

タカラバイオ PCR Enzymes Guide 2018-2019



that's
GOOD
science!™

Clontech TaKaRa cellartis

タカラバイオは、国産初の *Taq* DNA Polymerase の製造を行って以来、研究者の皆様の様々なニーズにお応えするべく、常に新製品の開発に努めてまいりました。本ガイドでは、PCR のリーディングカンパニーとして弊社が自信を持ってお勧めする PCR 酵素および関連製品についてご紹介いたします。

PCR Enzymes Guide 2018-2019 Contents

◆製品選択ガイド

- ぱっと判る PCR 酵素の使い分け 2

◆巻頭特集

- PCR の原理 3
- PCR の応用 4
- PCR の利用例、応用例 5
- タカラバイオが誇る PCR テクノロジーのご紹介 9

◆Tks Gflex™ DNA Polymerase

- Tks Gflex™ DNA Polymerase 11
- Tks Gflex™ DNA Polymerase Low DNA 13

◆PrimeSTAR® シリーズ

- PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase 15
- PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 17
- PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit 18
- PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 19

◆MightyAmp™ シリーズ

- MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 21
- MightyAmp™ Genotyping Kit 23

◆Taq シリーズ

- TaKaRa Taq™ 26
- TaKaRa Taq™ HS Perfect Mix 27
- TaKaRa Taq™ HS Low DNA 28
- TaKaRa Ex Taq® 29
- TaKaRa LA Taq® 31
- SpeedSTAR™ HS DNA Polymerase 33

◆Taq 関連製品

- TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG plus 35
- Multiplex PCR Assay Kit Ver.2 36
- TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA) 37

◆Dye 入りプレミックス試薬

- EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix 39
- EmeraldAmp® PCR Master Mix 41
- SapphireAmp® Fast PCR Master Mix 41

◆RT-PCR Kit

◆アプリケーション

◆Q & A ー快適な PCR のためにー

◆エンドポイント PCR 装置

ぱっと判る PCR 酵素の使い分け

シンプルな条件でとにかく増やしたい！
【ファーストチョイス酵素】

高い成功率！様々な場面に

Tks Gflex™ DNA Polymerase

独自のプライミング特異性向上物質の採用で、クールドサンプルにも強く、GCリッチ・ATリッチ・長鎖DNAも正確に、高い特異性、高い成功率でPCR増幅できます。

こちらもオススメ…

16S (V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS

糞便・環境サンプルからNGS用ライブラリーを作製

クローニング目的で正確性が重要！
短時間でPCRを行いたい！

正確PCR

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase

独自開発の伸長因子の添加により正確性が大幅にアップ。
自信を持ってお勧めするハイフィデリティPCR酵素です。

こちらもオススメ…

PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase

長鎖DNAも正確に増幅

In-Fusion® HD Cloning Kit

任意のベクターの任意の位置にディレクショナルクローニングが可能

サンプルから直接PCR増幅したい！

パワフルなPCR

MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3

血液、動植物組織、細胞など、サンプルをそのまま反応液に添加する「ダイレクトPCR」が可能です。面倒なDNA精製の必要がありません。

こちらもオススメ…

MightyPrep reagent for DNA

10分の熱処理で簡単にDNA抽出

ルーチンPCR

基本のPCR

TaKaRa Ex Taq®

PCRといえばこれ！多くの愛好者に支えられてきた実績あるPCR酵素です。
通常のTaqよりも高い検出感度と増幅収量を誇ります。

こちらもオススメ…

TaKaRa LA Taq®

長鎖増幅に最適化しました

ルーチンPCR
コロニーPCR
インサート
チェック

Dye入りプレミックス試薬

EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix

コストパフォーマンスを最も重視しました。しかし性能面での妥協はありません。
比重剤も入った完全プレミックスタイプで超お得です！

こちらもオススメ…

EmeraldAmp® PCR Master Mix

Hot Startタイプのプレミックス酵素

SapphireAmp® Fast PCR Master Mix

クラス最高の高速型プレミックス酵素

バイサルファイト処理DNAを鋳型に増幅したい

エピジェネティクス解析に

TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA)

多くのPCR酵素が苦手とするウラシルを多く含むDNA増幅用に最適化！効率よく特異的な増幅が可能です。

こちらもオススメ…

MethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit

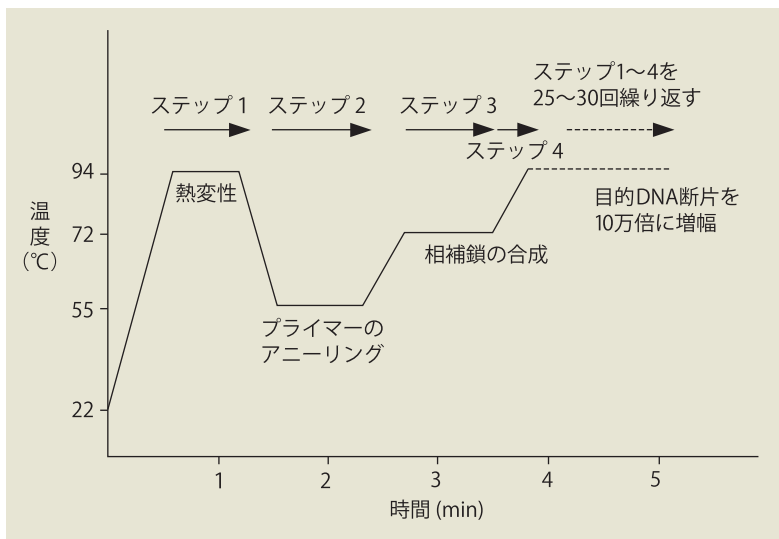
90分でバイサルファイト処理を完了

PCRの原理

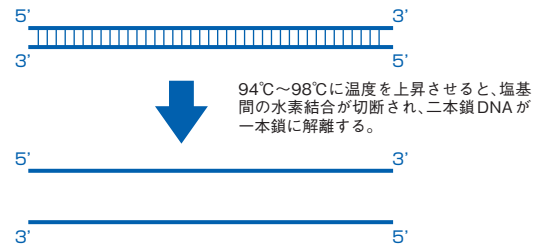
PCR(Polymerase Chain Reaction)法とは、

- ・ DNA鎖の熱変性(denaturation step)
- ・ プライマーのアニーリング(annealing step)
- ・ ポリメラーゼによる相補鎖の合成(extension step)

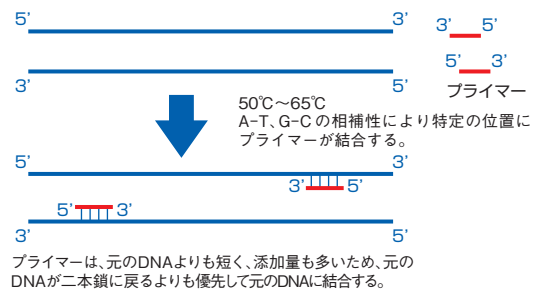
を繰り返し行うことにより *in vitro* でDNAを増幅する方法です。
この方法を用いると、プライマーに挟まれた遺伝子領域のDNAを
数時間で少なくとも 10^5 倍に増幅できます。



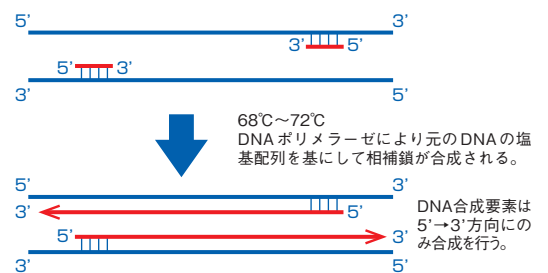
Step 1 : 二本鎖 DNA を熱変性により一本鎖に
解離させる。
(Denature step)



Step 2 : 一本鎖になったDNAに、酵素による
DNA合成時に必要となるプライマー(短鎖の一本
鎖DNA)を結合させる。
(Annealing step)

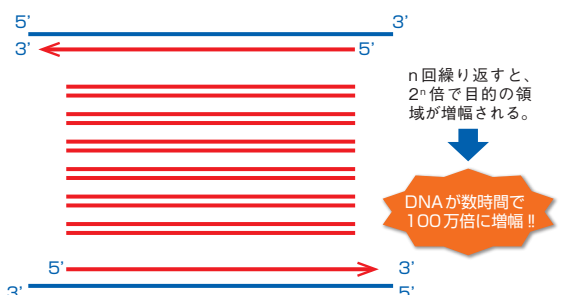


Step 3 : 結合したプライマーより、DNAポリメ
ラーゼにより元のDNAの相補鎖を合成する。
(Extension step)



Step 4 : 増幅産物としての二本鎖DNAを再度
熱変性して一本鎖にする

Step 1~4を複数回繰り返すことで、特定の領域
のDNAを増幅(理想的には1回で2倍)



PCR実験の基本的な流れ

1. DNA調製
サンプルからのDNA抽出
2. PCR
・ 反応液調製
・ PCR反応
3. 電気泳動
染色



生物試料などより抽出したDNAをPCR用のpolymerase、dNTP、
primerなどと混合し、反応液を調製します。
その反応液をサーマルサイクラーにセットして、PCRを行います。
反応液中の増幅したDNAは、アガロース電気泳動などにより確認できます。

PCRの応用

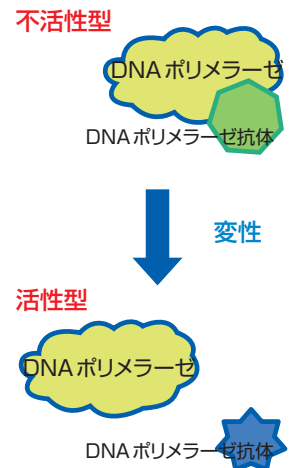
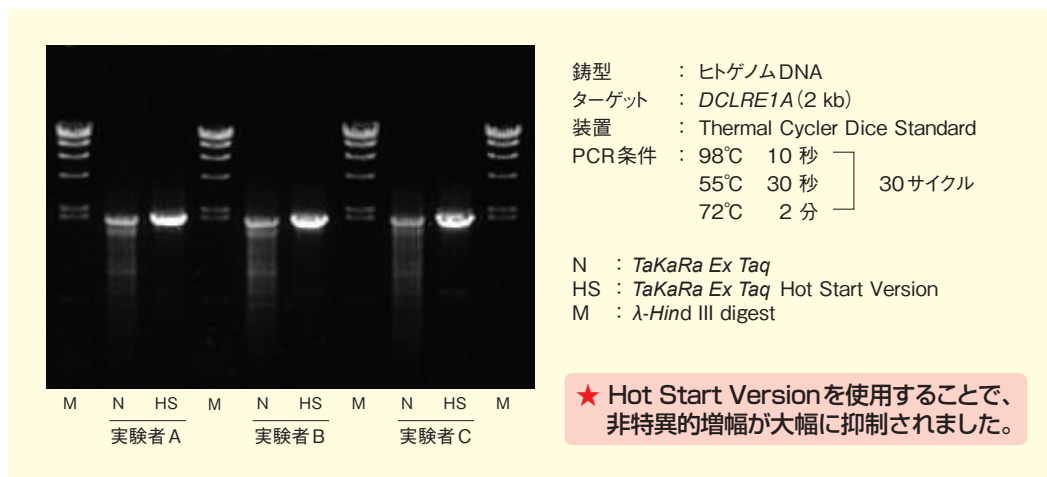
① Hot Start PCR

PCR反応液を調製後、DNAの変性のため温度を上げる必要がありますが、その途中の温度でプライマーが非特異的に鋳型のDNAに結合し、伸張反応が始まってしまうことがあります。このような伸張反応は、非特異的な増幅の原因になります。これを防ぐため、かつてはあらかじめ反応液を温めてから酵素などを添加する方法がとられていました(Hot Start)。現在は、化学修飾したPCR酵素や抗体を使用し、高温でPCR酵素を活性化させることで、より簡易にHot Startを実現しています。タカラバイオのHot Start Versionの酵素には、非特異的な増幅を強力に抑制する抗体が添加されており、再現性の高いPCRを実現しています。この抗体は最初の変性時に速やかに失活するため、長時間の活性化ステップは必要ありません*。

*MightyAmp DNA Polymerase Ver.3(製品コード R076A/B)は強力なホットスタート抗体を使用しているので、【98℃ 2分】の初期変性が必要です。

◆ ノーマル酵素とHot Start Version酵素の比較

3人の実験者がそれぞれ、*TaKaRa Ex Taq*および*TaKaRa Ex Taq* Hot Start Versionを使用して同じ条件でPCRを実施した。反応液の調製は室温で行った(各コンポーネントは氷上で調製した)。



② 2 step PCR(シャトルPCR)

PCRのアニーリング温度を高くすることで特異性を上げることができますが、PCRのアニーリング温度とextension温度を同じ温度で行うのが2step PCR(シャトルPCR)です。主に長鎖増幅に有効で反応時間も短縮できますが、長めのプライマーを作製する必要があります。

また同様に、特異性を上げるための方法としてタッチダウンPCRという手法も使われます。こちらは初期のサイクルでアニーリング温度を高く設定し、サイクルごとにアニーリング温度を下げて行く方法です。増幅する鋳型が少ない初期サイクル時に高いアニーリング温度にして、なるべく非特異的な増幅を抑えます。

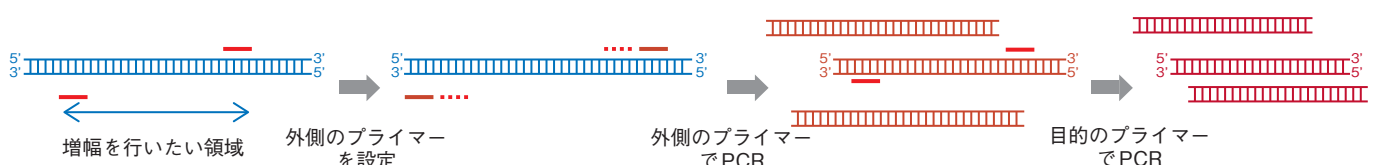
これらの方法は、増幅産物が得られない場合や複数断片が増幅される場合に有効です。

③ nested PCR

プライマーの位置が動かせないなどの理由で特定のプライマーを使う必要があるが、PCRで増幅しなかったり、複数断片が増幅される場合にはnested PCRが有効です。

目的プライマーの外側に別のプライマーを設定し、第一段階としてこの外側のプライマーで増幅した後、数の増えた鋳型に対して、目的プライマーで増幅します。特異性が大きく向上するほか、増幅量の改善が期待されます。

特定のプライマーで増幅したDNA断片が必要な場合に、特に有効な方法です。



PCRの利用例、応用例

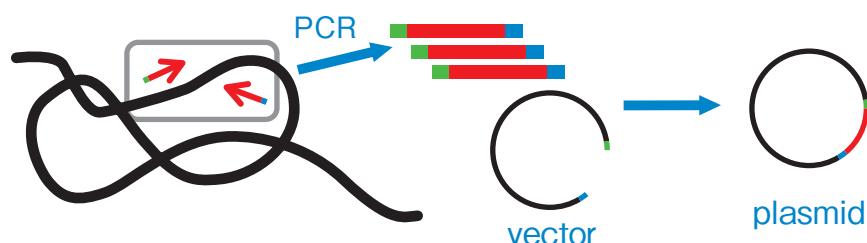
PCRを用いることで、特定の塩基配列情報に挟まれた領域を簡単に10万倍以上に増幅することができます。生物のDNA情報は非常に大きいので(ヒトの場合、 3×10^9)、特定の領域のDNAだけを増幅することができるPCRは種々の実験・検査などに必要不可欠の技術です。

遺伝子クローニング、プラスミド構築への利用

特定の遺伝子領域だけを増幅することができるPCRを利用して、目的遺伝子を増幅しプラスミドへ組み込む実験が昔から行われています。真核生物の遺伝子の場合も、mRNAの逆転写を行ったcDNAを鋳型にPCRを行うことで遺伝子をクローニングすることができます。

プライマーの3'端には増幅する対象と無関係の配列を付加することができるので、制限酵素認識部位などを付加することで増幅DNAの末端をベクターに組み込み易い形に加工することが可能です。このため発現プラスミドの構築、プラスミドの改変などが容易に行えます。また、In-Fusion Cloningシステムを使用することで、制限酵素認識配列も不要で、希望の位置に、自在に目的配列を導入することができます。

特定の変異を導入する際にもPCRは有用です。変異導入用のプライマーを使ったPCRにより、目的位置に容易に変異を導入することが可能です。



<クローニングに適したPCR酵素>

- ✓ 正確性が一番高い **PrimeSTAR® Max** (17ページ)
- ✓ 長鎖DNAの増幅に適した **PrimeSTAR® GXL** (15ページ) **がおすすめ!**
- ✓ GC比率が高くて成功率が高い **Tks Gflex™** (11ページ)

PCRを用いた変異導入

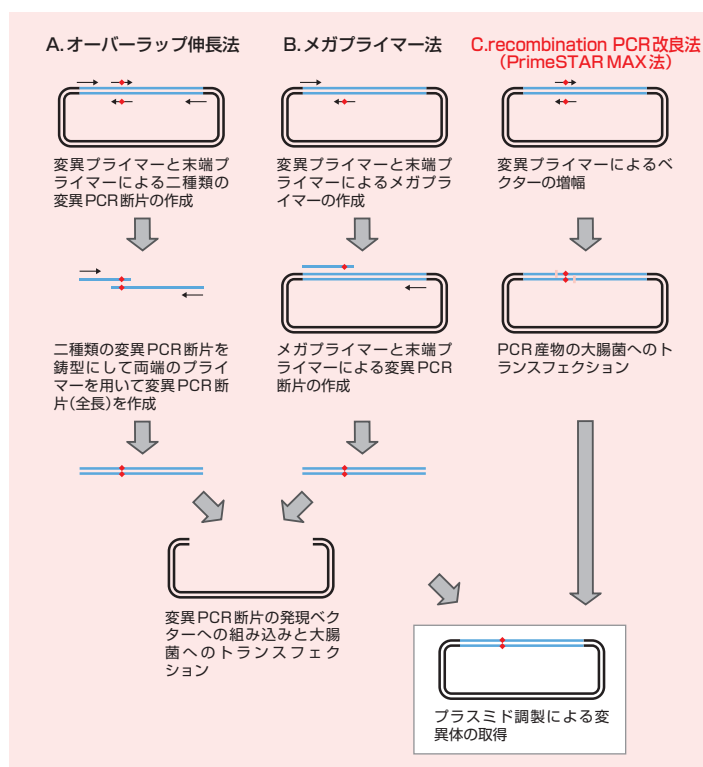
特定の位置に変異を導入する部位特異変異導入を、PCRを使用することで容易に行うことができます。

導入したい変異を含むプライマーを作製してPCRを行うことで、目的変異を導入したDNA断片を取得します。この断片をプラスミドに戻すことで、プラスミド中の特定の位置の塩基を変換することができます(A. オーバーラップ伸長法、B. メガプライマー法)。

PCRで変異導入を行う場合、別の位置に変異を入れないためには正確性の高い**PrimeSTAR® Max**が適しています。

PrimeSTAR MAXを使用することで、プラスミドを全長増幅しても、目的以外の変異が入ることはほとんどありません。

そこで、変異位置を含むプライマーを作製し、プラスミド増幅を行って大腸菌に導入するだけで、非常に簡単に特定の変異を含むプラスミドを作製することもできます(C. recombination PCR改良法)。

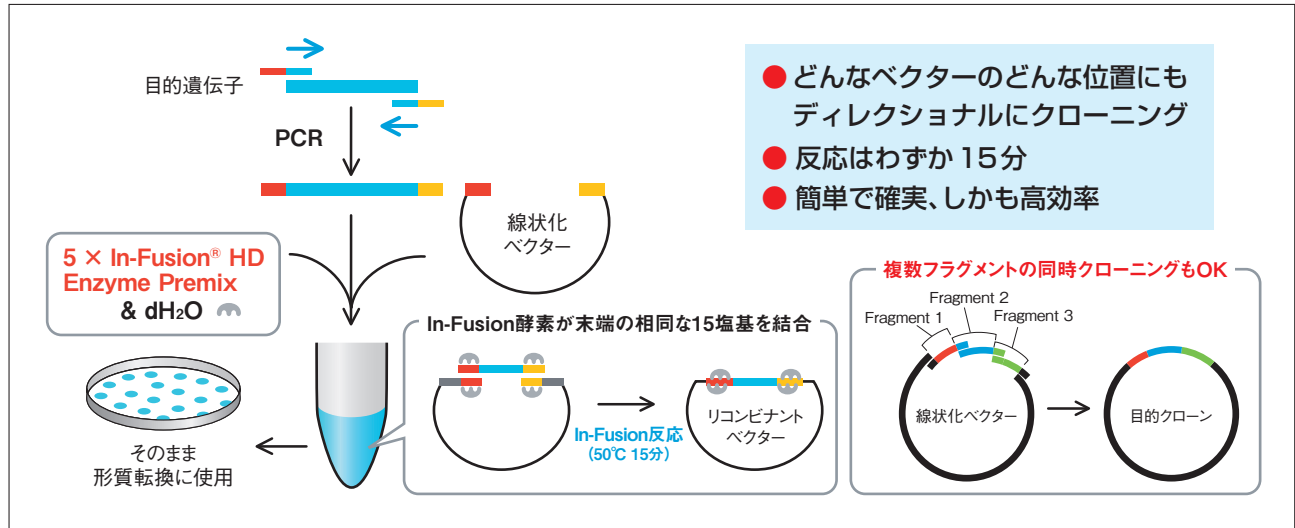


PCRの利用例、応用例

簡便・高効率なディレクショナルクローニングキット

In-Fusion® HD Cloning Kit (製品コード 639648 ほか)

正確性が非常に高いPrimeSTAR®シリーズと本製品を組み合わせることで、効率よくクローニングを行うことができます。特に高速PCRが可能なPrimeSTAR® Maxを使用すれば、大幅に反応時間を短縮でき、迅速なクローニングが可能です。「アプリケーション」に実験例をご紹介しますのでご参照ください(47ページ, 実験例4)。



★高正確性PCR酵素とコンピテントセルも含むオールインワнта입(Plus)や凍結乾燥タイプ(EcoDry™)もラインナップしています。

ラインナップや各製品の詳細については、弊社ウェブカタログをご覧ください。

また、ウェブサイトにはIn-Fusionクローニング用のプライマー設計ツール「In-Fusion Primer Design Tool」をはじめ、関連情報をまとめた便利な特設ページをご用意しています。ぜひご利用ください。

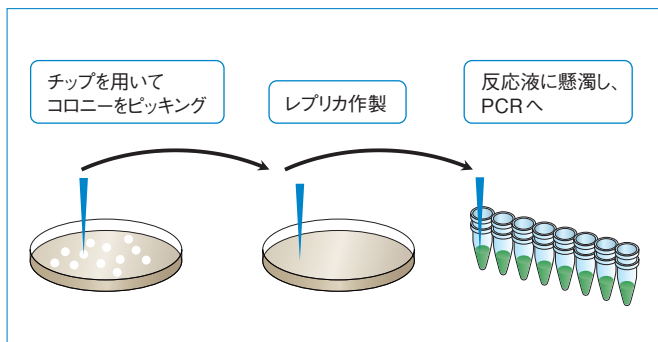
Online Tools for In-Fusion



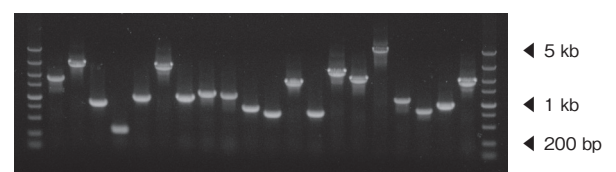
コロニーPCR

プラスミドの構築が成功しているかを、プラスミドを導入した大腸菌を直接PCRにかけて調べることも可能です。大腸菌の培養、プラスミド精製の前に正しい構造を持つプラスミドが導入されたコロニーを選別できるので、実験の迅速化に有効です。

コロニーPCRには、dye入りの**EmeraldAmp® MAX** (39ページ)がおすすめです。



マウス肝臓由来cDNAライブラリー(ベクターpUC19誘導体)で形質転換した大腸菌コロニーをランダムにピックアップし、EmeraldAmp MAX PCR Master Mix(製品コード RR320A)を用いて、ベクター上のプライマーでコロニーPCRを行い、インサートサイズを確認した。



