混合する。
- 11) 細いガラス棒で DNA を巻取り、回収する。
- 12) 80%エタノールで洗浄し、乾燥。
- 13) DNA を 10 ml の TE buffer に溶解し (DNA を巻取ったガラス棒を buffer に入れ、4°C で一晩置いておく。) 10 mg/ml RNase A 100 μ l を加え、37°C で 1 時間インキュベートする。
- 14) フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 10 ml を加え、5 分間おだやかに混合する。
- 15) 9,000 rpm (約 6,000 $\times g$) で 10 分間遠心分離。
- 16) 上清を別のチューブに移し、クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) 10 ml を加え、5 分間おだやかに混合する。
- 17) 9,000 rpm (約 6,000 $\times g$) で 5 分間遠心分離。
- 18) 上清を別のチューブに移し、3 M 酢酸ナトリウム (pH5.2) 1 ml とエタノール 20 ml を加えておだやかに混合する。
- 19) 細いガラス棒で DNA を巻取り、回収する。
- 20) 80%エタノールで洗浄し、乾燥。
- 21) 2 ml の TE buffer に溶解し (DNA を巻取ったガラス棒を buffer に入れ、4°C で一晩置いておく)、最終濃度 0.5 mg/ml に調整する。

【標準プロトコール-2 (大腸菌 DNA の精製法)】

- 1) 200 ml の L-broth で一晩培養した大腸菌の菌体をフラスコ (2 L) 2 本から遠心回収し、50 mM EDTA、50 mM Tris-HCl (pH8.0) 40 ml に懸濁する。
- 2) - 80°C で 30 分間凍結。
- 3) 0.25 M Tris-HCl (pH8.0) に 10 mg/ml の濃度で溶解したリゾチーム溶液 4 ml を加え、時々混合しながら室温にて溶解。溶解後、氷中に 45 分間置く。
- 4) STEP (0.5% SDS、50 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.4 M EDTA、1 mg/ml Proteinase K) 8 ml を加え、50°C で 1 時間インキュベートする。
- 5) TE (10 mM Tris-HCl (pH8.3)、1 mM EDTA) 45 ml を加え、さらに Tris-HCl (pH8.0) で飽和したフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) 96 ml を加え、チューブを上下し、5 分間おだやかに混合する。
- 6) 5,000 rpm (約 4,000 × g) で 15 分間遠心分離。
- 7) 上清を別のチューブに移し、クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を 96 ml 加え、チューブを上下させながらおだやかに 5 分間混合する。
- 8) 5,000 rpm (約 4,000 × g) で 15 分間遠心分離。
- 9) 上清を別のチューブに移し、3 M 酢酸ナトリウム (pH5.2) 9 ml とエタノール 225 ml を加え、おだやかに混合する。
- 10) 細いガラス棒で DNA を巻取り、回収する。
- 11) 80% エタノールで洗浄し、乾燥。
- 12) DNA を 20 ml の TE buffer に溶解し (DNA を巻取ったガラス棒を buffer に入れ、4°C で一晩置いておく) 10 mg/ml RNase A 200 μl を加え、37°C で 30 分間インキュベートする。
- 13) 上記のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) 20 ml を加え、チューブを上下し 5 分間おだやかに混合する。
- 14) 10,000 rpm (約 7,500 × g) で 15 分間遠心分離。
- 15) 上清を別のチューブに移し、クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) 20 ml を加え、チューブを上下し 5 分間おだやかに混合する。
- 16) 10,000 rpm (約 7,500 × g) で 15 分間遠心分離。
- 17) 上清を別のチューブに移し、3 M 酢酸ナトリウム (pH5.2) 2 ml とエタノール 50 ml を加えておだやかに混合する。
- 18) 細いガラス棒で DNA を巻取り、回収する。
- 19) 80% エタノールで洗浄し、乾燥。
- 20) 20 ml の TE buffer に溶解し (DNA を巻取ったガラス棒を buffer に入れ、4°C で一晩置いておく)、最終濃度 0.1 mg/ml に調整する。

なお、タカラバイオではこの方法で調製した DNA をコントロールテンプレートとして販売していますのでご利用ください。

LA PCR 用 genome DNA Set (製品コード 9060)