調べた20コロニーすべてについて、0.2 kbから5 kbのインサートを確認できました。

PCRの利用例、応用例

塩基配列解析への利用

PCRを用いることで、特定の遺伝子領域だけを取り出して増幅することができます。この増幅産物を精製後、直接配列解析することも可能です。

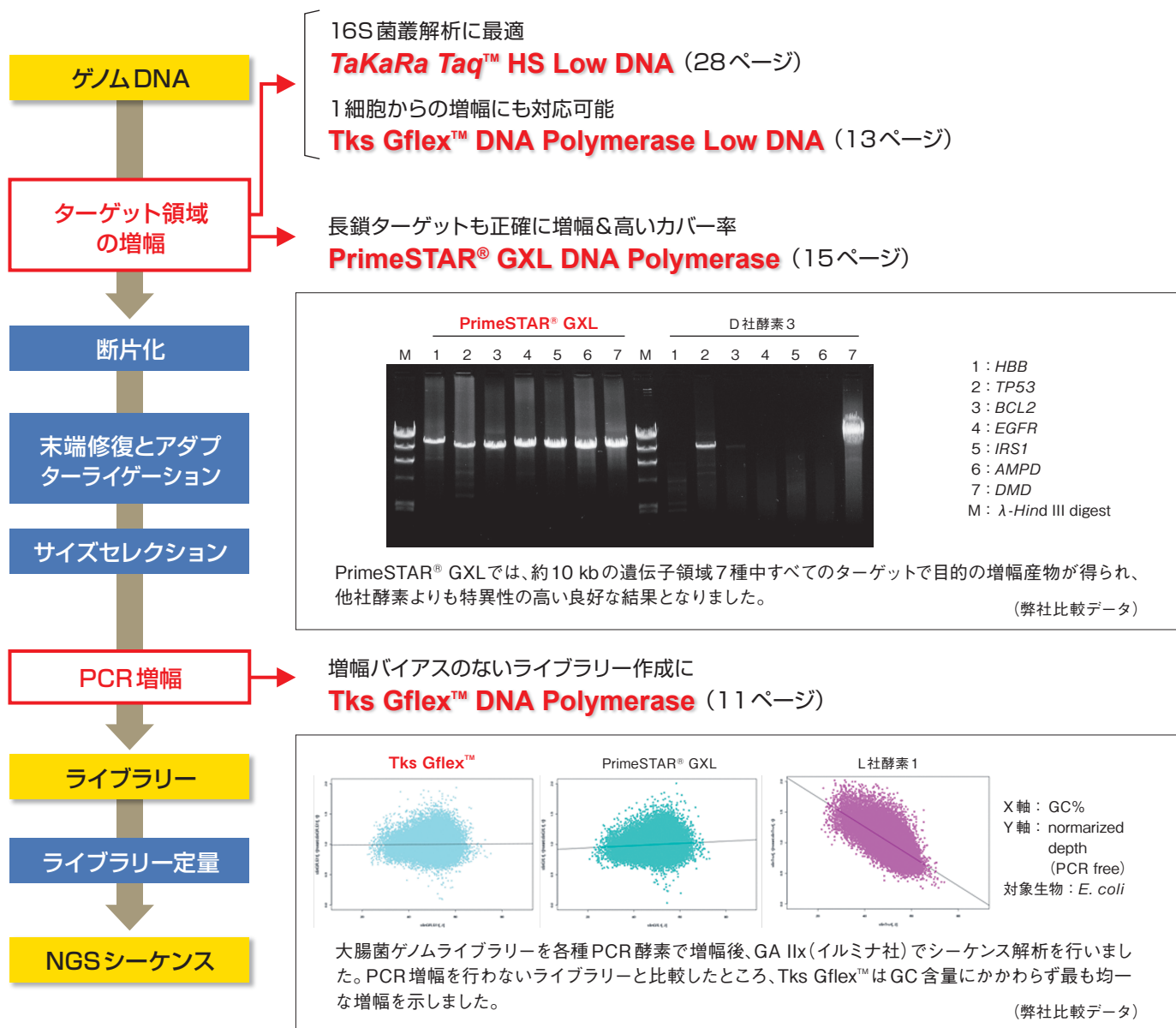
<PCR産物の直接配列解析に適したPCR酵素>

✓ 増幅効率の良い **TaKaRa Ex Taq[®]** (29ページ) がおすすめ!

次世代シーケンスへの利用

次世代シーケンス(NGS)にもPCRは重要な技術となっています。特定領域を増幅する Amplicon sequence やライブラリー増幅などにPCRが利用されています。長鎖増幅が可能な PrimeSTAR GXL、バイアスの少ない増幅が可能な Gflex、細菌由来のDNAの混入がない Low DNA の酵素が特に有効です。

<NGSの流れ>



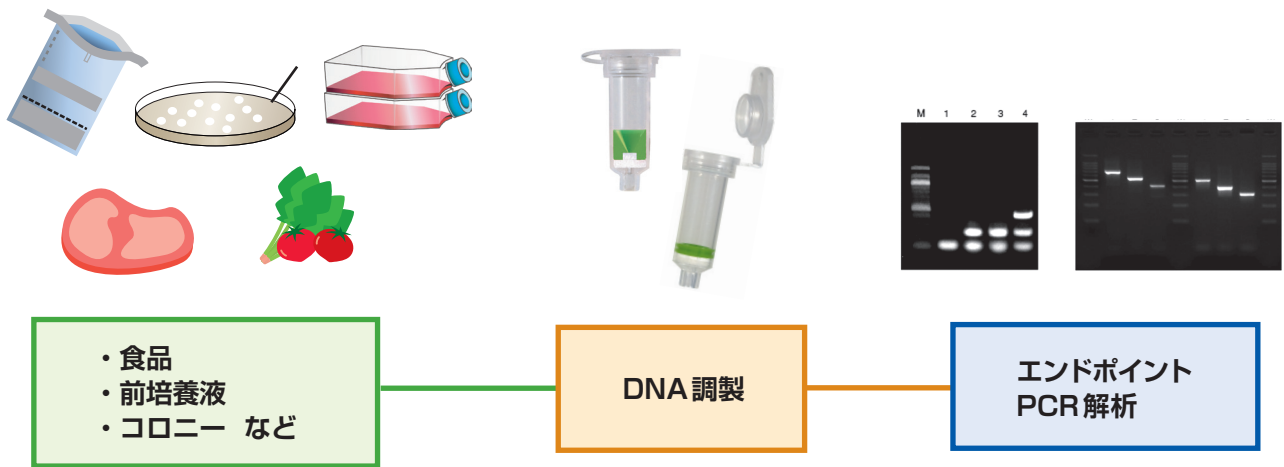
PCRの利用例、応用例

遺伝子検査、感染症検査、食品検査への利用

PCRで増幅できるということは、試料に鋳型となる特定の領域のDNAが含まれていることを示します。このことを利用して、試料内に対象となる遺伝子、病原菌、ウイルスなどが存在しているかを検査することができます。

このPCRによる検査は、生体飼料中のウイルス、病原菌体の検出、食品中の食中毒菌の検出、食品の原料の確認、GMO植物の混入の確認などに利用されています。従来の培養法や抗体による検査に比べて迅速性や感度で優れており、各分野で利用が広がっています。

検査フローのイメージ



※タカラバイオでは食品検査、感染症検査、遺伝子検査用のキットを販売しています。
各種検査キットの詳細は遺伝子検査キットカタログ、もしくは弊社ウェブサイトをご覧ください。

<検査用途に適したPCR酵素>

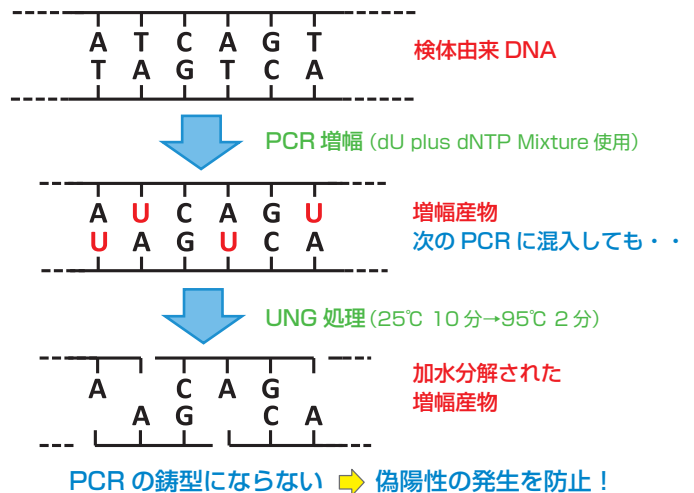
- ✓ 阻害物質耐性が高く、direct PCRも可能な **MightyAmp™** (21 ページ)
- ✓ 複数のDNA断片を増幅することができる **Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2** (36 ページ)
- ✓ 偽陽性防止機構を持つ **TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG plus** (35 ページ)

がおすすめ!

PCRキャリーオーバーによる偽陽性を防止

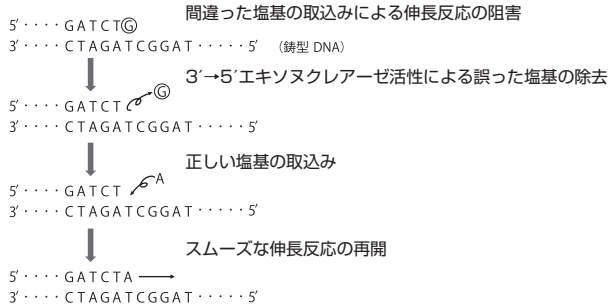
PCRは非常に高感度な検出方法であるため、以前に行ったPCR増幅産物のキャリーオーバーによる偽陽性が生じる場合があります。エンドポイントPCRにおいて、特に食品・環境検査など同じPCR反応を繰り返し行う場合に危険性が高く、結果に重大な影響を及ぼす恐れがあります。PCRをdTTPの代わりにdUTPを用いて行い、PCRを行う前に **Uracil-N-glycosylase (UNG; ウラシルを含むDNAを分解する酵素)** を作用させることで、以前の増幅産物が混入したとしても、それらは分解除去されるので鋳型にはなりません。

このような防止機構は **TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG plus** (35 ページ) で利用できます。



タカラバイオが誇るPCRテクノロジーのご紹介

■ LA PCRテクノロジー



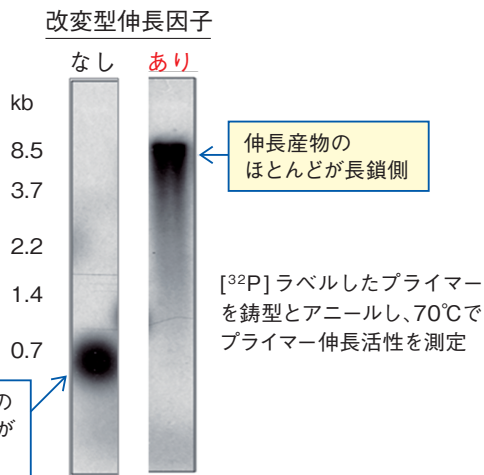
校正活性をもたないPol I型酵素(*Taq*ポリメラーゼ)は間違った塩基を取り込んだ際に取り除くことができません。

Pol I型酵素と3'→5'エキソヌクレアーゼ活性(校正活性)を有する α 型酵素をブレンドすることにより、Pol I型酵素が間違っ取り込んだ塩基を α 型酵素が瞬時に取り除き、DNA合成が再開されます。その結果、反応効率が増大し、長鎖増幅が可能となります。

【LA PCRテクノロジーを採用した代表的PCR酵素】

- *TaKaRa Ex Taq*[®] (29ページ)
- *TaKaRa LA Taq*[®] (31ページ)
- *EmeraldAmp*[®] MAX PCR Master Mix (39ページ)

■ 改変型伸長因子



タカラバイオは、超耐熱性古細菌のDNA複製マシン構成成分について特許を取得しています。

特に、F7と呼ばれる伸長因子は、酵素のProcessivityを飛躍的に増大させ、高速伸長反応を実現することが可能です。

*In vivo*で機能しているこの伸長因子を、PCR反応系で使用するよう改良した弊社独自の改変型伸長因子を採用することで、従来の α 型酵素では見られない優れた伸長性を持つ酵素が誕生しました。

【改変型伸長因子を採用した代表的PCR酵素】

- *Tks Gflex*[™] DNA Polymerase (11ページ)
- *PrimeSTAR*[®] GXL DNA Polymerase (15ページ)
- *PrimeSTAR*[®] Max DNA Polymerase (17ページ)

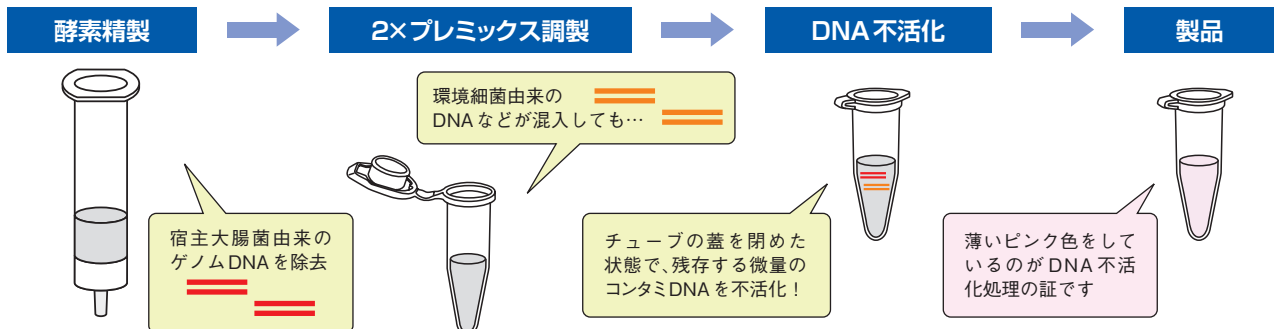
■ 独自の精製技術とDNA不活化技術

PCR酵素の性能が上がるにつれ、宿主大腸菌由来のDNAや環境由来DNAのPCR酵素へのわずかなコンタミネーションが、偽陽性やNo Template Controlでの増幅の原因となるケースが出てきています。特に、微量サンプルからの菌叢解析や1細胞からのPCRなど高精度解析を必要とする実験系では、バックグラウンドの出現は解析に大きな影響を与えます。

「より高純度、高感度のPCR酵素を！」というご要望にお応えするために開発されたのが「Low DNA」シリーズです。

【PCR酵素「Low DNA」シリーズ】

- *TaKaRa Taq*[™] HS Low DNA (28ページ)
- *Tks Gflex*[™] DNA Polymerase Low DNA (13ページ)



高い反応成功率！

様々な場面に対応可能なファーストチョイス酵素

Tks Gflex™ DNA Polymerase

他酵素では困難な難しいターゲット

独自の伸長因子と新成分の採用で
高速性と高特異性を両立！

GCリッチ or ATリッチ ターゲット

70%を超えるようなGCリッチ or ATリッチ
ターゲットなど、配列が偏っていてもOK！

幅広い鋳型量に対応

微量DNAの検出はもちろん、多量のcDNA
を持ち込んだ場合も確実に増幅！

クルードサンプル

PCR阻害物質を吸収する成分＆増幅増強成分
のバッファー系への添加で対応力アップ！

バイアスの少ないDNA増幅

配列によらず、複数の鋳型を同時に増幅。
NGS用ライブラリー増幅やメタゲノム解析に最適！

さらにプレミアムなLow DNA タイプも登場

Tks Gflex™ DNA Polymerase Low DNA

Tks Gflex™ DNA Polymerase

高成功率

難増幅配列

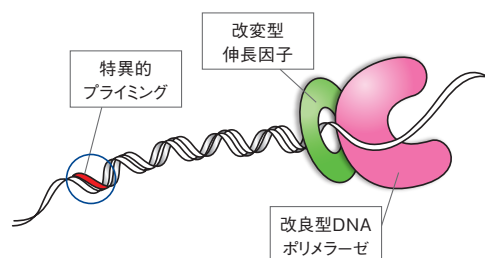
クルード対応

Tks Gflex™ DNA Polymeraseは、*Thermococcus* 属古細菌由来のDNA polymeraseをベースに、反応阻害の要因となる酵素の鋳型DNAに対する非特異的結合を抑制した改良型PCR酵素です。PrimeSTAR® シリーズでも採用している弊社独自の改変型伸長因子を上記の改良型酵素と組み合わせることで、優れた伸長性と反応スピードを持つ酵素となりました。さらに新規開発したプライミング特異性の向上物質(特許技術)を反応系に加えたことにより、幅広い核酸濃度のサンプルに対して極めて特異的な増幅を実現しています。クルードサンプル、GCリッチ・ATリッチ・長鎖などの難増幅配列からも特異的な増幅が可能となり、PCRの反応成功率が大幅にアップしました。

【増幅鎖長の目安】

λ DNA : ~40 kb

ヒトゲノムDNA : ~30 kb



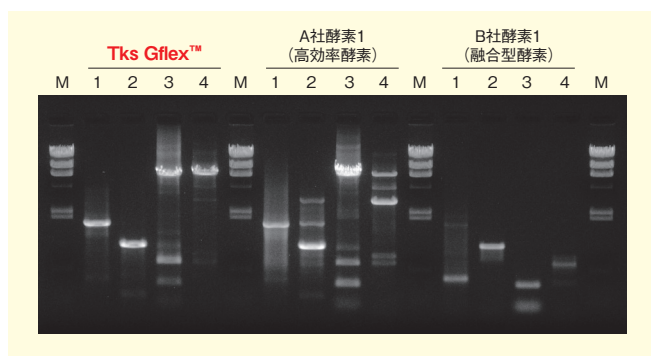
※プライミングとは・・・

DNA ポリメラーゼはプライマーの 3' 末端で酵素/DNA 複合体を形成し、鎖伸長を始めます。

この複合体形成が「プライミング」です。

■ 増幅困難なターゲットに対する反応性の比較

これまで増幅することが極めて困難であったターゲットに対する反応性を他社酵素と比較しました。Tks Gflex™ではいずれのターゲットについても目的の産物が増幅し、他社酵素よりも良好で特異性の高い増幅結果が得られました。



ターゲット： レーン1： Mouse *Sdf1a* 1.8 kb
2： *B. subtilis AprE* 1.1 kb
3： pRetroX-G1-Red 7.2 kb
4： pBeloBAC11 7.5 kb
M： λ-Hind III digest

反応液組成およびPCR条件；各酵素の推奨条件

Tks GflexのPCR条件：

1 & 2：

94℃ 1分

↓

98℃ 10秒

60℃ 15秒

68℃ 30秒/kb

30サイクル

3 & 4：

94℃ 1分

↓

98℃ 10秒

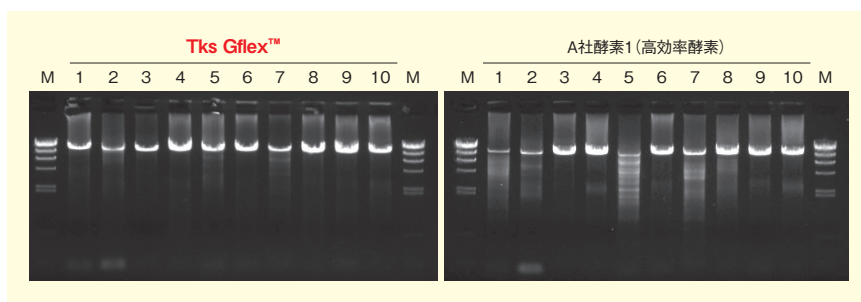
68℃ 30秒/kb

30サイクル

(弊社比較データ)

■ 増幅成功率の比較

ヒトゲノムDNAを鋳型として、各種ターゲットの遺伝子領域をカバーする約10 kbの領域を、各酵素の推奨条件で増幅し、その増幅成功率を確認しました。その結果、Tks Gflex™では10種中すべてのターゲットで目的の増幅産物が得られ、他社酵素よりも特異性の高い良好な結果となりました。



M：λ-Hind III digest

鋳型：ヒトゲノムDNA 100 ng/50 μl 反応系
ターゲット：

レーン 1：HBB 5：TFRC 9：AMPD
2：TGFB1 6：EGFR 10：DMD
3：TP53 7：FGFR
4：BCL2 8：IRS1

反応液組成およびPCR条件；各酵素の推奨条件

Tks GflexのPCR条件： 94℃ 1分

↓

98℃ 10秒

68℃ 5分

30サイクル

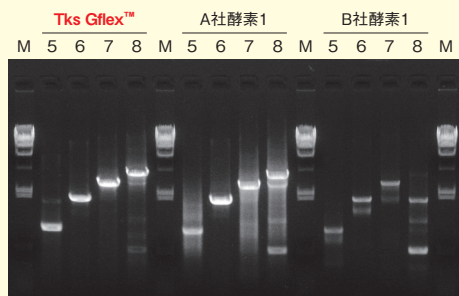
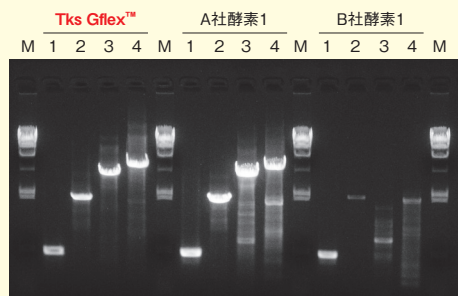
(弊社比較データ)

GCリッチまたはATリッチターゲットにおける反応性の比較

バッファー系に添加したプライミングの特異性を向上させる物質の効果により、極端なGCリッチまたはATリッチ領域など、非特異的な増幅が起きやすいターゲットに対しても優れた反応性を示し、よりバックグラウンドの少ない特異性の高い増幅が可能となりました。

【GCリッチターゲット】

【ATリッチターゲット】



鋳型；*Tth*ゲノムDNA

増幅領域；

- レーン1：0.5 kb (GC 72%)
 2：2 kb (GC 74%)
 3：4 kb (GC 73%)
 4：5 kb (GC 73%)

鋳型；ヒトゲノムDNA

増幅領域；

- レーン5：1 kb (AT 65%)
 6：2 kb (AT 64%)
 7：3 kb (AT 62%)
 8：4 kb (AT 60%)
 M： λ -Hind III digest

反応液組成およびPCR条件；各酵素の推奨条件

Tks GflexのPCR条件：

GCリッチ

94℃ 1分

↓

98℃ 10秒

68℃ 30秒/kb

30サイクル

ATリッチ

94℃ 1分

↓

98℃ 10秒

60℃ 15秒

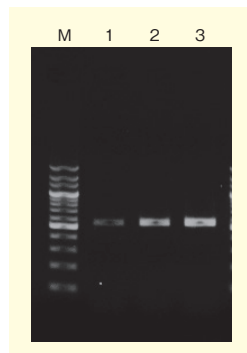
68℃ 30秒/kb

30サイクル

(弊社比較データ)

クルードサンプルからの増幅

(A) 動物組織ライセートからの増幅



サンプル；マウス尾 2 mm
 ターゲット；mouse *Raver2* (1.1 kb)
 鋳型量(ライセート量/25 μ l 反応液)；
 レーン1：0.4 μ l
 2：1.0 μ l
 3：2.5 μ l
 M：200 bp DNA Ladder

PCR条件(実験例 A、Bともに)；

94℃ 1分

↓

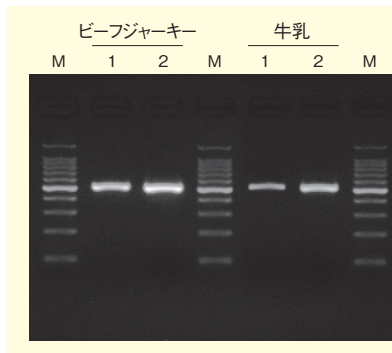
98℃ 10秒

60℃ 15秒

68℃ 1分/kb

30サイクル

(B) 加工食品ライセートからの増幅



サンプル；
 ビーフジャーキー 20 mm³
 牛乳 20 μ l

ターゲット；
 ウシミトコンドリアDNA *cox1*
 (0.5 kb)

鋳型量
 (ライセート量/20 μ l 反応液)；
 レーン1：0.4 μ l
 2：2.0 μ l
 M：100 bp DNA Ladder

【注】クルードサンプルの場合は、伸長時間を1分/kbに設定してください。

★ライセート調製には下記の製品をご利用ください。

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Lysis Buffer for PCR	20 ml (200回分)	9170A	¥16,500
MightyPrep reagent for DNA	20 ml	9182	¥14,500

【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Tks Gflex™ DNA Polymerase	250 U (200回*)	R060A	¥31,500
	1,000 U (800回*)	R060B (A×4)	¥101,000

※50 μ l 反応系の場合の反応回数です。

Tks Gflex™ DNA Polymerase (製品コード R060A)

Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 U/ μ l)

200 μ l

2× Gflex PCR Buffer (Mg²⁺, dNTP plus) *

1 ml × 5

* 2 mMのMg²⁺ (2×) と、各0.4 mMのdNTP (2×) を含む。

Tks Gflex™ DNA Polymerase Low DNA

Low DNAタイプ

特異的増幅

【増幅鎖長の目安】

λ DNA：～30 kb

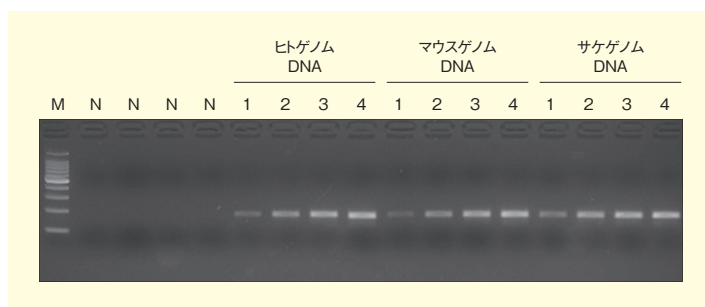
ヒトゲノムDNA：～20 kb

Tks Gflex™ DNA Polymerase Low DNAは、タカラバイオ独自の精製技術およびDNA不活化技術により、試薬に含まれる宿主大腸菌由来のDNAや環境から混入したDNAなどPCRで鋳型となりうるDNAを極限まで抑制した、プレミックスタイプのPCR酵素です。

PCR増幅の成功率が極めて高いTks Gflex™ DNA Polymeraseをベースに改良を加えることにより、ごく微量の鋳型から、バックグラウンドのほとんどない特異的な高感度増幅が可能となりました。

増幅困難な環境からのメタゲノムの増幅、1 cellからのPCR、PCRバイアスのないライブラリー増幅など、難易度が高く高精度な解析が求められるPCRに最適です。

■ 高感度で検出



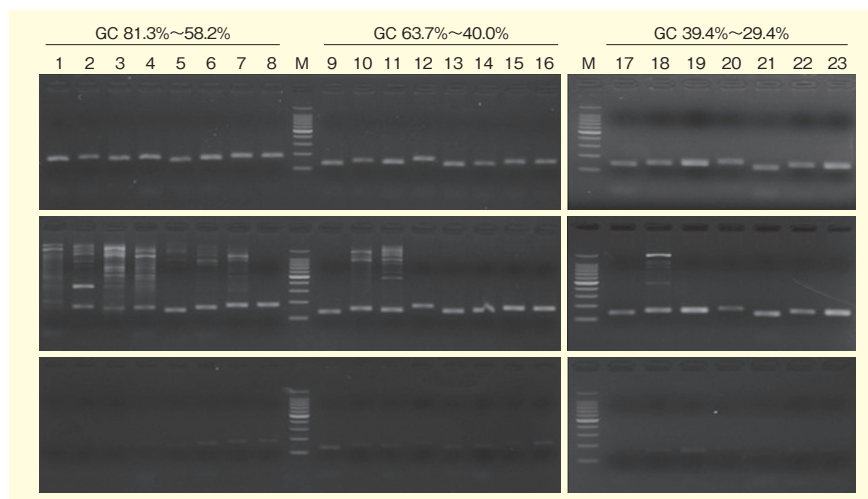
鋳型としてヒト、マウス、サケの各ゲノム DNA 1 cell 相当分を添加した場合においても、それぞれ良好な増幅結果が得られました。

一般的な PCR 酵素では増幅困難な場合が多い 1 cell PCR に対応可能であることが示唆されました。

ターゲット：18S rDNA 不変領域
増幅サイズ：179 bp
推奨条件 (3 step PCR) で反応

レーン N：No template
1：1 cell 相当分
2：10 cells 相当分
3：10² cells 相当分
4：10³ cells 相当分
M：100 bp DNA Ladder

■ 高い特異性と反応成功率

Tks Gflex™
DNA Polymerase
Low DNAK 社酵素 1
(高効率)H 社酵素 3
(Low DNA タイプ)

鋳型：ヒトゲノムDNA 2 ng/20 μl 反応系
ターゲット：23種類の遺伝子領域 (GC 含量 29.4~81.3%)
増幅サイズ：131~177 bp
各社推奨条件 (3 step PCR) で反応

M：100 bp DNA Ladder

Tks Gflex™ DNA Polymerase Low DNAでは、増幅が難しいATリッチやGCリッチな領域も含めたすべてのターゲットでシングルバンドの増幅産物が得られ、他社酵素よりも特異性の高い良好な結果となりました。

(弊社比較データ)

【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Tks Gflex™ DNA Polymerase Low DNA	100回 (20 μl 反応系)	R091A	¥24,000

Tks Gflex™ DNA Polymerase Low DNA (製品コード R091A)

Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA (2×) * 200 μl × 5
dH₂O for Low DNA 200 μl × 5

* 2 mMのMg²⁺ (2×)、各0.4 mMの
dNTP (2×) を含む。

「使いやすく」、「反応効率も良い」 高正確性PCR酵素

PrimeSTAR® シリーズ

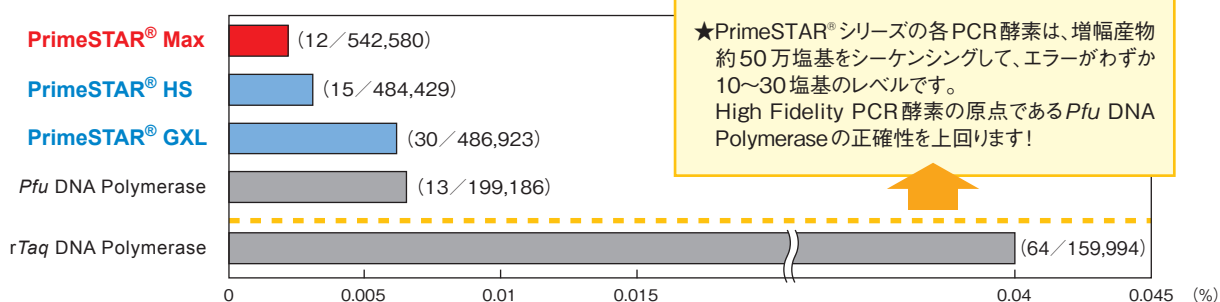
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase

PrimeSTAR® HS DNA Polymerase

PrimeSTAR® シリーズの基本的な特長

PrimeSTAR® シリーズと各種PCR酵素との正確性の比較



エラー率の算出方法：GCリッチで比較の変異の入りやすい*Tth*ゲノムDNAを鋳型として任意に選択した10種類の領域をPCR増幅後、それぞれ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を行い塩基配列を確認しました。

酵素	GC or ATリッチ配列の増幅	伸長スピード	ダイナミックレンジ	増幅鎖長の目安 (ヒトゲノムDNA)	PCR産物末端形状	Hot Start
PrimeSTAR® HS	★★★★	★★	★★	≤8.5 kb	平滑	○ (抗体を利用)
PrimeSTAR® Max	★★★★	★★★★★	★★★★★*	≤6 kb		
PrimeSTAR® GXL	★★★★★	★★★★★**	★★★★★	≤30 kb		

* 伸長時間を長めに設定 (1分/kb) することで持ち込み可能な鋳型量を増やすことができます。

** 酵素を2倍量使用することで10秒/kbの高速反応が可能です。

PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase

長鎖増幅

高い汎用性

高速反応も

PrimeSTAR® GXL DNA Polymeraseは、PrimeSTAR® HSに改良を加えることで反応阻害の要因となる酵素の鋳型DNAに対する非特異的結合を抑制し、さらに弊社独自の改変型伸長因子を組み合わせることで、これまでのHigh Fidelity PCR酵素では見られない優れた伸長性を持つ酵素となりました。

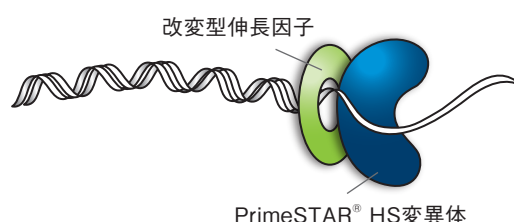
従来のHigh Fidelity PCR酵素では増幅が困難であったGCリッチなターゲットや、高濃度のcDNAからの低発現量の遺伝子検出などを容易に行うことができます。

酵素を2倍量使用するオプションプロトコルを用いることで伸長時間10秒/kbの高速反応も可能です。

【増幅鎖長の目安】

λ DNA : ~40 kb

ヒトゲノムDNA : ~30 kb

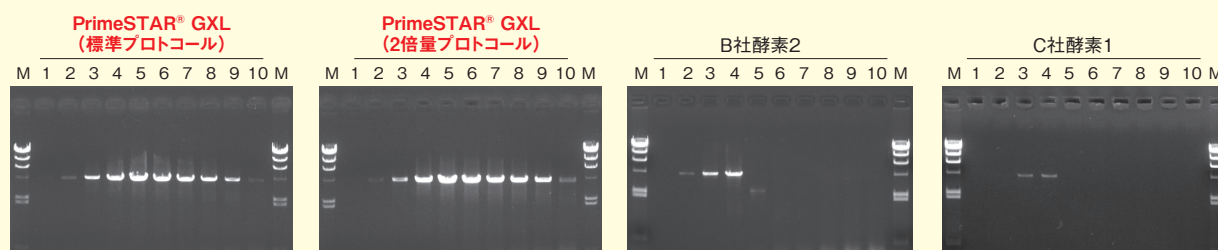


■ 増幅感度および鋳型量に対する許容性(他社酵素および2倍量プロトコルでの比較)

PCRクローニングを行う場合、配列の正確性が要求されるためHigh Fidelity PCR酵素がよく使用されます。しかし、一般的に High Fidelity PCR 酵素は反応液中の核酸量に影響を受けやすく、cDNAを鋳型とする増幅が比較的苦手です。

そこで、各社High Fidelity PCR 酵素に関して、cDNAを鋳型にした場合の鋳型量の許容性について比較しました。

それぞれの推奨条件で反応を行ったところ、他社酵素に比べ、PrimeSTAR® GXLでは鋳型cDNAの広い濃度範囲において良好な増幅が見られました。また、PrimeSTAR® GXLの2倍量プロトコルでは、10秒/kbの高速反応で幅広い鋳型量許容性が確認できました。



98°C 10秒
60°C 15秒
68°C 4分 } 30 サイクル

98°C 10秒
60°C 15秒
68°C 40秒 } 30 サイクル

98°C 30秒
↓
98°C 5秒
60°C 10秒
72°C 1分 } 30 サイクル
↓
72°C 5分

95°C 1分
↓
95°C 20秒
60°C 20秒
72°C 2分 } 30 サイクル
↓
72°C 3分

ターゲット ; *TFRC* 4 kb

鋳型 ; HL60細胞由来の total RNA から逆転写反応を行って調製した cDNA

鋳型量 ; cDNA (total RNA 相当値) / 50 μl 反応系

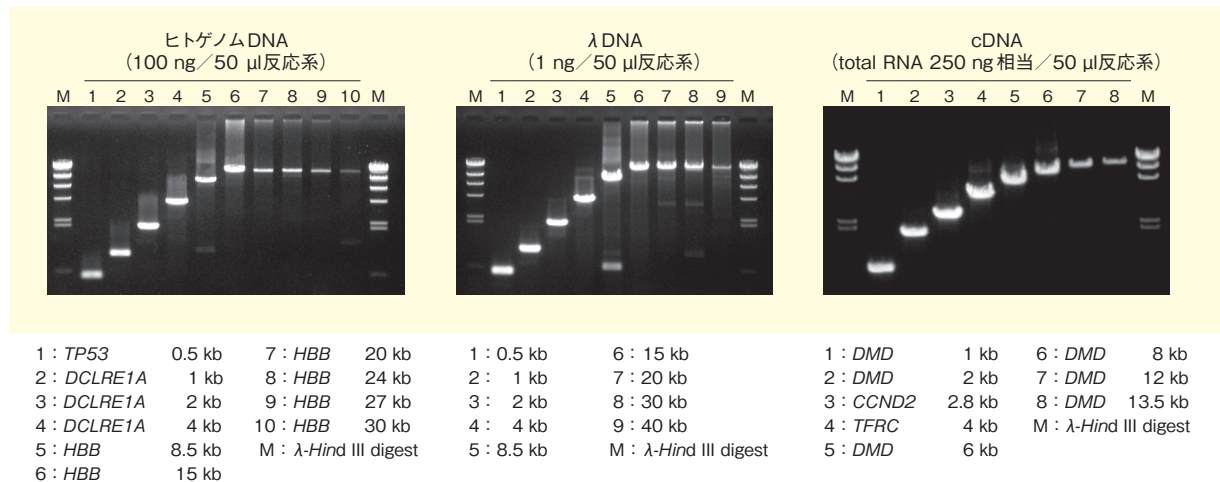
レーン 1 : 25 pg	4 : 25 ng	7 : 750 ng	10 : 2 μg
2 : 250 pg	5 : 250 ng	8 : 1 μg	M : λ-Hind III digest (250 ng/Lane)
3 : 2.5 ng	6 : 500 ng	9 : 1.5 μg	

(弊社比較データ)

■ 長鎖ターゲットの増幅

PCR酵素の性能評価として、どれだけ長鎖のターゲットを増幅できるかは重要な項目です。ここでは、PrimeSTAR® GXLの長鎖ターゲットに対する増幅性を各種鋳型DNAを用いて確認しました。

ヒトゲノムDNAを鋳型とした場合は30 kb、λ DNAでは40 kb、cDNAでは13.5 kbまでの増幅が認められ、様々なターゲットに対して非常に良好な伸長性を確認できました。

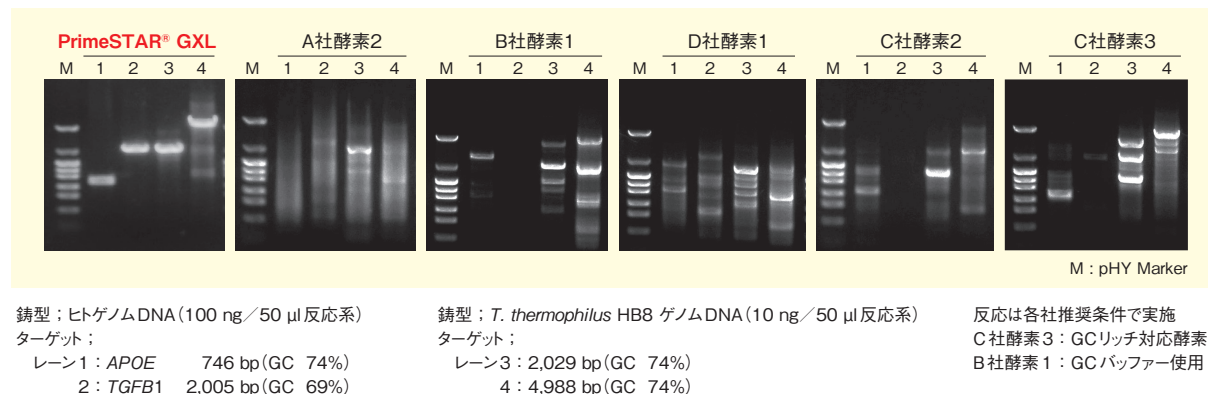


■ GCリッチなターゲットに対する反応性 (他社 High Fidelity PCR 酵素と比較)

ターゲットとなる遺伝子がGCリッチな配列である場合、PCR増幅が困難になることがよくあります。ここでは、各社PCR酵素を用いて、増幅困難なGCリッチ配列に対する反応性を比較しました。

ヒトゲノムDNAおよび *T. thermophilus* HB8 ゲノムDNAを鋳型として、増幅領域のGC含量が70%前後の4種類のGCリッチなターゲットについて、各酵素推奨の反応液組成およびPCR条件で増幅を行いました。

PrimeSTAR® GXLは様々なGCリッチターゲットを最も効率よく増幅し、かつ、高い反応特異性を示しました。



(弊社比較データ)

【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase	250 U	R050A	¥37,000
	1,000 U	R050B (A×4)	¥110,000
PrimeSTAR® GXL Premix	200 回	R051A	¥37,000
	800 回	R051B (A×4)	¥110,000

PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (製品コード R050A)

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (1.25 U/µl)	200 µl
5×PrimeSTAR GXL Buffer (5 mM Mg ²⁺ plus)	1 ml × 2
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	800 µl

最高レベルの正確性を提供

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase

最速

最高の正確性

簡便操作

PrimeSTAR® Max DNA Polymeraseは、世界最速レベルの伸長性と最高レベルの非常に高い正確性を兼ね備えたPCR酵素です。酵素自体が有する高いプライミング効率と独自の伸長因子の添加により、アニーリング時間と伸長時間を大幅に短縮し、PCRの驚異的なハイスピード化を実現しています。また、PrimeSTAR® シリーズの中でも最も高い正確性を誇ります。

反応コンポーネントをプレミックス化したことで、常温での迅速な反応液調製が可能です。

【増幅鎖長の目安】

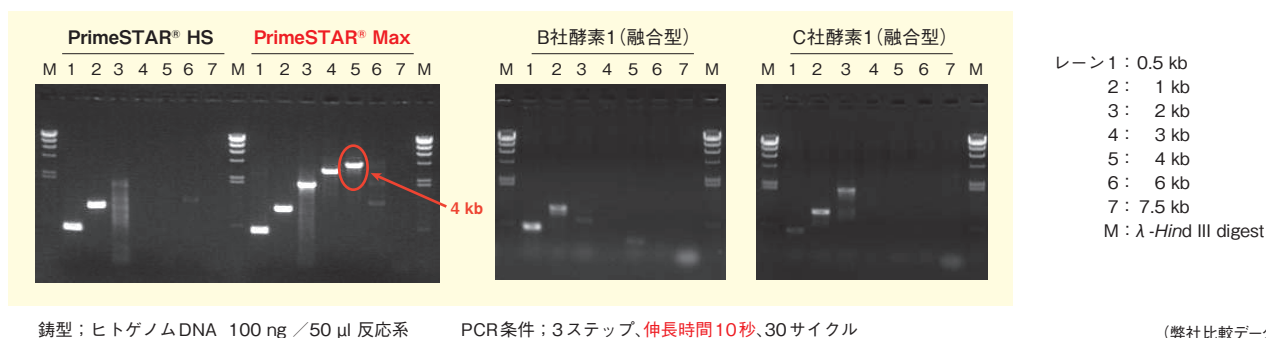
λ DNA : ~15 kb

ヒトゲノムDNA : ~6 kb

■ 高速反応における増幅効率

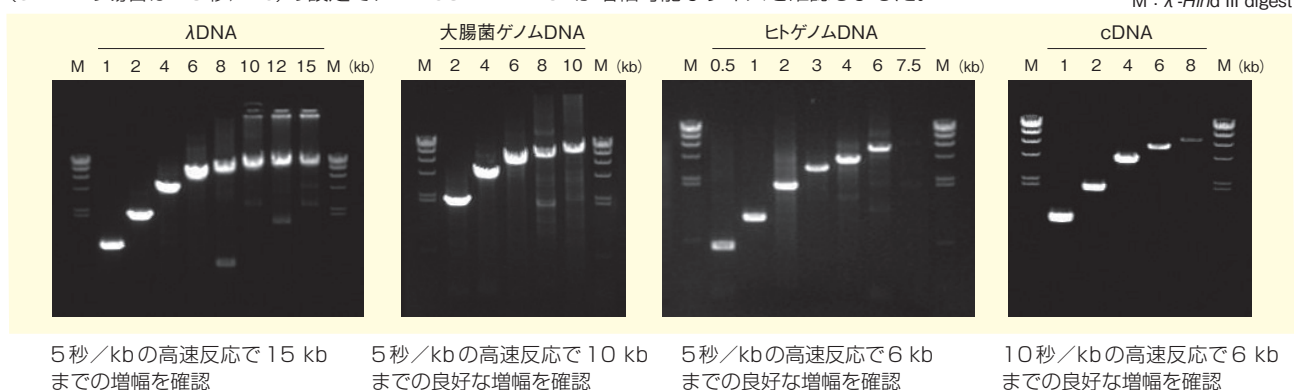
各社高正確性PCR酵素を用いて、高速反応における増幅効率を比較しました。

ヒトゲノムDNAを鋳型に高速反応(伸長時間10秒)で増幅を行い、0.5~7.5 kbでの増幅を比較した結果、PrimeSTAR® Maxは他社酵素に比べて優れた増幅性を示し、4 kbまで良好な増幅が確認できました。



■ 様々な鋳型に対する増幅可能なサイズ(高速反応)

λ DNA、大腸菌ゲノムDNA、ヒトゲノムDNAおよびcDNAを鋳型として、アニーリング時間5秒もしくは15秒、伸長時間5秒/kb(cDNAの場合は10秒/kb)の設定で、PrimeSTAR® Maxが増幅可能なサイズを確認しました。



【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase	100回(50 μl 反応系)	R045A	¥31,500
	400回(50 μl 反応系)	R045B(A×4)	¥101,000

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (製品コード R045A)

PrimeSTAR Max Premix(2×) * 625 μl × 4

* 2 mMのMg²⁺(2×)と各0.4 mMのdNTP(2×)を含む。

PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit

変異導入

PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kitは、最高の正確性を持つPCR酵素 PrimeSTAR® Max DNA Polymeraseによる極めて正確でスピーディーな増幅に基づく新しい変異導入システムです。鋳型であるターゲット領域を含むプラスミドDNAと変異導入用プライマーを用いてPrimeSTAR® Maxで増幅したPCR産物を、そのまま直接大腸菌に形質転換するだけで変異導入プラスミドを高い効率で取得できます。PrimeSTAR® Maxの有する世界最高の伸長速度(5秒/kb)と抜群の正確性により、長鎖のプラスミドでも極めて短時間に増幅でき、目的の変異導入部位以外にPCRによるエラーが入ることはほとんどありません。

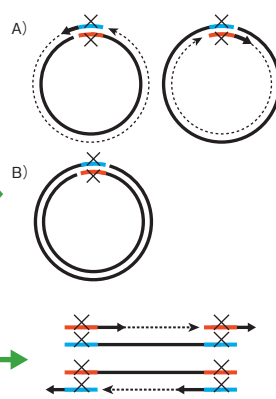
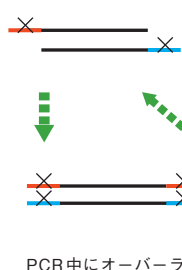
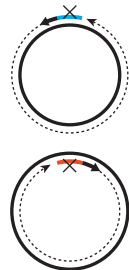
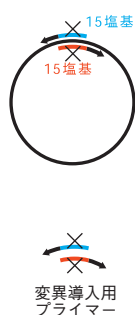
■ PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kitによる変異導入の原理

プラスミドを鋳型に5'側が15塩基オーバーラップした変異導入用プライマーを用いて外向きにPCR増幅を行うことで、オーバーラップ部分が5'突出したPCR産物が得られます。この増幅産物は形質転換可能な環状構造をとることができるので、大腸菌を形質転換することで、目的とする変異プラスミドを持つ大腸菌を得ることができます。

5'側が15塩基オーバーラップした変異導入用プライマーを用いて、PrimeSTAR MaxでPCRを行う。

PrimeSTAR Maxはディスプレースメント活性ならびに5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を持たないので、伸長はオーバーラップ部分の手前でストップする。

オーバーラップ部分が5'突出した増幅産物が生じる。



A) 一方のプライマーからの伸長鎖に対して、もう一方のプライマーがその伸長鎖の5'側と3'側にまたがってアニールし、伸長することにより、形質転換可能な環状構造となる。

B) 3'側のオーバーラップ部分を欠いた伸長鎖同士がアニールした分子が、5'突出を介して環状構造となる。

A)、B)ともに、そのまま大腸菌の形質転換が可能！

PCR中にオーバーラップ部分を埋めた2本鎖が生じた場合、次のサイクルでは両端のオーバーラップ部分にプライマーが貼り付くため、伸長鎖がオーバーラップ部分の手前でストップする。

■ PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kitによる変異導入の効率

pUC118 DNA 10 pgを鋳型に、変異導入用プライマーとPrimeSTAR® Maxを用いてPCR(50 µl反応系)を行った。PCR反応液 2 µlを *E. coli* JM109 コンピテントセル(3×10^8 cfu/µg pUC118) 100 µlに添加し、0°C 30分、42°C 45秒の処理後、SOC培地 1 mlを加えて37°Cで1時間振とう培養した。そのうち100 µlを選択プレート(LB+Amp、IPTG、X-gal)上で培養し、白コロニー(変異体)と青コロニー(バックグラウンド)をカウントした。