【推奨 DNA 使用量】

ヒトゲノム DNA	0.1 ~ 1 μg
<i>E. coli</i> ゲノム DNA	10 ~ 100 ng
λファージ DNA	0.5 ~ 2.5 ng

6. λファージ粒子から直接 LA PCR が行えるか？

はい。

99℃、10 min. 処理後のファージ粒子約 $10^6 \sim 10^7$ PFU を鋳型にして、少なくとも 8 kb の増幅が可能です。

7. Mammalian cells、あるいは *E. coli* cells を熱処理 (98℃、2 min.) あるいはプロテアーゼ処理しただけのサンプルを LA PCR に利用できるか？

< *E. coli* の場合 >

熱処理ただけで 10 kb の増幅が可能です。

(37℃、overnight culture in L-broth を 2 μl 使用 / 50 μl PCR)

< ヒト細胞 (培養細胞) の場合 >

熱処理ただけでは、数百ベースが限界です。

また、プロテアーゼ処理し、熱処理したサンプルでも、1 ~ 2 kb の増幅が限界と考えます。長鎖フラグメントの増幅は、推奨標準プロトコールによって精製した DNA の利用をお勧めします。

8. 泳動した際に全体的にスミアする、なぜか？

スミアの原因としては次のことが考えられます。

原因	改良点
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。
dNTP 量が少なすぎる。	50 μM 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。
Template 量が多すぎる。	Template 量を 20% ずつ減らしていく。

9. 非特異的に反応したバンドが多く見られる、なぜか？

原因として次のことが考えられます。

原因	改良点
プライマー濃度が高すぎる。	0.1 μM 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。上流・下流のプライマーの配列が相補配列にならないようにする。
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℃間隔で上げていく。
室温から変性温度 (94 ~ 98℃) 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 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。	時間を 5 秒間隔で増やしていく。
Template 量が多すぎる。	Template 量を 20% ずつ減らしていく。

10. *TaKaRa LA Taq* で増幅した PCR 産物は、T-Vector にクローニングできるか？

TaKaRa LA Taq で増幅した PCR 産物の多くは、3' 末端に A が付加された状態になりますので、T-Vector へのクローニングが可能です。

ただし、長鎖の PCR 産物 (5 kb 以上) の T-Vector へのクローニングは効率が悪くなりますのでご注意ください。

VI. 参考文献

- 1) Barnes W M. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1994) **91**: 2216-2220.
- 2) Cheng S, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*. (1994) **91**: 5695-5699.
- 3) Cheng S, Higuchi R, and Stoneking M. *Nature Genet.* (1994) **7**: 350-351.
- 4) Cheng S, *et al.* *Nature*. (1994) **369**: 684-685.
- 5) Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S J, Higuchi R, Horn G T, Mullis K B, and Erlich H A. *Science*. (1988) **239**: 487-491.
- 6) Scharf S J, Horn G T, and Erlich H A. *Science*. (1986) **233**: 1076-1078.
- 7) Gyllensten U B and Erlich H A. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1988) **85**: 7652-7656.
- 8) Kawasaki E S, Clark S C, Coyne M Y, Smith S D, Champlin R, White O N, and McCormick F P. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1988) **85**: 5698-5702.
- 9) Lawyer F C, Stoffel S, Saiki R K, Myambo K B, Drummond R, and Gelfand D H. *J Biol Chem*. (1988) **264**: 6427-6437.

V. 関連製品

TaKaRa LA Taq® with GC Buffer (製品コード RR02AG/RR02BG)
TaKaRa LA Taq® (製品コード RR002A/B)
TaKaRa LA Taq® Hot Start Version (製品コード RR042A/B)
Taq Antibody (製品コード 9002A/B)
LA PCR™用 genome DNA Set (製品コード 9060)
NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250)
NucleoSpin Blood (製品コード 740951.10/.50/.250)
Gen とるくん™ (酵母用) High Recovery (製品コード 9082)
PrimeGel™ Agarose LE 1-20K (製品コード 5800A)
PrimeGel™ Agarose GOLD 3-40K (製品コード 5802A)
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (製品コード 5760A/5761A)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Gradient* (製品コード TP600)

VII. 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。
- *TaKaRa LA Taq*、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。LA PCR、PrimeGel、Gen とるくん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