また、白コロニー由来の117個のプラスミドの全長の塩基配列解析を行ったところ、目的以外の変異は全370,656塩基中わずか4塩基のみであった。

変異のタイプ	白コロニー	青コロニー	変異導入効率
置換(3塩基)	1,948	6	99.69%
欠失(3塩基)	2,024	1	99.95%
挿入(6塩基)	1,280	2	99.84%

【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit	25回	R046A	¥20,000

PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit (製品コード R046A)

PrimeSTAR Max Premix (2×)	625 µl	Control Primer R (20 pmol/µl) *	10 µl
Control template (pUC118 DNA : 50 ng/µl) *	10 µl	Xho I *	10 µl
Control Primer F (20 pmol/µl) *	10 µl	10×Xho I buffer *	10 µl

* 6塩基挿入変異のコントロール実験(10回分)と結果の確認(10クローン分)を行うことができる。

PrimeSTAR® HS DNA Polymerase

抜群の校正力

高いプライミング効率

PrimeSTAR® HS DNA Polymeraseは、抜群の正確性と*rTaq*以上の増幅効率を併せ持つHigh Fidelity PCR 酵素です。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たHot Start PCR 酵素であり、より高感度に特異性の高いPCRを行うことができます。

【増幅鎖長の目安】

λ DNA : ~28 kb

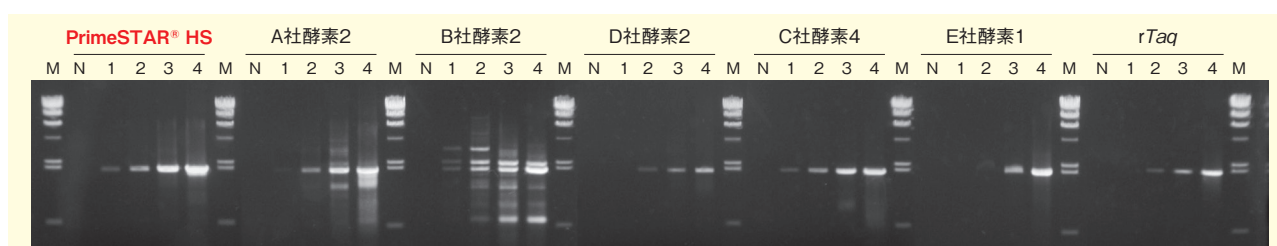
ヒトゲノム DNA : ~8.5 kb

※プライミング効率とは・・・

DNAポリメラーゼはプライマーの3'末端で酵素/DNA複合体を形成し、鎖伸長を始めます。これをプライミングと言います。PrimeSTAR®シリーズの酵素はいずれも高いプライミング効率を有しているため、5~15秒の短時間のアニーリング時間設定で特異性の高い増幅が実現します。

■ PrimeSTAR® HS と各社High Fidelity PCR 酵素の増幅効率の比較

ヒトゲノムDNAを鋳型として、PrimeSTAR® HSと各社高正確性PCR 酵素、並びに*rTaq*をそれぞれ推奨条件で用いて増幅効率を比較しました。PrimeSTAR® HSは、他のHigh Fidelity PCR 酵素と比べ、鋳型量が少ない場合でも効率よく増幅できました。



鋳型：ヒトゲノムDNA

ターゲット：DCLRE1A 2 kb

反応液組成およびPCR条件：各酵素の推奨条件

PrimeSTAR HSのPCR条件：98℃ 10秒
55℃ 5秒
72℃ 2分 } 30サイクル

鋳型量 (50 μl 反応系)：

レーンN：Negative Control (鋳型なし)

1：100 pg

2：1 ng

3：10 ng

4：100 ng

M：λ-Hind III digest

(弊社比較データ)

■ PrimeSTAR® HSを用いて様々な長さのターゲットを同一条件で増幅

PrimeSTAR® HSを用いて、同一PCR条件での様々な鎖長のターゲットの増幅を試みたところ、0.5~8.5 kbのターゲットをいずれも効率よく増幅できました。

PCR条件：98℃ 10秒
68℃ 8分 } 30サイクル

鋳型：ヒトゲノムDNA
100 ng/50 μl反応系

レーン1：DCLRE1A

4 kb

2：HBB

8.5 kb

3：HBB

6 kb

4：DCLRE1A

1 kb

5：TP53

0.5 kb

6：TP53

4 kb

7：HBB

7.5 kb

8：DCLRE1A

8 kb

9：DCLRE1A

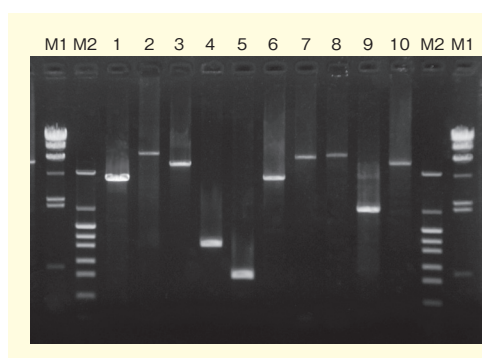
2 kb

10：TP53

6 kb

M1：λ-Hind III digest

M2：pHY Marker



【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase	250 U	R010A	¥31,500
	1,000 U	R010B(A×4)	¥101,000
PrimeSTAR® HS (Premix)	100回 (50 μl 反応系)	R040A	¥23,000

PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (製品コード R010A)

PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/μl) 100 μl
5×PrimeSTAR Buffer (5 mM Mg²⁺ plus) 1 ml × 2
dNTP Mixture (各 2.5 mM) 800 μl

PrimeSTAR® HS (Premix) (製品コード R040A)

2×のプレミックス試薬です。
2 mMのMg²⁺ (2×) と各 0.4 mMのdNTP (2×) を含む。

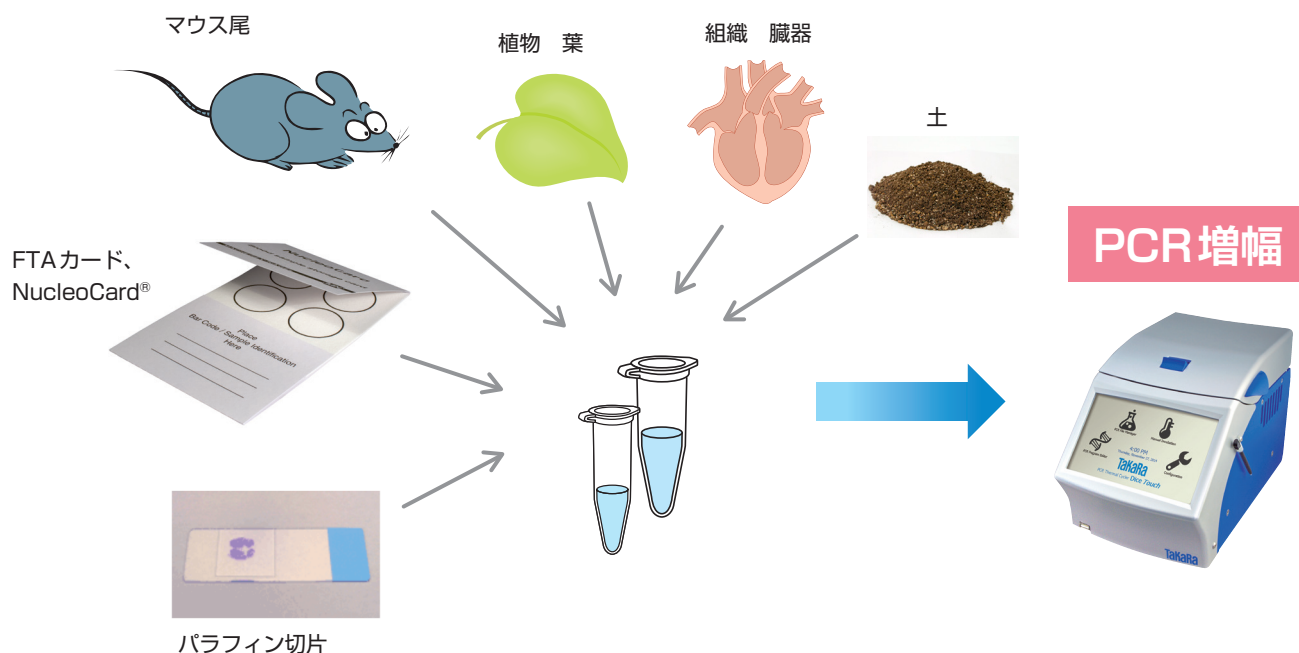
サンプル調製に手を掛けずにPCR！

MightyAmp™ シリーズ

MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3

MightyAmp™ Genotyping Kit

様々なサンプルから



MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3

ダイレクトPCR

クルードサンプル

【増幅鎖長の目安】

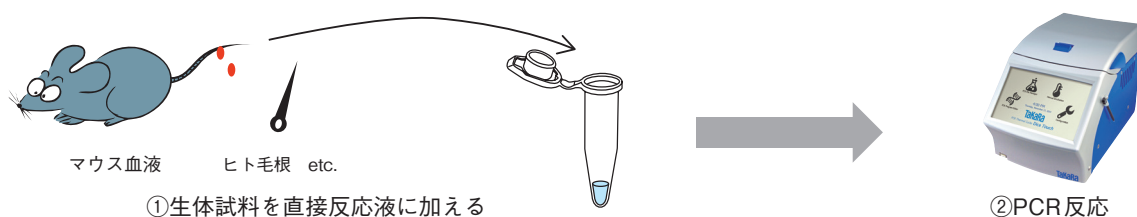
ダイレクトPCR：～2 kb

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GCリッチ、ATリッチを問わず、広範囲なターゲットに対して良好な反応性を示します。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増幅の特異性をアップさせることも可能です。

Ver.3では、MightyAmp™ DNA Polymeraseを改良したPCR酵素と新組成の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。

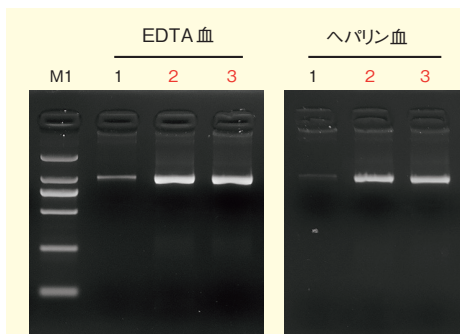
なお、本酵素は98℃までポリメラーゼ活性を抑制する強力なモノクローナル抗体を用いたホットスタートPCR用酵素です。

ダイレクトPCR操作の流れ



★DNA抽出が不要なため、簡便・迅速なアッセイが可能

ヒト血液からのダイレクトPCR

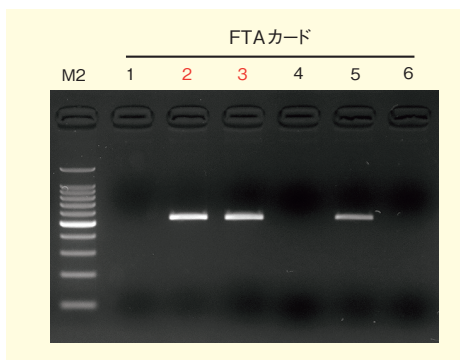


ヒトEDTA血液およびヘパリン血液5 μlを使用してMightyAmp™ DNA Polymerase Ver.2とMightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3を用いて、*DCLRE1A*遺伝子(1 kb)を対象に25 μlの反応系でダイレクトPCRを行いました。

Ver.3の方がより良好な増幅を示しました。

M1 : DL2,000 DNA Marker
1 : MightyAmp Ver.2(従来製品)
2 : MightyAmp Ver.3 Additive (-)
3 : MightyAmp Ver.3 Additive (+)

FTAカードにスポットしたマウス血液からのダイレクトPCR



マウス血液をスポットしたFTAカードよりカットした直径1.2 mmのパンチを各種酵素を用いて、*Hbb-b1*遺伝子(542 bp)を対象に25 μlの反応系でダイレクトPCRを行いました。

試した酵素の中で、MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3が最も良好な増幅を示しました。

M2 : 100 bp DNA Ladder
1 : MightyAmp Ver.2(従来製品)
2 : MightyAmp Ver.3 Additive (-)
3 : MightyAmp Ver.3 Additive (+)
4 : 弊社Taq系酵素
5 : A社高成功率酵素
6 : K社阻害物質耐性酵素

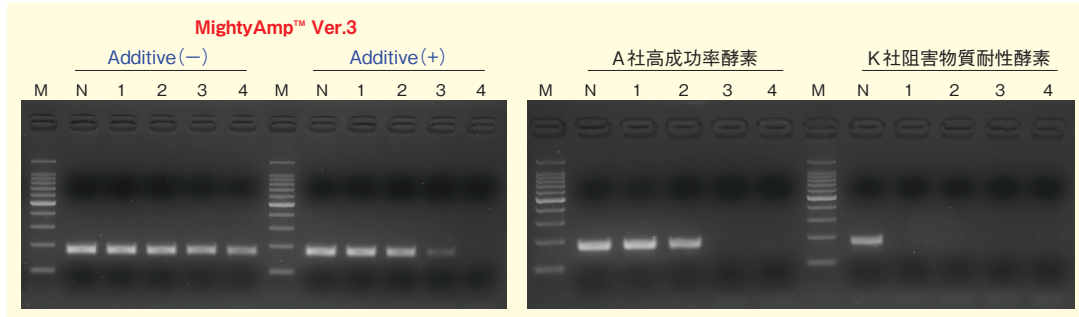
(弊社比較データ)

■ 高濃度フミン酸存在下でのPCR

土壌中に存在しているフミン酸(腐食酸)は、PCR反応を強力に阻害することが知られています。このフミン酸の存在下でPCRが可能かを検討しました。

大腸菌ゲノムDNA(2×10^5 copy相当)を鋳型とし、16S rDNA領域 173 bpをフミン酸存在下で増幅しました。

MightyAmp™ Ver.3は、高濃度フミン酸の存在下でも影響を抑えてPCRによる増幅が可能でした。



レーン N: フミン酸 添加なし
 1: 0.1 µg / 25 µl
 2: 0.2 µg / 25 µl
 3: 0.3 µg / 25 µl
 4: 0.4 µg / 25 µl
 M: 100 bp DNA Ladder

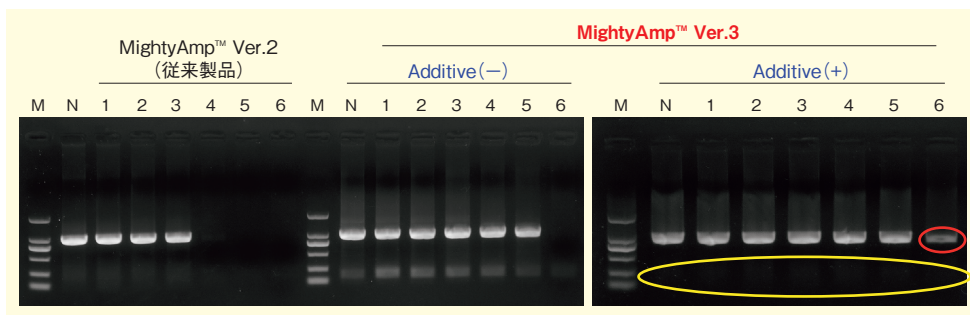
(弊社比較データ)

MightyAmp™ Ver.3では、フミン酸の他にもリボ多糖を多く含む系、ポリフェノールやカテキンを多く含む系、メラニンやインディゴなどの色素成分を含む系でも既存酵素に比べて良好な結果が得られることを確認しています。

■ 10×Additive for High Specificityの効果(タンニン酸存在下でのPCR)

MightyAmp™ Ver.3に含まれる10×Additive for High Specificityを反応系に添加することで、非特異的な増幅産物やスミアが見られる系で特異性を向上させることが可能です。

ヒトゲノムDNA(100 ng)を鋳型とし、*DCLRE1A*遺伝子(1 kb)を対象に25 µl反応系でPCR阻害を引き起こすタンニン酸を添加してPCRを行いました。10×Additive for High Specificityを加えることで、プライマーダイマーのバンドが減少したほか、阻害物質耐性の向上も確認できました。



レーン N: タンニン酸 添加なし
 1: 1 ng / µl
 2: 5 ng / µl
 3: 10 ng / µl
 4: 50 ng / µl
 5: 100 ng / µl
 6: 250 ng / µl
 M: DL2,000 DNA Marker

非特異的な増幅産物やスミアが見られる系では、10×Additive for High Specificityの添加で特異性の向上が期待できます。また特異性向上に伴い、感度や阻害物質耐性が改善されることがあります。

【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3	250 U	R076A	¥34,000
	1,000 U	R076B (A×4)	¥108,000

MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 (製品コード R076A)

MightyAmp DNA Polymerase Ver.3 (1.25 U/µl) 200 µl
 2×MightyAmp Buffer Ver.3 (Mg²⁺, dNTP plus) * 1 ml×5
 10×Additive for High Specificity 500 µl×2
 * Mg²⁺濃度は4 mM (2×)、dNTP濃度は600 µM each (2×)

MightyAmp™ Genotyping Kit

タイピング

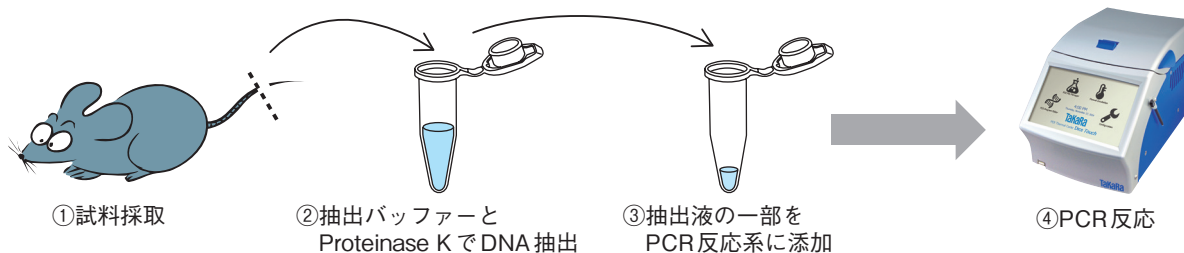
クールドサンプル

【増幅鎖長の目安】
粗抽出液から：～2 kb

MightyAmp™ Genotyping Kitは、マウス尾などの動物組織や植物組織から簡便にDNAを抽出してPCR増幅を行うための製品です。専用抽出バッファーとProteinase Kにより、動植物組織等から直接DNA抽出が可能です。さらに、電気泳動の乱れの原因となる夾雑物の影響を軽減する専用Loading Dyeを添付しています。

短時間での良好な検出が可能となり、遺伝子型判定にも最適です。

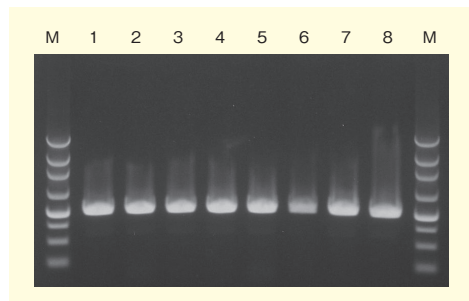
操作の流れ



★得られたDNA抽出液を用いて、複数のアッセイを行うことが可能
→ 再解析や別プライマーによる多部位のタイピングも容易

■ マウス尾からのDNA抽出&PCR増幅

8匹のマウス尾の先端それぞれ約1 mmから、製品添付のExtraction BufferとProteinase Kを用いてDNAを抽出し、遠心後の上清2.5 μlを鋳型として50 μl反応系に添加し、MightyAmp™によるPCR増幅を行いました。すべてのマウス尾の試料から、ターゲットの良好な増幅を確認できました。



ターゲット：
レーン 1～8：Ywhaz 約1 kb
M：250 bp DNA Ladder

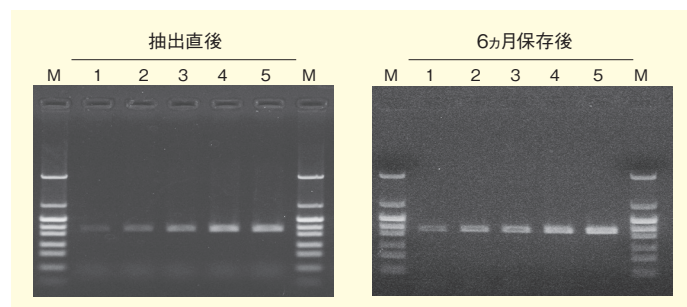
反応液4 μlに添付のLoading Dyeを加えてアプライ

PCR条件：
98℃ 2分
↓
98℃ 10秒
60℃ 15秒
68℃ 1分
40サイクル

■ 抽出液の凍結保存の影響

マウス尾の先端1.5 mmから、製品添付のExtraction BufferとProteinase Kを用いてDNA抽出を行い、抽出液（上清）を-20℃で6ヵ月間凍結保存しました。融解して室温に戻した抽出液をそれぞれ20 μl PCR反応系に添加して、マウスYwhaz遺伝子のPCR増幅（約1 kb）を行いました。

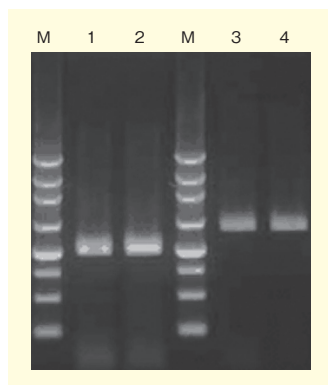
凍結保存した抽出液を用いた場合も目的遺伝子を良好に増幅できました。



ターゲット：Ywhaz 約1 kb
鋳型（抽出液）量／20 μl 反応系：
レーン 1：0.1 μl
2：0.2 μl
3：0.4 μl
4：0.8 μl
5：2.0 μl
M：pHY マーカー

■ 植物葉や米粒からのPCR増幅

直径2 mmのパンチでカットしたトマト葉および精米1粒から、製品説明書の操作方法に従ってDNAを抽出しました。遠心後の上清の一部を50 µl PCR反応系に添加し、トマト *cox1* 遺伝子、コメ *rbcL* 遺伝子のPCR増幅を行いました。いずれも良好な増幅を確認できました。



鋳型(抽出液)量:

奇数レーン: 1 µl

偶数レーン: 2 µl

組織試料とターゲット:

レーン1, 2: トマト葉片 (φ2 mm)

cox1 (約1 kb)

3, 4: 精米粒 (1粒)

rbcL (約1.3 kb)

M: 250 bp DNA Ladder

PCR条件:

98°C 2分

↓

98°C 10秒

60°C 15秒

68°C 1分

40サイクル

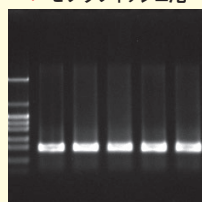
■ 各種生体組織、加工食品からのPCR増幅

さまざまなサンプル 1~50 mg 相当から、製品添付のExtraction BufferとProteinase Kを用いてDNAを抽出し、遠心後の上清2.5 µlを鋳型として50 µl反応系に添加し、MightyAmp™によるPCR増幅を行いました。

例示したものを始め、下記リストのすべてのサンプルからターゲット遺伝子を良好に増幅できました。

動物組織	植物組織	加工食品ほか
ヒト 爪、毛髪、血液	トマト 葉片、果実	ブタ 乾燥肉、ハム、ソーセージ
マウス 尾、耳、臓器、糞便	シロイヌナズナ 葉片	ビーフジャーキー*、牛乳
ゼブラフィッシュ 尾*	トウモロコシ 葉片、粗挽き粉*	ヒツジ ひき肉
エビ 身	綿実外皮	土壌 バクテリア

* ゼブラフィッシュ尾



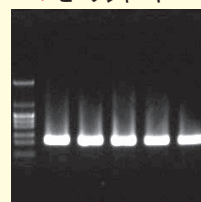
サンプル量: 5 mm², 約2 mg
ターゲット: *ba1*, 466 bp

* トウモロコシ粗挽き粉



サンプル量: 50 mm³, 約20 mg
ターゲット: *CesA1*, 827 bp

* ビーフジャーキー



サンプル量: 20 mm³, 約10 mg
ターゲット: *cox1* (ミトコンドリア), 528 bp

【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
MightyAmp™ Genotyping Kit	200回 (50 µl 反応系)	R074A	¥52,500

MightyAmp™ Genotyping Kit (製品コード R074A)

MightyAmp DNA Polymerase (1.25 U/µl) 200 µl

2×MightyAmp Buffer (Mg²⁺, dNTP plus)* 1.25 ml×4

5×Loading Dye 1 ml×3

Extraction Buffer 20 ml

Proteinase K 200 µl

* 4 mMのMg²⁺ (2×) と各0.8 mMのdNTP (2×) を含む。

長年愛されてきたPCRの基本酵素

Taqシリーズ

TaKaRa Taq™

TaKaRa Taq™ HS Perfect Mix

TaKaRa Taq™ HS Low DNA

TaKaRa Ex Taq®

TaKaRa LA Taq®

SpeedSTAR™ HS DNA Polymerase



TaKaRa Taq™ Hot Start Version

TaKaRa Taq™

ベーシックな酵素

【増幅鎖長の目安】

λ DNA : ~12 kb

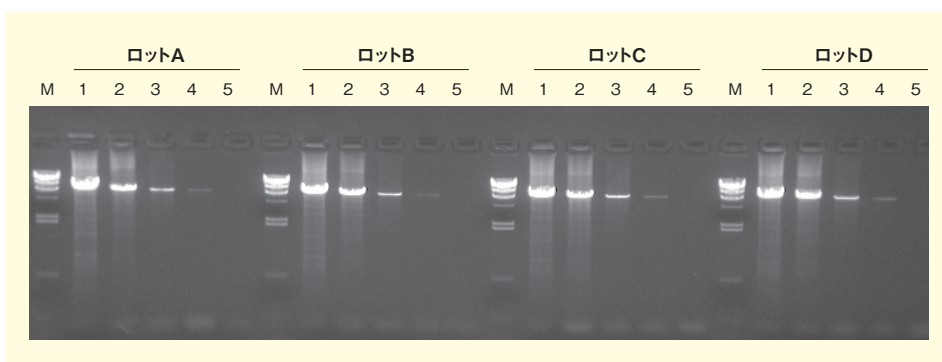
ヒトゲノムDNA : ~3 kb

TaKaRa Taq™はもっともベーシックなPCR酵素で、一般的な1 kb以下の増幅ではTaKaRa Ex Taq®, TaKaRa LA Taq®と同様に良好な増幅が見られます。

ロット間での反応性のばらつきもなく、安心してお使いいただけます。

Hot Start Versionは、抗Taq抗体を添加したHot Start PCR酵素で、より特異性の高いPCRを行うことができます。

■ ロット間での反応性の比較



鋳型 : λ DNA
増幅鎖長 : 8 kb
鋳型量 (50 μl 反応系) ;
レーン1 : 1 ng
2 : 100 pg
3 : 10 pg
4 : 1 pg
5 : Negative Control
M : λ-Hind III digest

PCR条件 :
94℃ 30秒 } 30サイクル
65℃ 10分 }

【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
TaKaRa Taq™ Hot Start Version	250 U	R007A	¥29,000
	1,000 U (A×4)	R007B	¥92,000
TaKaRa Taq™	250 U	R001A	¥27,500
	1,000 U (250 U×4)	R001B	¥88,000
	3,000 U (B×3)	R001C	¥231,000
TaKaRa Taq™ (Mg ²⁺ free Buffer)	250 U	R001AM	¥27,500
	1,000 U (AM×4)	R001BM	¥88,000
	3,000 U (AM×12)	R001CM	¥231,000
Premix Taq™ Hot Start Version (500 μl×5本)	100回 (50 μl 反応系)	R028A	¥19,500
Premix Taq™ (TaKaRa Taq™ Version 2.0) (500 μl×6本)	120回 (50 μl 反応系)	R004A	¥19,500

TaKaRa Taq™ Hot Start Version (製品コード R007A)

TaKaRa Taq HS (5 U/μl) 50 μl
10×PCR Buffer (15 mM Mg²⁺ plus) 1 ml
dNTP Mixture (各2.5 mM) 800 μl

TaKaRa Taq™ (Mg²⁺ plus Buffer) (製品コード R001A)

TaKaRa Taq (5 U/μl) 50 μl
10×PCR Buffer (15 mM Mg²⁺ plus) 1 ml
dNTP Mixture (各2.5 mM) 800 μl

TaKaRa Taq™ (Mg²⁺ free Buffer) (製品コード R001AM)

TaKaRa Taq (5 U/μl) 50 μl
10×PCR Buffer (Mg²⁺ free) 1 ml
MgCl₂ (25 mM) 1 ml
dNTP Mixture (各2.5 mM) 800 μl

Premix Taq™ Hot Start Version (製品コード R028A)

Premix Taq™ (TaKaRa Taq™ Version 2.0) (製品コード R004A)

2×のプレミックス試薬です。
3 mM Mg²⁺ (2×) と各0.4 mM dNTP (2×) を含む。

TaKaRa *Taq*™ HS Perfect Mix

ベーシック

高速PCR

【増幅鎖長の目安】

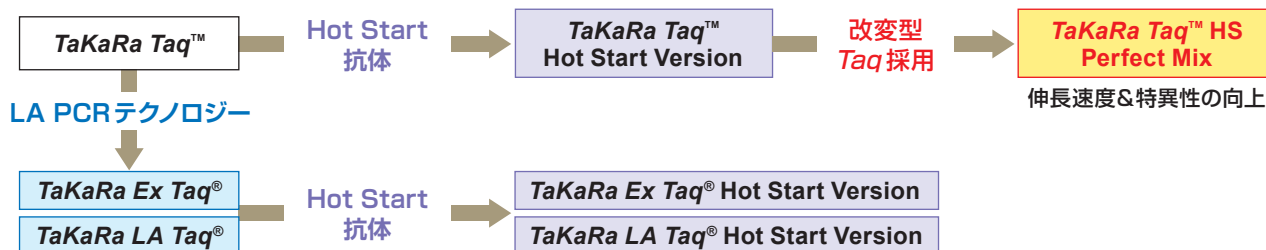
λ DNA：～12 kb

ヒトゲノムDNA：～3 kb

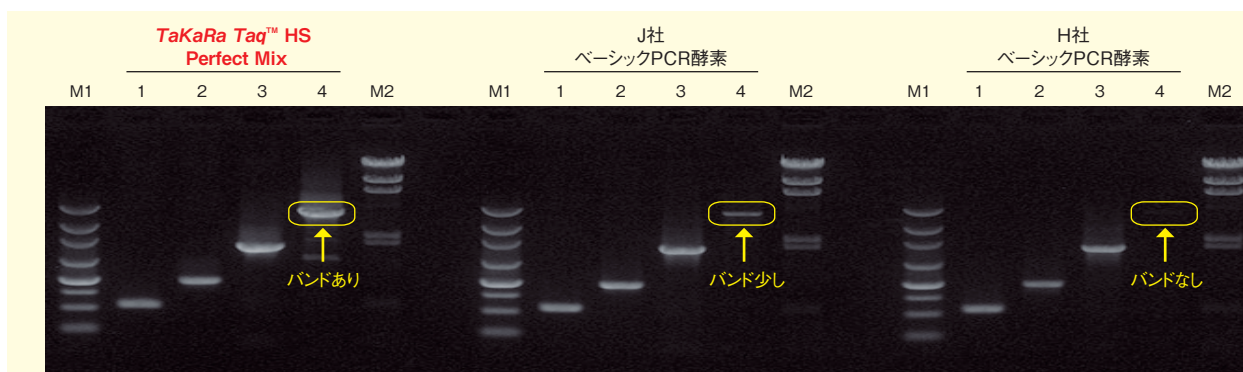
TaKaRa Taq™ HS Perfect Mixは、*Taq* DNA polymeraseを改変することにより伸長速度と特異性を高めた進化型ベーシックPCR酵素です。伸長時間を20秒/kbに設定できるため、一般的なベーシックPCR酵素の半分以上の反応時間で増幅結果を知ることができます。

また、反応コンポーネントのプレミックス化&ホットスタート法の採用で、反応液調製も簡単です。

注) より高い反応性や伸長性を求める場合は、*TaKaRa Ex Taq*®や*TaKaRa LA Taq*®をご使用ください。
TaKaRa Ex Taq®や*TaKaRa LA Taq*®はLA PCRテクノロジーが使用されており、増幅効率(特に長鎖に対する増幅効率)が*TaKaRa Taq*™ HS Perfect Mixより優れています。



■ 他社ベーシックPCR酵素との比較



鋳型：ヒトゲノムDNA

レーン1：DCLRE1A 500 bp
2：DCLRE1A 1 kb
3：DCLRE1A 2 kb
4：DCLRE1A 4 kb

M1：250 bp DNA Ladder
M2：λ-Hind III digest

各社推奨条件で反応

TaKaRa Taq HS Perfect MixのPCR条件：
94℃ 5秒
65℃ 20秒/kb □ 35サイクル

【上記反応における各PCR酵素のPCR増幅所要時間】

	500 bp	1 kb	2 kb	4 kb
<i>TaKaRa Taq</i>™ HS Perfect Mix	46分	51分	62分	85分
J社ベーシックPCR酵素	110分	128分	163分	233分
H社ベーシックPCR酵素	117分	134分	173分	242分

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice *Touch* (製品コード TP350) を使用

(弊社比較データ)

【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
<i>TaKaRa Taq</i>™ HS Perfect Mix	100回 (50 μl 反応系)	R300A	¥10,500
	400回 (50 μl 反応系)	R300B (A×4)	¥33,500

TaKaRa Taq™ HS Perfect Mix (製品コード R300A)

TaKaRa Taq HS Perfect Mix (2×) * 500 μl × 5

* 反応に必要なバッファー、dNTP Mixture を含む。
(Mg²⁺：最終濃度 2 mM)

TaKaRa *Taq*TM HS Low DNA

Low DNA タイプ

高感度検出

【増幅鎖長の目安】

λ DNA：～12 kb

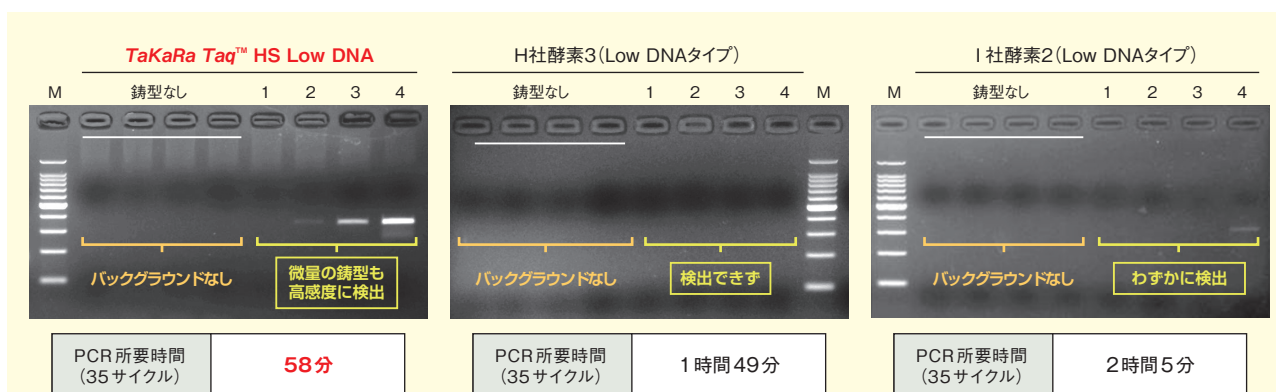
ヒトゲノム DNA：～3 kb

*TaKaRa Taq*TM HS Low DNA は、タカラバイオ独自の精製技術および DNA 不活化技術により、試薬に含まれる宿主大腸菌由来の DNA や環境から混入した DNA など PCR で鋳型となりうる DNA を極限まで抑制した、プレミックスタイプの PCR 酵素です。

伸長速度と特異性を高めた改変型 *Taq* DNA polymerase を使用することにより、高感度で特異的な PCR 増幅を迅速に行うことができます。

微生物の高感度検出、16S 菌叢解析をはじめ、No Template Control での増幅などバックグラウンドの出現が解析に大きな影響を与える反応系に最適です。

■ 迅速に高感度検出



レーン 1：大腸菌ゲノム DNA 1 cell 相当分
 2：10 cells 相当分
 3：10² cells 相当分
 4：10³ cells 相当分
 M：100 bp DNA Ladder

ターゲット：大腸菌 16S rDNA 348 bp
 各社推奨条件で反応：Thermal Cycler Dice Gradient (製品コード TP600) を使用

*TaKaRa Taq*TM HS Low DNA は、鋳型なしの反応におけるバックグラウンドはしっかり抑えつつ、微量のターゲットを他社製品よりも短時間で高感度に検出可能です。

(弊社比較データ)

■ 実験目的・手法からおすすめ“Low DNA”酵素を選択！

- 目的は微生物の高感度検出
- 微量サンプルからの菌叢解析で困っている
- PCR 反応時間は少しでも短縮したい
- 縮重プライマーを使いたい

TaKaRa *Taq*TM HS Low DNA

- 目的は微量ゲノムからの高感度特異的増幅
- 1 細胞からの PCR がしたい
- 鋳型が GC リッチ、AT リッチで増えにくい
- バイアスのないライブラリー増幅を行いたい

Tks GflexTM DNA Polymerase Low DNA
 (13 ページ参照)

【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
TaKaRa <i>Taq</i>TM HS Low DNA	100 回 (20 μl 反応系)	R090A	¥16,000

*TaKaRa Taq*TM HS Low DNA (製品コード R090A)

TaKaRa Taq HS Low DNA (2×) * 200 μl × 5
 dH₂O for Low DNA 200 μl × 5

* 2 mM の Mg²⁺ (2×) と各 0.4 mM の dNTP (2×) を含む。

TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version

TaKaRa Ex Taq®

検出感度

増幅量

汎用性

TaKaRa Ex Taq® は高い検出感度と増幅収量を示す汎用性の高いPCR酵素です。鋳型が微量な場合や、様々な夾雑物が含まれている反応系において特に威力を発揮します。通常の Taq DNA Polymerase では検出できなかったバンドが TaKaRa Ex Taq® により検出できた例が多数報告されています。Hot Start Version は抗 Taq 抗体を添加した Hot Start PCR 酵素で、サイクリング条件を変更することなく、より高感度で特異性の高いPCRが可能です。

【増幅鎖長の目安】

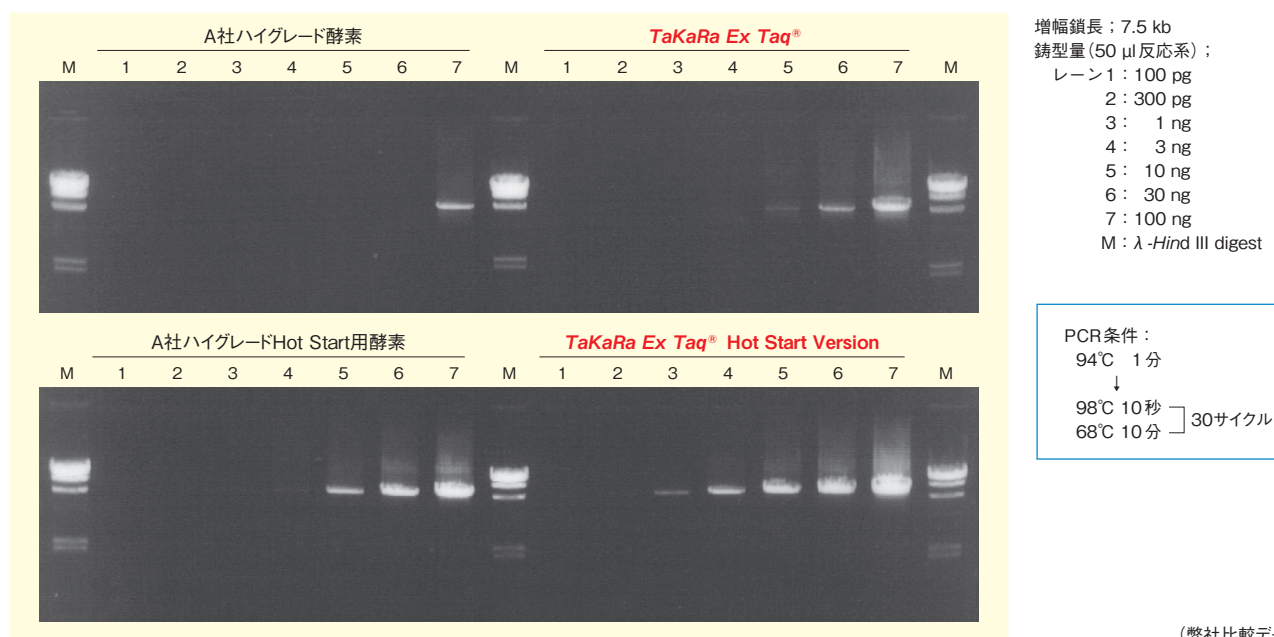
λ DNA : ~30 kb

ヒトゲノム DNA : ~20 kb

■ 他社ハイグレードPCR酵素との増幅効率の比較

1) ヒトゲノムDNAを鋳型として鋳型量を変えて増幅

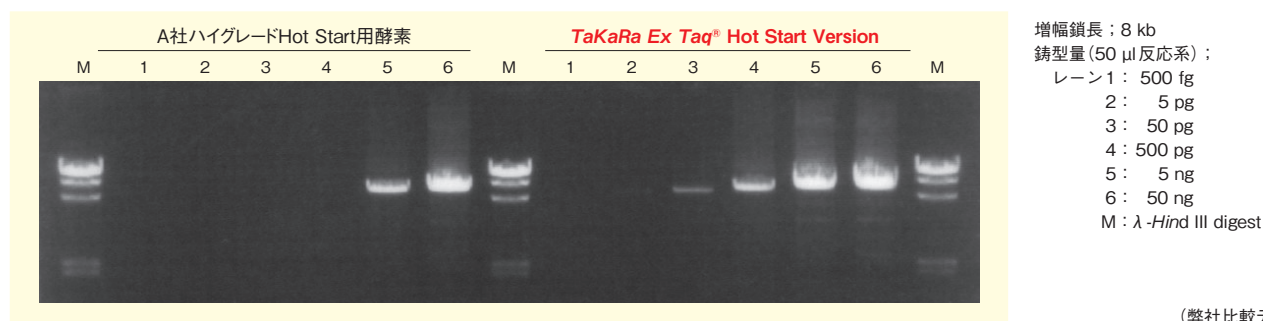
ヒトゲノムDNAを鋳型として、他社ハイグレードPCR酵素と増幅性能を比較しました。TaKaRa Ex Taq® および TaKaRa Ex Taq® HSは、それぞれ1 オーダー高い検出感度を示しました。



(弊社比較データ)

2) 大腸菌ゲノムDNAを鋳型として鋳型量を変えて増幅

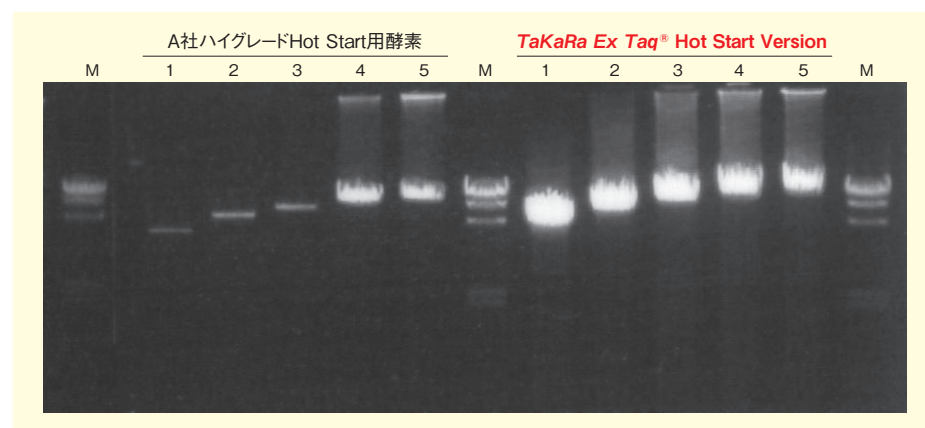
大腸菌ゲノムDNAを鋳型として、他社ハイグレードPCR酵素と増幅性能を比較しました。TaKaRa Ex Taq® HSは、2 オーダー高い検出感度を示しました。



(弊社比較データ)

3) λ DNA を鋳型として様々なサイズの領域を増幅

λ DNA を鋳型として、他社ハイグレードPCR 酵素と増幅性能を比較しました。TaKaRa Ex Taq® HS は、高感度・高収量の増幅結果が得られました。



鋳型量；100 pg (50 μl 反応系)

増幅鎖長；

レーン1： 6 kb

2： 8 kb

3： 10 kb

4： 12 kb

5： 15 kb

M：λ-Hind III digest

PCR 条件：

94℃ 1分

↓

98℃ 10秒

68℃ 8分

30サイクル

(弊社比較データ)

【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version	250 U	RR006A	¥31,500
	1,000 U (A×4)	RR006B	¥101,000
TaKaRa Ex Taq®	250 U	RR001A	¥30,000
	1,000 U (250 U×4)	RR001B	¥97,000
	3,000 U (B×3)	RR001C	¥260,000
TaKaRa Ex Taq® (Mg²⁺ free Buffer)	250 U	RR01AM	¥30,000
	1,000 U (AM×4)	RR01BM	¥97,000
	3,000 U (AM×12)	RR01CM	¥260,000
Premix Ex Taq™ Hot Start Version (500 μl×5本)	100 回 (50 μl 反応系)	RR030A	¥21,500
Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0) (500 μl×6本)	120 回 (50 μl 反応系)	RR003A	¥21,500

TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (製品コード RR006A)

TaKaRa Ex Taq HS (5 U/μl) 50 μl
 10×Ex Taq Buffer (20 mM Mg²⁺ plus) 1 ml
 dNTP Mixture (各 2.5 mM) 800 μl

TaKaRa Ex Taq® (Mg²⁺ plus Buffer) (製品コード RR001A)

TaKaRa Ex Taq (5 U/μl) 50 μl
 10×Ex Taq Buffer (20 mM Mg²⁺ plus) 1 ml
 dNTP Mixture (各 2.5 mM) 800 μl

TaKaRa Ex Taq® (Mg²⁺ free Buffer) (製品コード RR01AM)

TaKaRa Ex Taq (5 U/μl) 50 μl
 10×Ex Taq Buffer (Mg²⁺ free) 1 ml
 MgCl₂ (25 mM) 1 ml
 dNTP Mixture (各 2.5 mM) 800 μl

Premix Ex Taq™ Hot Start Version (製品コード RR030A)

Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0) (製品コード RR003A)

2× のプレミックス試薬です。
 4 mM Mg²⁺ (2×) と各 0.4 mM dNTP (2×) を含みます。

TaKaRa LA Taq[®] Hot Start Version

TaKaRa LA Taq[®]

TaKaRa LA Taq[®] with GC Buffer

長鎖増幅

増幅量

GC リッチ配列[※]

※with GC Bufferのみ

TaKaRa LA Taq[®]は長鎖DNAの増幅に適したPCR酵素で、特に15 kb以上の増幅に威力を発揮します。また、GCリッチ配列など複雑な二次構造を持つDNAを鋳型とする場合には、TaKaRa LA Taq[®] with GC Bufferを使用すると効果的です。Hot Start Versionは、抗Taq抗体を添加したHot Start PCR酵素で、サイクリング条件を変更することなく、より高感度で特異性の高いPCRが可能です。

【増幅鎖長の目安】

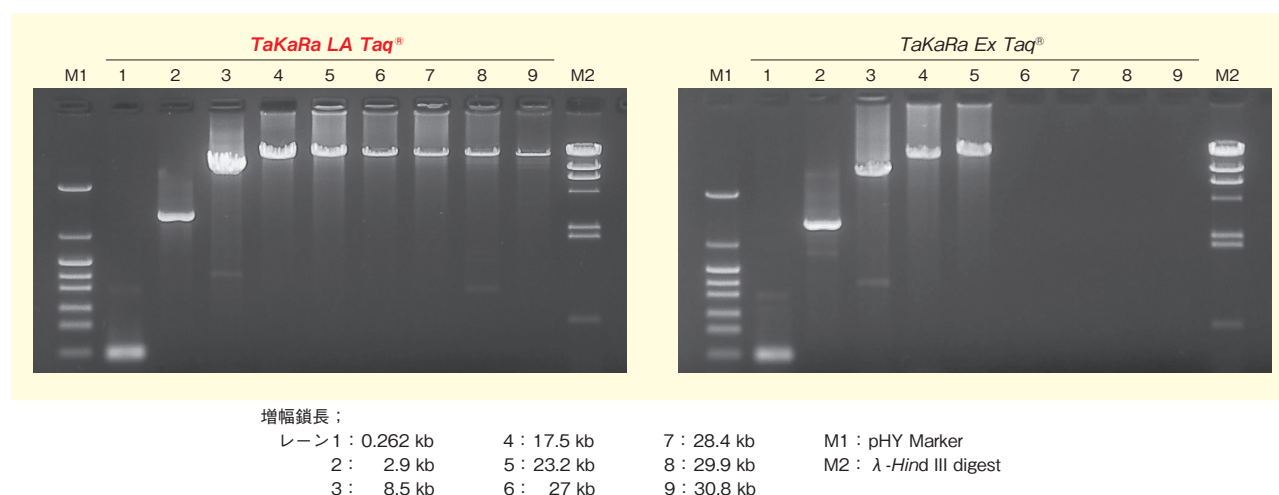
λ DNA : ~40 kb

ヒトゲノムDNA : ~30 kb

■ さまざまな長さのターゲットに対する TaKaRa LA Taq[®]、TaKaRa Ex Taq[®] の増幅性能の比較

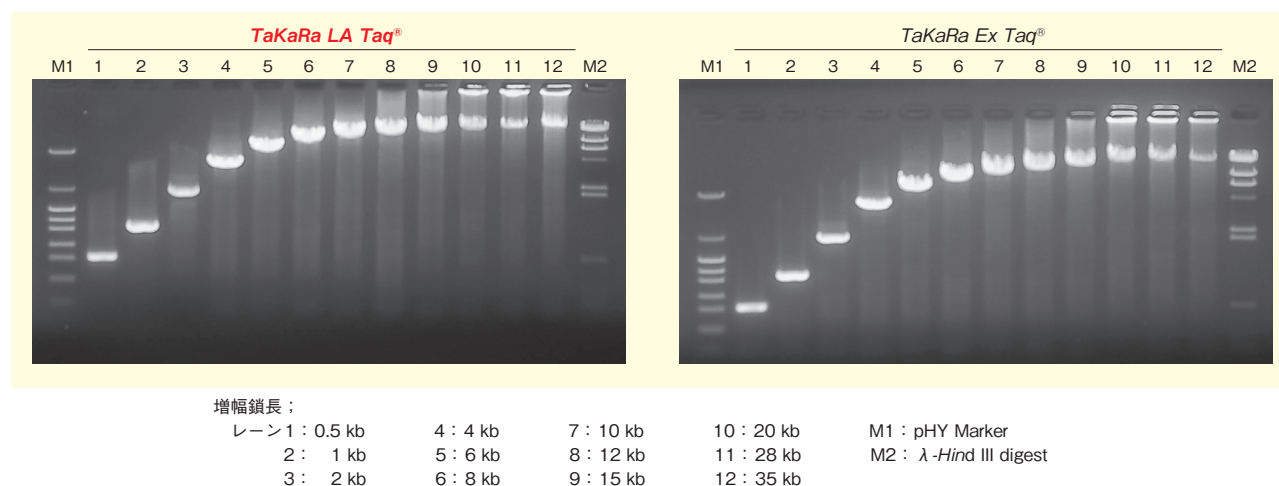
1) ヒトゲノムDNAを鋳型とした増幅

ヒトゲノムDNAを鋳型とした場合、TaKaRa LA Taq[®]では30 kbまで、TaKaRa Ex Taq[®]では23 kbまでの増幅が確認できました。



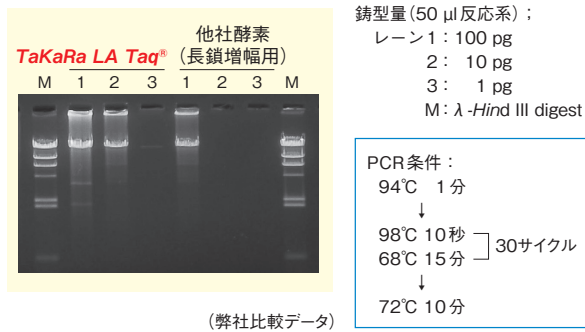
2) λ DNAを鋳型とした増幅

λ DNAを鋳型とした場合、TaKaRa LA Taq[®]では35 kbでも良好な増幅が見られました。



■ TaKaRa LA Taq® と他社 Long PCR 酵素との増幅効率の比較

1) λ DNA を鋳型として 28 kb を増幅



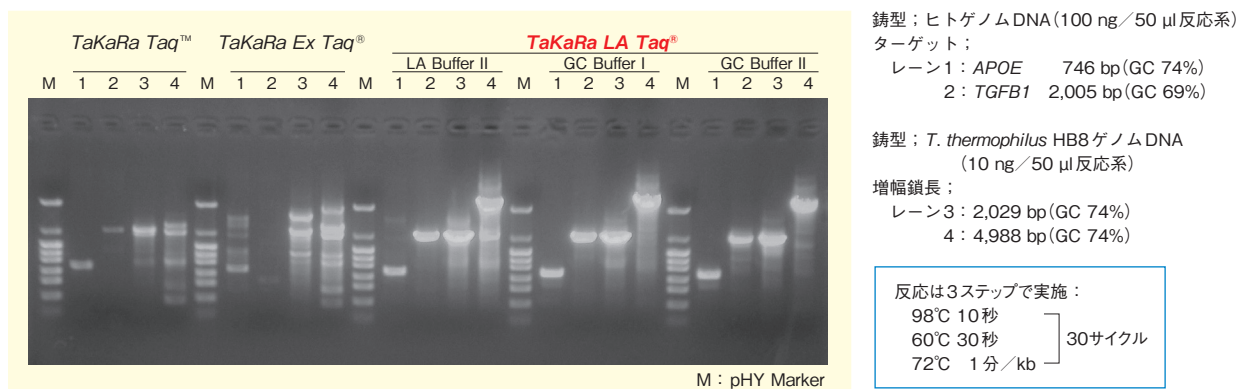
2) ヒトゲノムDNAを鋳型として 28.4 kb を増幅



■ GC リッチターゲットの増幅を Taq シリーズ各酵素で比較

Taqシリーズの各PCR酵素を用いてGCリッチターゲットに対する増幅性を比較しました。TaKaRa LA Taq®、特にGCバッファーを使用した場合に、特異的で良好な増幅が見られました。

(注: GC Buffer IIは10 kbを超える長鎖の増幅には適していません。)



【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
TaKaRa LA Taq® Hot Start Version	125 U	RR042A	¥29,000
	500 U (A×4)	RR042B	¥93,000
TaKaRa LA Taq®	125 U	RR002A	¥27,500
	500 U (A×4)	RR002B	¥88,000
TaKaRa LA Taq® with GC Buffer	125 U	RR02AG	¥27,500
	500 U (AG×4)	RR02BG	¥88,000
One Shot LA PCR™ Mix Ver.2.0	25 µl×24本	RR004	¥13,000

TaKaRa LA Taq® Hot Start Version (製品コード RR042A)

TaKaRa LA Taq HS (5 U/µl)	25 µl
10×LA PCR Buffer II (25 mM Mg ²⁺ plus)	1 ml
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	400 µl

TaKaRa LA Taq® (製品コード RR002A)

TaKaRa LA Taq (5 U/µl)	25 µl
10×LA PCR Buffer (Mg ²⁺ free)	1 ml
MgCl ₂ (25 mM)	1 ml
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	400 µl

TaKaRa LA Taq® with GC Buffer (製品コード RR02AG)

TaKaRa LA Taq (5 U/µl)	25 µl
2×GC Buffer I (5 mM Mg ²⁺ plus)※	1.25 ml
2×GC Buffer II (5 mM Mg ²⁺ plus)※	1.25 ml
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	400 µl

※まずGC Buffer Iをお試しください。Buffer Iで増幅できないターゲットの場合、GC Buffer IIをお試しいただくことで改善する場合があります。

One Shot LA PCR™ Mix Ver.2.0 (製品コード RR004)

2×のプレミックス試薬です。
5 mM Mg²⁺ (2×) と各 0.8 mM dNTP (2×) を含む。

SpeedSTAR™ HS DNA Polymerase

高速PCR

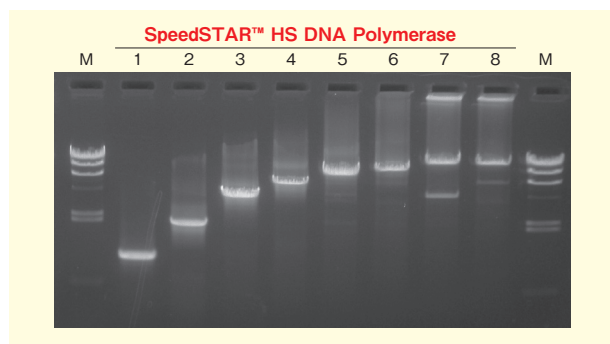
【増幅鎖長の目安】

λ DNA : ~20 kb
ヒトゲノムDNA : ~17.5 kb

SpeedSTAR™ HS DNA Polymeraseは、タカラバイオが独自に開発した *Taq* ベースのポリメラーゼと、高速反応用に最適化したバッファの組み合わせにより実現した反応性の高い高速PCR酵素です。通常のPCRに比べて各ステップの反応時間を短く設定できるので、トータルの反応時間が大幅に短縮されます。ターゲットのサイズに応じて至適化した2種類のバッファを添付しており、増幅鎖長が2 kbまでは Buffer I を、2~4 kb には I または II を、4 kb 以上の場合は Buffer II の使用を推奨します。

■ 反応所要時間の比較：

SpeedSTAR™ HS DNA Polymerase vs. TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version

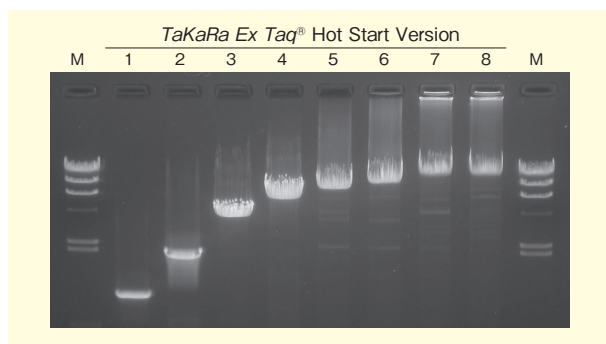


鋳型:大腸菌ゲノムDNA
増幅鎖長:

レーン
1 : 1 kb
2 : 2 kb
3 : 4 kb
4 : 6 kb
5 : 8 kb
6 : 10 kb
7 : 18 kb
8 : 20 kb
M : λ-Hind III digest

サーマルサイクラー：
Thermal Cycler Dice Gradient
(プログラム Mode 5)

PCR条件：
・ターゲットの鎖長：1 kb, 2 kb の場合
94℃ 1分
↓
95℃ 5秒 } 30サイクル
65℃ 20秒 }
トータルの反応時間：約33分
・ターゲットの鎖長：4 kb, 6 kb の場合
94℃ 1分
↓
95℃ 5秒 } 30サイクル
65℃ 60秒 }
トータルの反応時間：約53分
・ターゲットの鎖長：8 kb, 10 kb の場合
94℃ 1分
↓
98℃ 5秒 } 30サイクル
68℃ 2分 }
トータルの反応時間：約83分
・ターゲットの鎖長：18 kb, 20 kb の場合
94℃ 1分
↓
98℃ 5秒 } 30サイクル
68℃ 5分 }
72℃ 5分
トータルの反応時間：約3時間29分



鋳型:大腸菌ゲノムDNA
増幅鎖長:

レーン
1 : 1 kb
2 : 2 kb
3 : 4 kb
4 : 6 kb
5 : 8 kb
6 : 10 kb
7 : 18 kb
8 : 20 kb
M : λ-Hind III digest

サーマルサイクラー：
Thermal Cycler Dice Gradient
(プログラム Mode 1)

PCR条件：
・ターゲットの鎖長：1 kb, 2 kb の場合
94℃ 1分
↓
98℃ 10秒 } 30サイクル
68℃ 2分 }
トータルの反応時間：約96分
・ターゲットの鎖長：4 kb, 6 kb の場合
94℃ 1分
↓
98℃ 10秒 } 30サイクル
68℃ 6分 }
72℃ 10分
トータルの反応時間：約3時間46分
・ターゲットの鎖長：8 kb, 10 kb の場合
94℃ 1分
↓
98℃ 10秒 } 30サイクル
68℃ 10分 }
72℃ 10分
トータルの反応時間：約5時間46分
・ターゲットの鎖長：18 kb, 20 kb の場合
94℃ 1分
↓
98℃ 10秒 } 30サイクル
68℃ 15分 }
72℃ 10分
トータルの反応時間：約8時間16分

【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
SpeedSTAR™ HS DNA Polymerase	250 U	RR070A	¥32,000
	1,000 U	RR070B (A×4)	¥102,000

SpeedSTAR™ HS DNA Polymerase (製品コード RR070A)

SpeedSTAR HS DNA Polymerase (5 U/μl)	50 μl
10×Fast Buffer I (30 mM Mg ²⁺ plus)	1 ml
10×Fast Buffer II (20 mM Mg ²⁺ plus)	1 ml
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	800 μl

各種目的に合わせて最適化

特殊用途向けキット製品

***TaKaRa Taq*[™] HS PCR Kit, UNG plus**

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit

Multiplex PCR Assay Kit Ver.2

TaKaRa EpiTaq[™] HS (for bisulfite-treated DNA)

TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG plus TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit

繰り返しPCR

偽陽性防止

TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG plusおよびTaKaRa PCR Carryover Prevention Kitには、dUTPを含むdNTP mixtureおよび熱感受性が高いUracil-N-glycosylase(UNG)が含まれており、PCRを行う前にUNGを作用させることで、以前に増幅した増幅産物からのPCRによる増幅を防止できます。

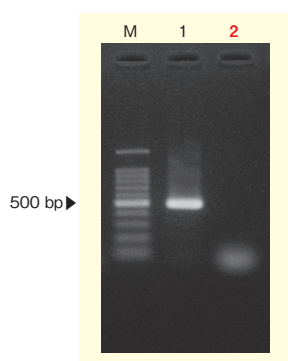
TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG plusはTaKaRa Taq™ HSを含むキットで、そのまま、キャリーオーバーを防止するPCRを行うことができます。

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kitは、現在お使いのPCRの系をキャリーオーバー防止できるようにするキットです。ただし、PrimeSTAR®などのα型PCR酵素には使用できません。

■ UNGによるキャリーオーバー防止効果

ヒトゲノムDNA 10 ngを鋳型とする500 bpのPCR増幅を本TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG plusを用いて行いました(PCR 1回目)。次にこのPCR増幅産物2 μlを鋳型として、UNG処理あり、なしで1回目と同様のPCR増幅を行いました(PCR 2回目)。

UNG処理ありでは、1回目の増幅産物が分解され、2回目のPCRで増幅産物は検出されず、キャリーオーバーに対するUNGの効果を確認できました。



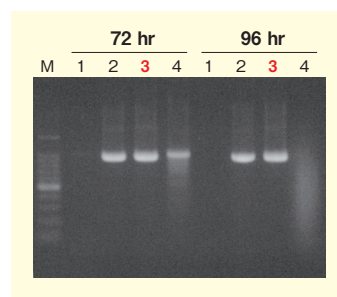
1 : UNG処理なしの2nd PCR産物
2 : UNG処理ありの2nd PCR産物
M : 100 bp DNA Ladder

500 bp ▶

■ PCR増幅産物の安定性

TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG plusの熱感受性UNGは、50℃ 10分の熱処理により完全かつ不可逆的に失活するため、キャリーオーバーを確実に不活性化する量の酵素を加えても、PCRサイクル前の95℃ 2分の変性工程で完全に失活し、増幅産物を分解することはありません。

PCR終了後、室温で72~96時間放置して増幅産物の分解を比較し、本キットでは分解は見られないことを確認しました。



鋳型：ヒトゲノムDNA
増幅サイズ：1 kb
反応終了後の放置温度：25℃

1 : コントロール(鋳型なし)
2 : UNG非添加
3 : 本キットのUNGを使用
4 : E. coli熱感受性UNGを使用
M : 100 bp DNA Ladder

(弊社比較データ)

【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG plus	50回(50 μl反応系)	R013S	¥20,000
	200回(50 μl反応系)	R013A	¥63,800
TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit	200回	6088	¥46,000

TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG plus (製品コード R013S)

TaKaRa Taq HS(5 U/μl)	12.5 μl
10 X PCR Buffer for UNG plus *1	250 μl
dU plus dNTP Mixture(12.5×) *2,*3	200 μl
UNG(2 U/μl) *4,*5	25 μl

*1 : Mg²⁺濃度：22.5 mM(10 ×)
本製品は、dUTPがdTTPの3倍濃度に設定されているため、全体的にdNTP濃度が高い。
MgCl₂とdNTPの量のバランスを保つため、通常のTaKaRa Taq Hot Start Version(製品コードR007A)に添付の10×PCR Buffer(Mg²⁺ plus)よりMg²⁺濃度が高くなっている。
*2 : 7.5 mM dUTP、2.5 mM dATP、2.5 mM dGTP、2.5 mM dCTPを含む水溶液(Na塩)
*3 : 単品販売も用意(製品コード 4035) *4 : 単品販売も用意(製品コード 2820)
*5 : 熱感受性UNG : 上記「PCR増幅産物の安定性」をご覧ください。

TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit (製品コード 6088)

UNG(2 U/μl) *1,*2	100 μl
dU plus dNTP Mixture(12.5×) *3,*4	800 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1 ml

*1 : 熱感受性UNG : 上記「PCR増幅産物の安定性」をご覧ください。
*2 : 単品販売も用意(製品コード 2820)
*3 : 7.5 mM dUTP、2.5 mM dATP、2.5 mM dGTP、2.5 mM dCTPを含む水溶液(Na塩)
*4 : 単品販売も用意(製品コード 4035)

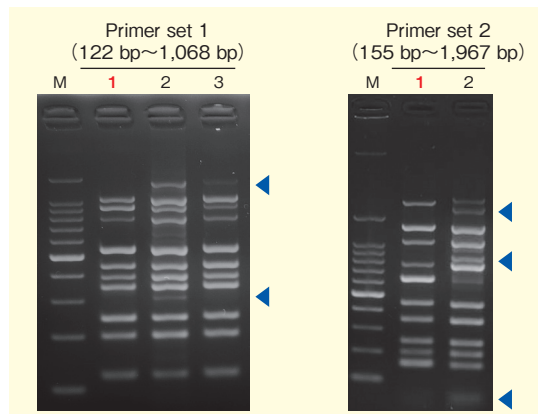
Multiplex PCR Assay Kit Ver.2

マルチプレックスPCR

ハイプレックスPCR

本製品は、高速にプライミングする酵素とプライマーのアニーリング特異性を極限まで高めた反応液組成とを組み合わせたマルチプレックスPCR用キットであり、従来のマルチプレックスキットに比べ、より短時間に特異的かつ配列による増幅バイアスの少ないPCR増幅を実現します。酵素量、反応時間を調整することで200プライマーペア程度のハイプレックスPCRも可能です。

■ 10種類のプライマーを用いた Multiplex 反応例



1 : Multiplex PCR Assay Kit Ver.2

2 : K社同タイプキット

3 : M社同タイプキット

M : 100 bp DNA Ladder

◀ : 非特異的増幅産物

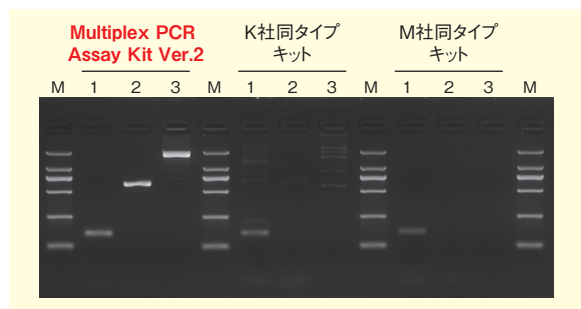
他社同タイプ製品に比べ、本製品ではターゲット10種に特異的な増幅結果をより短時間で得ることができました。

	Multiplex PCR Assay Kit Ver.2	K社同タイプキット	M社同タイプキット
Preheat	94℃ 1分	95℃ 3分	95℃ 15分
PCR (30 サイクル)	94℃ 30秒	95℃ 15秒	95℃ 30秒
	57℃ 30秒	60℃ 30秒	60℃ 90秒
	72℃ 30秒 (set 1) 60秒 (set 2)	72℃ 60秒 (set 1) 120秒 (set 2)	72℃ 90秒 (set 1) 120秒 (set 2)
Final extension	72℃ 10分	72℃ 10分	72℃ 10分
Total time	100分 (set 1) 115分 (set 2)	110分 (set 1) 140分 (set 2)	158分 (set 1) 188分 (set 2)

※ TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (製品コード TP600) 使用の場合

(弊社比較データ)

■ 高い反応効率と特異性を両立！シングルPCRでも威力を発揮



1 : LRP5 155 bp

2 : JUN 604 bp

3 : TGFBI 2,004 bp

M : DL2,000 DNA Marker

鋳型：ヒトゲノムDNA 100 ng / 50 µl 反応系

各社推奨条件で反応

エキストラバンドが現れやすく増幅しにくいプライマーでのPCRも、目的のターゲットを特異的に、かつ効率よく増幅可能です。

(弊社比較データ)

【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Multiplex PCR Assay Kit Ver.2	100回 (50 µl 反応系)	RR062A	¥34,000
	400回 (50 µl 反応系)	RR062B (A×4)	¥109,000

Multiplex PCR Assay Kit Ver.2 (製品コード RR062A)

2×Multiplex PCR Buffer (Mg²⁺, dNTP plus) * 1.25 ml×2
Multiplex PCR Enzyme Mix 25 µl

* 反応に必要なバッファー、dNTP Mixture を含む。
(Mg²⁺：最終濃度 2 mM)

TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA)

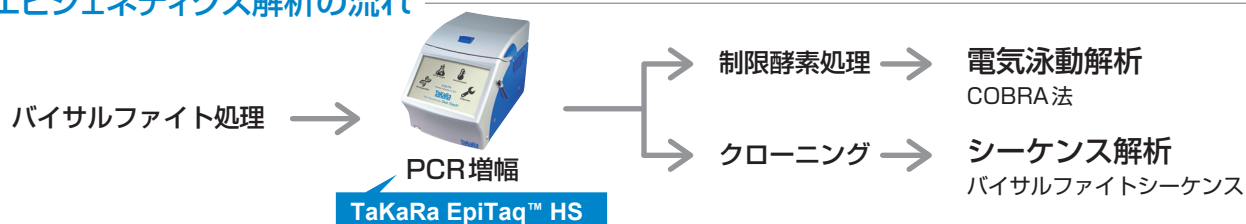
エピジェネティクス

バイサルファイト処理

Hot Start

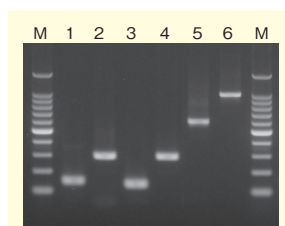
TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA) は、バイサルファイト処理後のウラシルを多く含むDNAを鋳型としてPCR増幅を行う際に最適なPCR酵素です。バイサルファイト処理を行ったDNAはPCRの反応性が変化することがありますが、本酵素ではMg²⁺濃度やdNTP濃度を調整することにより増幅効率、反応特異性を調節できるため、これまで増幅できなかったターゲットに関しても良好な増幅を行うことができます。

エピジェネティクス解析の流れ



■ バイサルファイト処理後のHeLaゲノムDNAを鋳型としたPCR増幅

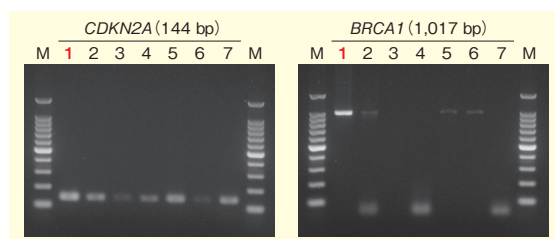
MethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (製品コード ME002)を用いてHeLaゲノムDNAのバイサルファイト処理を行い、各遺伝子上流のCpGアイランド領域をTaKaRa EpiTaq™ HSでPCR増幅しました。1 kbを超えるターゲットを含め、各領域で良好な増幅が確認できました。



鋳型：処理済みHeLaゲノムDNA (100 ng/50 µl反応系)
ターゲット：
レーン1：CDH1 (153 bp) 5：BRCA1 (613 bp)
2：CDH1 (297 bp) 6：BRCA1 (1,017 bp)
3：MLH1 (136 bp) M：100 bp DNA Ladder
4：MLH1 (292 bp)

PCR条件：
98℃ 10秒
55℃ 30秒
72℃ 30秒*
40サイクル
*613 bp, 1,017 bpの場合は1分

■ 各社PCR酵素を用いてバイサルファイト処理DNAの増幅を比較



鋳型：処理済みHeLaゲノムDNA (100 ng/50 µl反応系)
使用酵素：
レーン1：TaKaRa EpiTaq HS 5：H社PCR酵素1*
2：TaKaRa Taq HS 6：H社PCR酵素2*
3：F社PCR酵素1* 7：I社PCR酵素1*
4：G社PCR酵素1* M：100 bp DNA Ladder

*バイサルファイト処理DNAでの使用を推奨

(弊社比較データ)

【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA)	250 U (200回*)	R110A	¥33,000
	1,000 U (800回*)	R110B (A×4)	¥99,000

※50 µl反応系の場合の反応回数です。

TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA) (製品コード R110A)

TaKaRa EpiTaq HS (5 U/µl)	250 U
10×EpiTaq PCR Buffer (Mg ²⁺ free)	1 ml
dNTP Mixture (各2.5 mM)	1.2 ml
25 mM MgCl ₂	1.2 ml

**簡単便利！ そのまま電気泳動も可能
ルーチンPCRやコロニーPCRに最適**

Dye入りプレミックス試薬

EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix

EmeraldAmp® PCR Master Mix

SapphireAmp® Fast PCR Master Mix



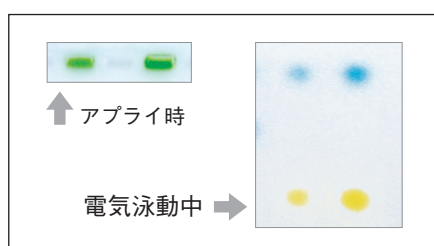
EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix

低コスト

プレミックス
Loading Dye入り

汎用性

【増幅鎖長の目安】
コロニーPCRインサートチェック：～10 kb
ヒトゲノムDNA：～15 kb

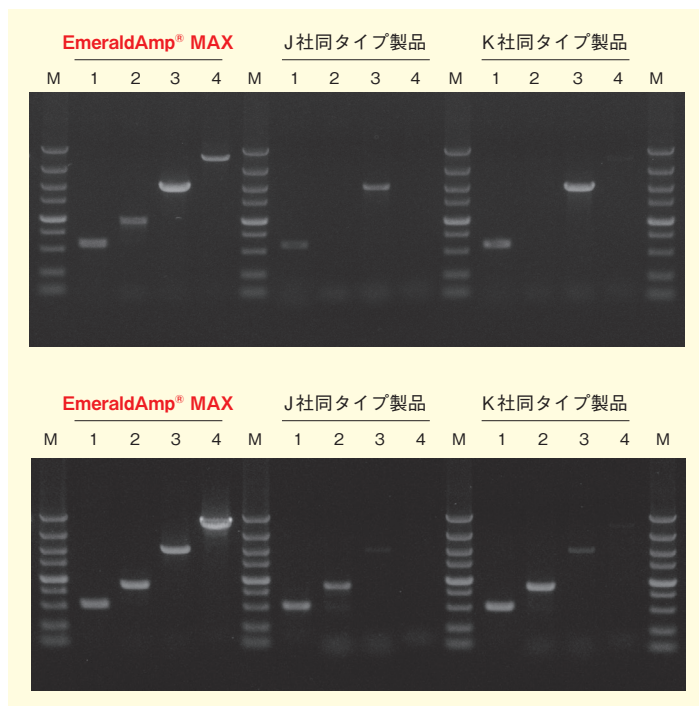


1反応あたり
わずか42円

- 反応後そのまま制限酵素で処理可能
- TAクローニングに使用可能
- 4℃でも3ヵ月間安定

GCリッチ、ATリッチ領域のPCR増幅を比較

ヒトゲノムDNAを鋳型として（50 ng/25 µl反応系）、EmeraldAmp® MAXおよび他社同タイプ製品についてGCリッチターゲット、ATリッチターゲットに対する増幅性を比較しました。EmeraldAmp® MAXではGCリッチ、ATリッチのどちらのターゲットに対しても特異性の高い増幅が見られ、他社同タイプ製品に比べて効果的にPCR増幅を行うことができました。



ターゲット：GC-rich regions

レーン 1: *BCL2* 581 bp GC 68%
2: *TGFB1* 987 bp GC 72%
3: *JUN* 2,025 bp GC 65%
4: *TGFB1* 4,015 bp GC 63%
M: DL5,000 DNA Marker

ターゲット：AT-rich regions

レーン 1: *UCRchr11** 539 bp GC 29%
2: *UCRchr9** 899 bp GC 30%
3: *CYC* 2,085 bp GC 37%
4: *DCLRE1A* 4,048 bp GC 36%
M: DL5,000 DNA Marker

*Uncoding region (染色体11、9)

※各酵素の推奨条件に基づいてPCR増幅を実施

EmeraldAmp MAXのPCR条件：
98℃ 10秒
60℃ 30秒
72℃ 1分/kb
30サイクル

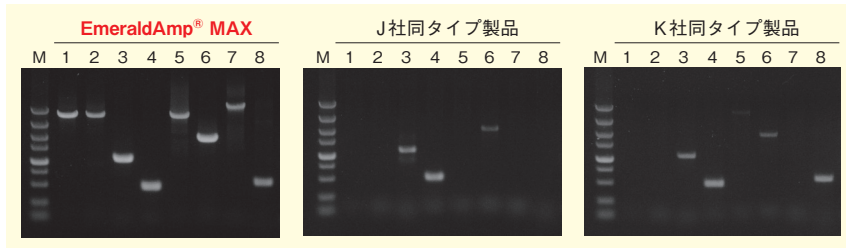
(弊社比較データ)

■ 同一PCR条件による0.5～6 kbの増幅例

ヒトゲノムDNAを鋳型として、EmeraldAmp® MAXおよび他社同タイプ製品を用いて、右記の同一PCR条件で各種サイズのターゲットを増幅しました。

EmeraldAmp® MAXでは同一PCR条件で0.5～6 kbの増幅が可能でした。増幅サイズやGC含量に関わらず、同一条件で増幅ができ、条件検討にかかる手間を軽減できます。

98℃ 10分
60℃ 30秒
72℃ 6分 } 30 サイクル



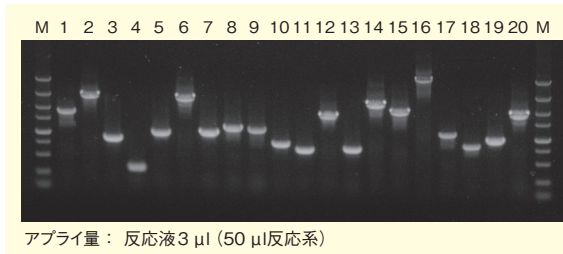
鋳型：ヒトゲノムDNA (50 ng/25 µl 反応系)

ターゲット：

レーン1：DCL 4 kb GC 36%
2：TGFB1 4 kb GC 63%
3：HBB 1 kb GC 39%
4：TP53 0.5 kb GC 46%
5：TP53 4 kb GC 48%
6：IGF2R 2 kb GC 50%
7：HBB 6 kb GC 37%
8：BCL2 0.6 kb GC 68%
M：DL5,000 DNA Marker

(弊社比較データ)

■ コロニーPCRによるインサートチェック

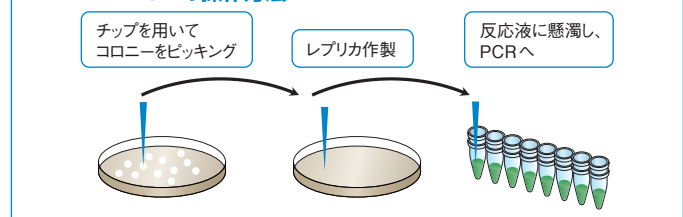


M：DL5,000 DNA Marker
1% Agarose L03

PCR条件：
98℃ 10秒
55℃ 30秒
72℃ 2分 } 30 サイクル

マウス肝臓由来cDNAライブラリー（ベクター：pUC19誘導体）で形質転換した大腸菌コロニーをランダムにピックアップし、ベクター上のプライマーを用いてPCR（インサートチェック）を行いました。

コロニーPCRの操作方法

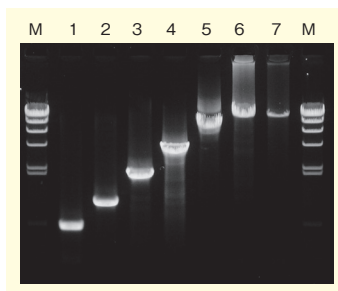


■ ヒト遺伝子領域の増幅

EmeraldAmp® MAXと各ターゲット増幅用プライマーを用いて、ヒトゲノムDNAを鋳型としたPCRを行い、0.5～24 kbの増幅を確認しました。

PCR条件：ターゲット1～4
98℃ 10秒
60℃ 30秒
72℃ 1分/kb } 30 サイクル

PCR条件：ターゲット5～7
98℃ 10秒
68℃ 1分/kb } 30 サイクル



鋳型：ヒトゲノムDNA

(50 ng/50 µl 反応系)

ターゲット：

1：TP53 505 bp GC 54%
2：IGF2R 980 bp GC 47%
3：MYC 2,030 bp GC 49%
4：IGF2R 3,890 bp GC 50%
5：FMR1 7,840 bp GC 34%
6：IGF2R 14,972 bp GC 46%
7：HBB 24,235 bp GC 39%
M：λ-Hind III digest (100 ng)

1% Agarose L03, 反応液3 µl をアプライ

【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix	160回 (50 µl 反応系)	RR320A	¥6,700

EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix (製品コード RR320A)

EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (2×Premix) 1 ml×4
dH₂O 1 ml×4

EmeraldAmp® PCR Master Mix

SapphireAmp® Fast PCR Master Mix

プレミックス
Loading Dye入り

Hot Start

高速PCR(※)

※SapphireAmpのみ

EmeraldAmp® PCR Master Mixは、Hot Start タイプの汎用型Dye入りプレミックスPCR試薬です。反応液の室温調製が可能になり、より手軽にPCRを行うことができます。SapphireAmp® Fast PCR Master Mixは、高速PCRが可能なHot StartタイプのDye入りPCR用プレミックス試薬です。通常のDye入りプレミックス試薬に比べてPCR反応時間がおよそ半分に短縮できますので、結果を早く知りたい方に特にお勧めです^(注)。

(注)：GC含量の高いターゲットや長鎖ターゲットの増幅には、EmeraldAmp® PCR Master Mixの使用をお勧めします。

【EmeraldAmp® の増幅鎖長の目安】

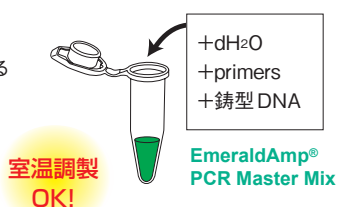
コロニーPCR インサートチェック：～10 kb
ヒトゲノムDNA：～15 kb

【SapphireAmp® の増幅鎖長の目安】

コロニーPCR インサートチェック：～6 kb
ヒトゲノムDNA：～6 kb

EmeraldAmp® PCR Master Mix の操作の流れ

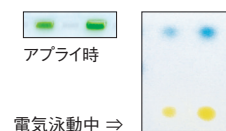
① EmeraldAmp® を
分注し、プライマー
と鋳型DNAを加える



② ホットスタートPCR

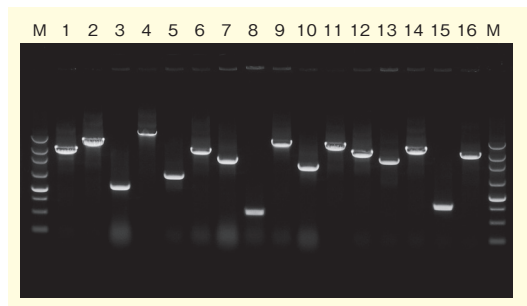


③ そのまま電気泳動へ



そのまま
アプラインして
泳動スタート

SapphireAmp® Fast PCR Master Mix を用いたコロニーPCR



1% Agarose L03使用、反応液 5 µl をアプライン
M：250 bp DNA Ladder (Dye Plus)

マウスcDNAライブラリー (0.5～5 kbのインサート搭載：pUC118ベクター) で形質転換した大腸菌コロニーをランダムにピックアップし、ベクター上のプライマーを用いてPCR (インサートチェック)を行いました。SapphireAmp®を用いることで、**約1時間**で5 kb程度の増幅が可能でした。

94℃ 1分
↓
98℃ 5秒
60℃ 5秒
72℃ 40秒
30 サイクル

わずか1時間

★コロニーPCRの場合は、5 kb程度まで
10秒/kbの設定で増幅可能です。

【製品リストと製品内容】

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
EmeraldAmp® PCR Master Mix	160回 (50 µl 反応系)	RR300A	¥17,000
	800回 (50 µl 反応系)	RR300B (A×5)	¥66,000
SapphireAmp® Fast PCR Master Mix	160回 (50 µl 反応系)	RR350A	¥17,000
	800回 (50 µl 反応系)	RR350B (A×5)	¥66,000

EmeraldAmp® PCR Master Mix (製品コード RR300A)

EmeraldAmp PCR Master Mix (2×Premix) 1 ml×4
dH₂O 1 ml×4

SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (製品コード RR350A)

SapphireAmp Fast PCR Master Mix (2×Premix) 1 ml×4
dH₂O 1 ml×4

ワンランク上の逆転写酵素PrimeScript™ RTase とセットで至適化

RT-PCR Kit

PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2

PrimeScript™ RT-PCR Kit

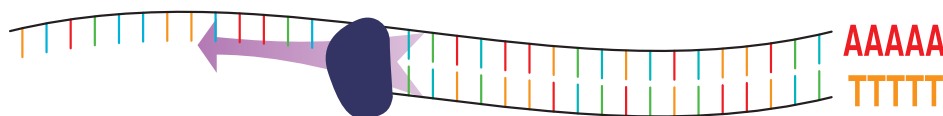
PrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit

PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit etc.

PrimeScript™ RTase

- 高品質のcDNA合成が可能
- 強いディスプレイメント伸長活性がポイント
- 42℃反応（mRNA分解を低減）
- 強固な高次構造RNAにも対応可能

polyA から最高品質のcDNA 合成を実現!!



効率よく RT-PCR を行うには・・・



PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2

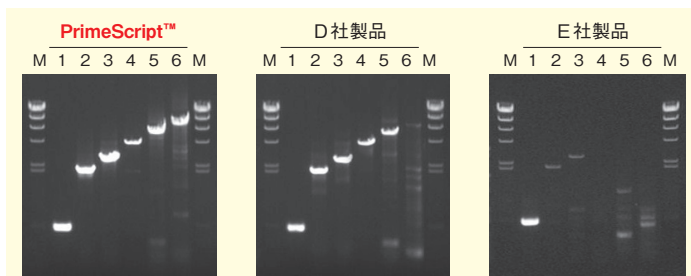
PrimeScript™ RTase と *TaKaRa Ex Taq*® HS を組み合わせて至適化した 1 ステップ RT-PCR 用キット。コンポーネントのプレミックス化で操作性も格段にアップしました。



PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Dye Plus)

上記キットに色素と比重増加剤もプレミックス。反応液はそのままアガロースゲル電気泳動にアプライ可能です。

■ 他社製品との性能比較



M : λ-Hind III digest

total RNA 1 μg を鋳型として、様々な長さのターゲットの 1 ステップ RT-PCR による増幅を、各社製品の推奨条件で行いました。PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 を用いた場合、8 kb までの良好な増幅が確認でき、その結果は他社製品の結果に勝るものでした。

鋳型：human total RNA

ターゲット：

レーン 1 : <i>TFRC</i>	0.5 kb	4 : <i>TFRC</i>	4.4 kb
2 : <i>CCND2</i>	2.1 kb	5 : <i>DMD</i>	6 kb
3 : <i>CCND2</i>	2.8 kb	6 : <i>DMD</i>	8 kb

(弊社比較データ)



PrimeScript™ RT-PCR Kit

PrimeScript™ RTase と *TaKaRa Ex Taq*® HS を組み合わせて至適化することで、優れた伸長性と高い増幅効率を実現します。

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2	50 回	RR055A	¥44,000
	200 回	RR055B (A × 4)	¥141,000
PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Dye Plus)	50 回	RR057A	¥44,000
	200 回	RR057B (A × 4)	¥141,000
PrimeScript™ RT-PCR Kit	50 回	RR014A	¥32,500
	200 回	RR014B (A × 4)	¥104,000

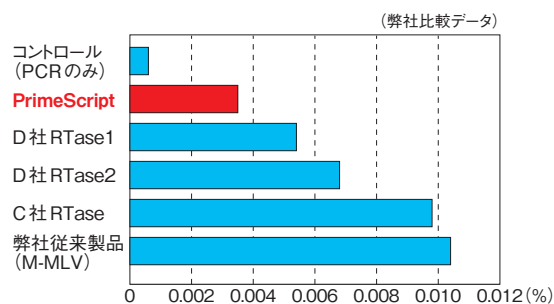
★Topic

逆転写酵素の正確性も、結構重要です！

さまざまな実験のスタートとなる逆転写反応ですが、その正確性は見逃されがちです。DNA 合成を何回も繰り返す PCR に比べ、一回の伸長反応である cDNA 合成のエラーは無視できると考えられてきましたが、正確性の高い PCR 酵素の出現により状況は変わりました。弊社では、total RNA を鋳型に各社逆転写酵素と弊社 High Fidelity PCR 酵素 PrimeSTAR® HS とによる RT-PCR を行い、その PCR 産物をクローニングして全配列を決定することで、逆転写反応の正確性が RT-PCR の正確性に及ぼす影響を評価しました。その結果、逆転写反応の正確性も RT-PCR の正確性に影響を与えること、比較した酵素の中で PrimeScript™ による逆転写反応の正確性が最も高いことがわかりました。

【方法】

各 RTase の推奨プロトコールに従い、ヒト胎盤由来 total RNA (100 ng) から Oligo dT プライマーで逆転写を行った。得られた cDNA 1 μl (total RNA 5 ng 相当) を鋳型として、PrimeSTAR®



HS で TFR 遺伝子 500 bp を増幅し、ベクターにクローニングした。複数クローンをランダムにピックアップしてそのシーケンスを確認し、総塩基数 (約 20 万塩基) 中のエラー塩基数の割合をエラー率とした。また、直接ゲノムから PrimeSTAR® HS で増幅を行ったものをコントロールとした。

正確性を追求する RT-PCR には・・・

2ステップ RT-PCR PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit

1ステップ RT-PCR PrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit

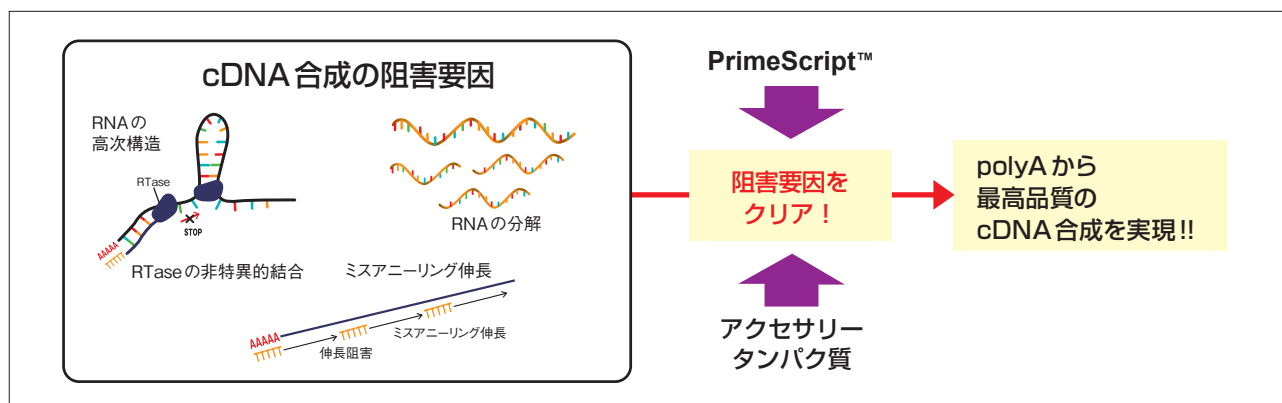
アクセサリタンパク質を添加した PrimeScript™ II RTase と、長鎖増幅や GC リッチターゲットに強い High Fidelity PCR 酵素 PrimeSTAR® GXL を組み合わせて RT-PCR に至適化したキットです。正確性を必要とする長鎖ターゲットの RT-PCR に最適です。

- 高い正確性で長鎖 cDNA も合成可能
- total RNA 使用量の許容範囲がさらにアップ

■ アクセサリタンパク質の添加によりパワーアップした PrimeScript™ II RTase

PrimeScript™ II RTase は、タカラバイオが独自に開発した PrimeScript™ RTase にアクセサリタンパク質を用いて更なる改良を加え、cDNA 合成の阻害要因を極限まで抑制した逆転写酵素です。PrimeScript™ II RTase を用いると、特に Oligo dT プライマーを利用する polyA から伸長反応において、RNA 分解の恐れのない 42℃ の反応で、バックグラウンドが非常に少ない、より高品質の完全長 cDNA 合成産物を得ることができます。もちろん、PrimeScript™ RTase が有する卓越した polyA の利用効率と合成スピードはそのまま保持しています。

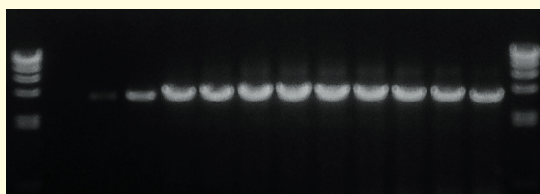
また、反応液調製時に生じるミスプライミングに起因する非特異的な伸長反応が完全に抑制されているため、反応液調製後、氷上に置いたまま反応開始までに時間を要しても cDNA 合成阻害は起こりません。



■ 非常に広い鋳型量許容範囲 (2ステップ RT-PCR)

PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit を用いる 2ステップ RT-PCR で、鋳型量許容範囲を検討しました。

HL60 細胞由来の total RNA (100 pg ~ 6 µg) を鋳型として、Oligo dT プライマーを用いた逆転写反応 (20 µl 反応系) を行い、その一部 (5 µl) を PCR (50 µl 反応系) に使用して TFR 4 kb を増幅したところ、6 µg / 20 µl 反応系まで逆転写反応に使用する total RNA を増やしても、良好な PCR 増幅が確認できました。



ターゲット：TFRC 4 kb

PCR の鋳型量：

左から total RNA 25 pg、250 pg、2.5 ng、25 ng、50 ng、125 ng、250 ng、500 ng、750 ng、1 µg、1.25 µg、1.5 µg 相当

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit	50 回	R023A	¥50,000
	200 回	R023B (A×4)	¥168,000
PrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit	50 回	R026A	¥50,000
	200 回	R026B (A×4)	¥168,000

アプリケーション

実験例 1 : Tks Gflex™を用いた ORF 全長の増幅

実験例 2 : Tks Gflex™を用いたクルードサンプルからの PCR

実験例 3 : 各種 PCR 酵素のリピート配列に対する正確性

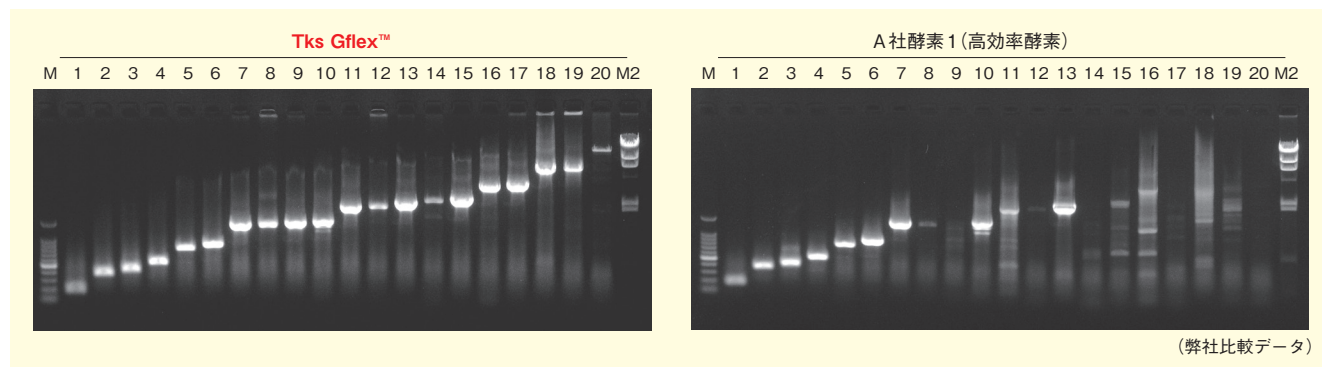
実験例 4 : 複数 DNA 断片の同時クローニング
(PrimeSTAR® Max & In-Fusion®)

実験例 5 : 様々なプライマーを用いて同一条件で PCR を行った場合の
TaKaRa Ex Taq® と *TaKaRa Taq™* の反応性の比較

実験例 6 : *TaKaRa Ex Taq®* を用いた PCR による胃生検材料からの
Helicobacter pylori の検出

■ 実験例 1 : Tks Gflex™を用いた ORF 全長の増幅

【方法】 ヒト心臓由来の total RNA から、PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (製品コード 6210A) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を調製した。この cDNA 2 μl (total RNA 500 ng 相当) を鋳型として、20 種類の遺伝子の ORF 全長を、pCMV-HA-C ベクターにクローニングするための In-Fusion 用プライマーと Tks Gflex™ DNA Polymerase または A 社高効率酵素を用いて PCR 増幅した (20 μl 反応系)。反応液組成および PCR 条件は各酵素の推奨プロトコールに従った。



No.	遺伝子名	鎖長 (bp)	GC (%)	No.	遺伝子名	鎖長 (bp)	GC (%)
1	PLN	159	39.6	11	KCNQ1	2,031	64.2
2	NKX2-5	339	68.4	12	DTNA	2,232	49.5
3	FABP3	402	50.0	13	JUP	2,238	62.2
4	MYL2	501	50.4	14	CEP85L	2,418	42.0
5	CMA1	744	52.2	15	PKP2	2,514	53.3
6	CITED2	813	63.8	16	KCNH2	3,480	65.9
7	GATA4	1,329	68.8	17	JAG1	3,657	54.0
8	MEF2C	1,392	49.4	18	MYH6	5,820	57.6
9	CD36	1,419	39.5	19	SCN5A	6,048	57.3
10	ADRB1	1,434	71.8	20	RYR2	14,904	46.2

Tks Gflex の PCR 条件 :

94℃ 1 分

↓

98℃ 10 秒

55 or 60℃ 15 秒

68℃ 30 秒 / kb

35 サイクル

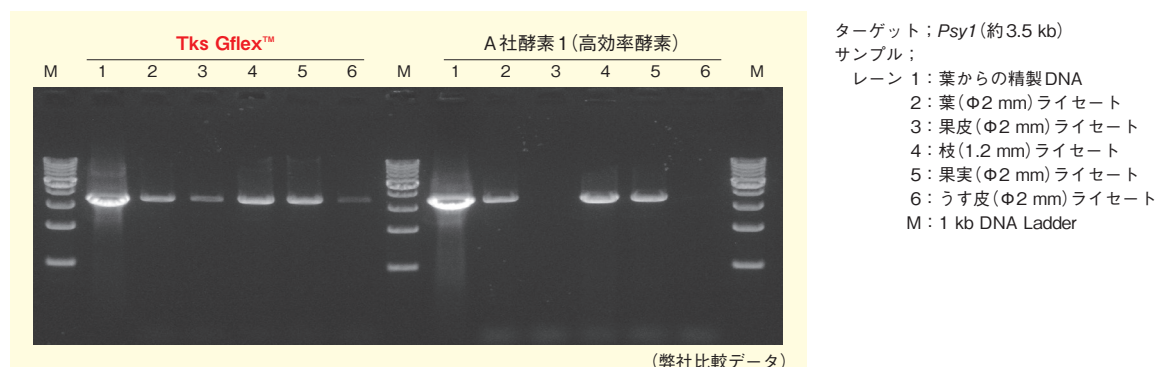
M : 100 bp DNA Ladder
M2 : λ-Hind III digest

★優れた伸長性と高い特異性を兼ね備えた Tks Gflex™を用いることで、0.1～15 kb まで 20 種類すべてのターゲット ORF をほぼ単一バンドで増幅することができました。

■ 実験例 2 : Tks Gflex™を用いたクールドサンプルからの PCR

【方法】 温州ミカンの各部位から簡易抽出法を用いて調製したサンプルライセート溶液 (※) 1.25 μl を鋳型に、Tks Gflex™ DNA Polymerase または A 社高効率酵素を用いて PCR を実施した (25 μl 反応系)。

※各サンプルに Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% SDS) と Proteinase K を加え、60℃ 5 分→98℃ 2 分処理後、遠心して得たライセートを PCR に使用した。



ターゲット ; Psy1 (約 3.5 kb)
サンプル ;
レーン 1 : 葉からの精製 DNA
2 : 葉 (Φ2 mm) ライセート
3 : 果皮 (Φ2 mm) ライセート
4 : 枝 (1.2 mm) ライセート
5 : 果実 (Φ2 mm) ライセート
6 : うす皮 (Φ2 mm) ライセート
M : 1 kb DNA Ladder

★Tks Gflex™を用いることで、植物由来のクールドライセートを鋳型とした場合でも高効率な PCR 増幅が可能です。

アプリケーション

■ 実験例3：各種PCR酵素のリピート配列に対する正確性

【方法】 $-(GA)_8-$ のリピート配列を含む500 bpの領域 (λ DNA由来の配列にリピート配列を挿入) を各種酵素でPCR増幅後ベクターにクローニングし、複数クローンをピックアップして配列決定することによりリピート配列に生じるエラーを解析した。

リピート配列 $-(GA)_8-$

(弊社比較データ)

	Clone数	Mutation			変異数	変異率
		-2(GA)	-1(GA)	+1(GA)		
Taq DNA Polymerase	261	3	21	2	26	10.00%
PrimeSTAR® HS	250	5	25	2	32	12.80%
PrimeSTAR® Max	201	0	5	0	5	2.49%
PrimeSTAR® GXL	167	0	4	0	4	2.40%
A社酵素2(α型)	131	2	15	1	18	13.74%
A社酵素3(α型)	172	2	15	9	26	15.12%

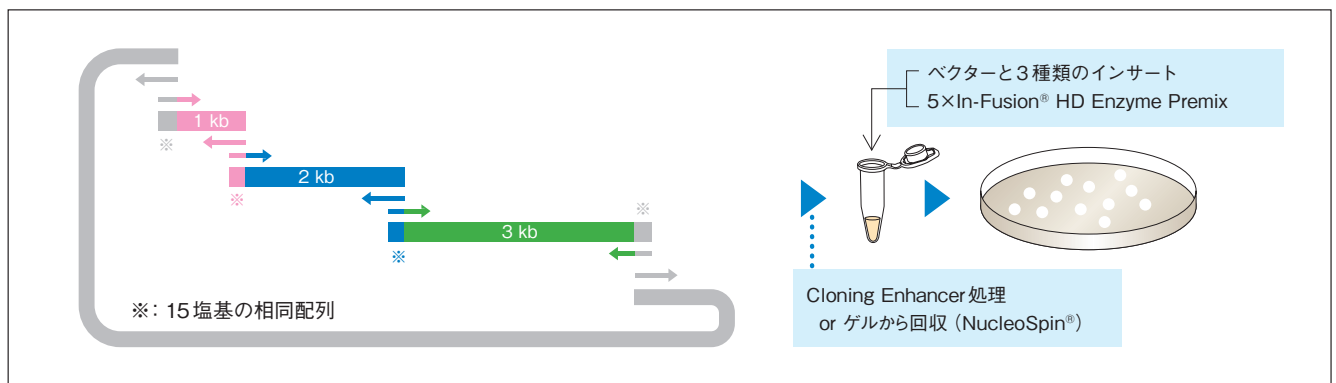
※酵素のスリッピングによるリピート配列の複製エラーは、校正活性 (3'-5' exonuclease 活性) では修復できません。

したがって校正活性を持ち高正確性を謳う α 型 DNA polymerase であっても、リピート配列複製の正確性は校正活性を持たない Taq DNA polymerase に比べて優れているとは限りません。

★伸長因子により Processivity が大きく向上している PrimeSTAR® Max と PrimeSTAR® GXL は、リピート配列に対する正確性が優れていました。

■ 実験例4：複数DNA断片の同時クローニング(PrimeSTAR® Max & In-Fusion®)

【方法】 1 kb、2 kb、3 kb の3つのインサートDNA断片および2.7 kbのベクター全長をそれぞれPrimeSTAR® MaxでPCR増幅し、In-Fusion® HDを用いてディレクショナルクローニングを行った。コンピテントセルには高い形質転換能力を持つ *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128) を使用し、青/白選択した。



インサートサイズ(kb)	形質転換コロニー数 (1/5量塗布)	正しい形質 転換体の割合
1 kb + 2 kb + 3 kb	192	7/10

3つのDNA断片 (1 kb, 2 kb, 3 kb) を同時にクローニングし、ランダムにピックアップした10クローンについて、コロニーPCRを行いインサートを確認したところ、7クローンで1 kb + 2 kb + 3 kbの正しい挿入が確認できました。

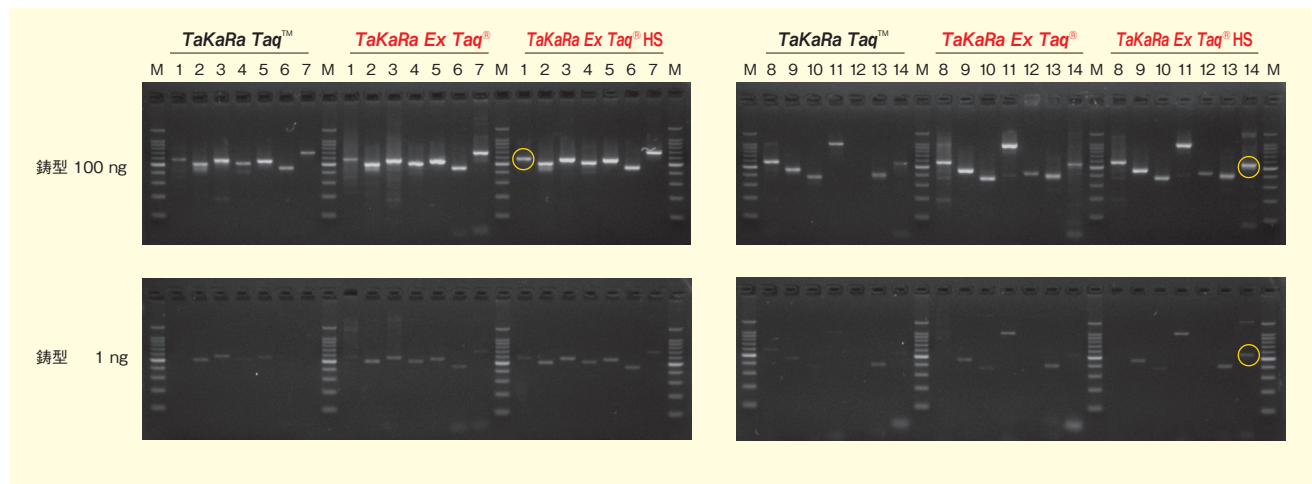
★5秒/kbの伸長能をもつPrimeSTAR® Max DNA Polymeraseは、**5 kbのPCR増幅が約60分(※)で完了**します。
PCR増幅→増幅確認→In-Fusion反応→トランスフォーメーションまでのクローニング操作もおおよそ3時間で終了です！
クローニングしたい目的DNA断片の増幅はもちろん、PCR増幅によるベクターの線状化にもおすすめです。

※PrimeSTAR MaxのPCR条件
98℃ 10秒
55℃ 5 or 15秒
72℃ 5秒/kb
30サイクル

注：鋳型によっては1分/kbの伸長反応が必要です。詳しくはPrimeSTAR Maxの説明書をご確認ください。

■ 実験例5：様々なプライマーを用いて同一条件でPCRを行った場合の *TaKaRa Ex Taq*[®] と *TaKaRa Taq*[™] の反応性の比較

【方法】 ヒトゲノムDNAを鋳型に、1 kb前後のターゲット14種類に対しT_m値を考慮せず無作為に作製したプライマーを用いて、同一条件下で *TaKaRa Ex Taq*[®]、*TaKaRa Ex Taq*[®] HS、または *TaKaRa Taq*[™] によるPCRを行い、増幅成功率、増幅効率を比較した。



鋳型：ヒトゲノムDNA (50 μ l 反応系)
装置：TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient

PCR条件：98℃ 10秒
55℃ 30秒
72℃ 30秒 } 30サイクル

3% NuSieve 3:1 Agarose (Lonza社)
3 μ l アプライ
M：100 bp DNA Ladder

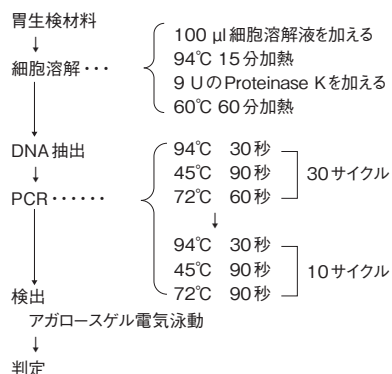
★*TaKaRa Taq*[™]に比べ、*TaKaRa Ex Taq*[®]、*TaKaRa Ex Taq*[®] HSを用いたPCRではターゲット増幅の成功率、増幅産物の収量とも高い結果が得られました。また、○印ではHot Start PCRの効果が見られます。
TaKaRa Ex Taq[®]、*TaKaRa Ex Taq*[®] HSは汎用性が高く、非常に使いやすいPCR酵素です。

■ 実験例6：*TaKaRa Ex Taq*[®]を用いたPCRによる胃生検材料からの *Helicobacter pylori* の検出

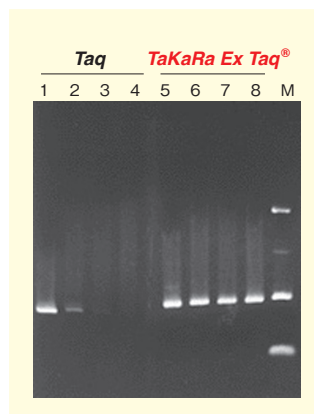
1983年、Marshall & Warrenによって発見された *Helicobacter pylori* は胃炎の原因菌で、発見以来、胃潰瘍をはじめとする種々の胃疾患との関連が注目されています。*H. pylori* の発育は非常に遅く、培養での分離には1週間を要しますが、PCRを用いれば開始から遅くとも7時間後には結果を判定することができます。しかし、胃炎患者より採取された胃生検材料を用いてPCR検出を行う場合、通常の *Taq* DNA Polymeraseを用いたPCRでは非常に増幅が難しい鋳型DNAが存在します。

以下のデータは神戸市環境保健研究所細菌部の黒川 学先生よりご提供いただいたもので、胃生検材料から増幅を行う場合の増幅感度を、*TaKaRa Ex Taq*[®] と通常の *Taq* DNA Polymerase で比較したデータです。

【操作】



【結果】



レーン 1, 5 : *H. pylori* NCTC11637
2, 6 : 胃生検 (1)
3, 7 : 胃生検 (2)
4, 8 : 胃生検 (3)

★従来の *Taq* DNA Polymerase ではバンドがほとんど認められない検体でも、*TaKaRa Ex Taq*[®] を用いることで明確なバンドを確認することができました。

Q & A

— 快適な PCR のために —

ユーザーの皆様からよくお問い合わせいただく質問を Q&A 形式でまとめました。
PCR を効率よく行い、より良い結果を得るために是非お役立てください。

PCR の基礎編

推奨酵素編

トラブルシューティング編

PCR の基礎編

Q1 プライマー設計で注意することは？

A1 以下の点を考慮してプライマーを設計してください。

- 通常は 20~30 mer のプライマーを使用します。PCR 条件に適した Tm 値のプライマーを設計することが大切です。詳細は各製品の取扱説明書をご参照ください。
- 10 kb 以上の長鎖を増幅する場合、25~35 mer のプライマーで良い結果が得られる場合があります。また、Tm 値(下記の式^{*1}で計算)が 65℃ 以上になるようにプライマー設計ソフト^{*2}を利用して設計することをお勧めします。
- GC 含量が 50~60% となるようにし、プライマーの 3' 側 10 塩基の GC 含量が高くないように配慮することで、より特異的な増幅が期待できます。また、3' 末端の塩基はミスプライミングの頻度が高い T を避けることをお勧めします。
- Forward プライマーと Reverse プライマーがアニーリングしないように設計してください。特に 3' 末端で 3 塩基以上が相補的な配列にならないように注意してください。また、Forward プライマーと Reverse プライマーの Tm 値はなるべく揃うように設計してください。
- プライマー内での二次構造形成を避けるため、自己相補的な配列を含まないよう注意してください。
- GC リッチなターゲットの場合、Tm 値が 60℃ を超えるプライマーを推奨します。

- 異なるプライマー対を用いた複数の増幅反応を同一条件で行いたい場合は、使用酵素、PCR 条件に合わせて Tm 値が適切になるよう各プライマーを設計することをお勧めします。

^{*1} Tm 値の計算方法 : $Tm(℃) = 2(nA + nT) + 4(nC + nG) - 5$
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 を超える場合はプライマー設計ソフトを利用して Tm 値を算出することをお勧めします。

^{*2} プライマー設計用ソフト

Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)
OLIGO Primer Analysis Software(Molecular Biology Insights社)

Q2 最適な鋳型量は？

A2 ゲノム DNA やプラスミド DNA、逆転写産物など用いる鋳型の種類によって、PCR に適した鋳型量は異なります。特に PrimeSTAR HS DNA Polymerase の場合には、過剰量の鋳型が増幅を阻害する傾向がありますのでご注意ください。また、PrimeSTAR Max DNA Polymerase については鋳型の種類や量、質に応じて反応条件を調整することにより柔軟に対応することが可能です。

以下に標準的な鋳型推奨量を示します。

(50 µl 反応系)

- ヒトゲノム DNA : 5~200 ng
- *E. coli* 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

Q3 PCR条件で注意することは？

A3 以下の点を考慮してください。

●PCRサイクル前のプレヒート(初期変性)について

MightyAmp DNA Polymeraseには98℃までポリメラーゼ活性を抑制する強力な抗体を使用しているため、98℃ 2分のプレヒートが必要です。

上記以外のタカラバイオのPCR酵素では活性化のためのプレヒートは必要ありません。ゲノムDNA等の複雑な鋳型の変性のために必要に応じてプレヒートを行う場合も、94℃ 1分で十分です。過度の加熱処理は酵素失活の原因となります。

●変性条件について

変性条件はサーマルサイクラーの機種とチューブの種類を考慮して設定してください。設定の目安としては94℃の場合は20~30秒、98℃の場合は5~10秒です。

より耐熱性に優れるPrimeSTARシリーズの場合は、98℃ 5~10秒の高温短時間の変性条件をお勧めします。

TaKaRa Taq HS Perfect MixおよびTaKaRa Taq HS Low DNAの場合、変性条件は必ず94℃ 5秒に設定してください。95℃以上の設定では、酵素の失活による反応性低下が起こり、増幅産物が得られない場合があります。

●アニーリング条件について

アニーリング条件により増幅効率と増幅の特異性が変化します。プライマーのTm値に対し低すぎるアニーリング温度を設定すると、ミスプライミングに起因する非特異的増幅産物やスミアが増加し、目的増幅産物が減少する場合があります。プライマーのTm値に対し高すぎるアニーリング温度を設定すると、プライミング効率が低下し目的増幅産物が減少します。プライマーのTm値を考慮してアニーリング温度を調整したり、2 step PCRを行うことにより増幅の効率や特異性をより改善できる場合があります。

Taqシリーズの場合、アニーリング時間は30秒をお勧めします。プライミング効率に優れるPrimeSTARシリーズの場合は、5~15秒の短いアニーリング時間に設定することが重要です。アニーリング時間が長すぎるとミスプライミングに起因する非特異的増幅産物やスミアが現れる場合があります。

1 kb以下の短い鎖長を増幅する場合、3 step PCRをお勧めします。GCリッチなターゲットや10 kbを超える長鎖を増幅する場合には、2 step PCRをお勧めします。

●伸長時間について

通常、伸長時間は1分/kbを目安として設定します。

高速反応用のSpeedSTARやSapphireAmp Fastでは、10秒/kbの設定が可能です。

タカラバイオ独自の伸長因子を含有するPrimeSTAR MaxとPrimeSTAR GXLでは、5~20秒/kbの高速反応が可能です。また、伸長時間を1分/kbに設定することにより、より高濃度の鋳型に対してPCR増幅可能となります。

Tks Gflex DNA Polymeraseは、30秒/kbの設定が可能です。ただし、クールドサンプルから増幅する場合は伸長時間を1分/kbに設定してください。

推奨酵素編

Q4 正確性に優れた酵素は？

A4 PrimeSTARシリーズの酵素は、いずれもHigh Fidelity PCR酵素の標準である*Pfu* DNA Polymeraseの正確性を上回ります。

中でもPrimeSTAR Max DNA Polymeraseは究極の正確性を示し、pUC119全長をPCR増幅した産物をクローニング後、配列解析を行った結果、370,656塩基中変異はわずか4塩基でした(エラー率0.00108%)。

さらに本酵素は他の酵素に比べ、リピート配列に対する複製の正確性が格段に向上しており、類似配列における鋳型の交換反応(キメラ分子の形成)の頻度が低い酵素です(アプリケーションの実験例3、あるいはBIO VIEW 55号 参照)。

Q5 GC含量が高いターゲット配列の増幅に最適な酵素は？

A5 以下の順番で酵素を選択してください。

●1st Choice

細菌ゲノムDNAなどGC含量が高いと予想されるターゲット配列にはTks Gflex DNA Polymeraseが有効です。GC含量が70%を超えるGCリッチな領域に対しても、優れた反応性を示し、よりバックグラウンドの少ない特異性の高い増幅が可能です。

●2nd Choice

エラーの少ない正確性に優れた増幅を要求される場合は、PrimeSTARシリーズの中で最もGCリッチな鋳型に強いPrimeSTAR GXLが有効です。

●3rd Choice

ターゲットによっては、TaKaRa LA Taq with GC Bufferが適している場合があります。GC Buffer I、GC Buffer IIの順でお試ください。GC Buffer Iを用いた場合、長い領域の増幅が可能です。

一方、GC Buffer IIは増幅サイズには限界がありますが、複雑で強固な高次構造を持つ鋳型をターゲットとする場合に有効です。

Q6 長鎖の増幅に適した酵素は？

A6 6 kbを超える鎖長を正確に増幅したい場合には、Tks Gflex DNA PolymeraseまたはPrimeSTAR GXLの使用をお勧めします。これらの酵素では、ヒトゲノムDNAを鋳型とした場合、30 kbの増幅を確認しています。これらの酵素で増幅しない場合やより高い増幅効率を求める場合はTaKaRa LA Taqをお勧めします。

Q7 短時間でPCRを終了するのに適した酵素は？

A7 PrimeSTAR Max、PrimeSTAR GXL、SapphireAmp Fastがお勧めです。タカラバイオ独自の伸長因子を含有しプライミング効率に優れたPrimeSTAR Maxは伸長時間を5秒/kb、アニーリング時間を5秒に設定することができ、世界最高レベルの反応速度を実現できます。PrimeSTAR GXLは高速PCRプロトコルにより10秒~20秒/kbに伸長時間を設定できるため、長鎖の増幅においても極めて短時間でPCR増幅が可能です。SapphireAmp Fastは反応効率に優れ、10秒/kbの伸長時間の設定で確実にPCR増幅ができます。

Q8 AT含量が高いターゲット配列を増幅する場合に最適な酵素は？

A8 イントロンを含むゲノムDNAなどAT含量が高いと予想されるターゲット配列にはTks Gflex DNA Polymerase、*TaKaRa Ex Taq*、*TaKaRa LA Taq*、PrimeSTAR GXL DNA Polymeraseが有効です。まずは、Tks Gflex DNA Polymeraseをお試しください。局所的にATリッチ領域が存在し全体のAT含量が60%を超えるため他のPCR酵素で増幅できないターゲットを増幅した実績があります。正確性が要求される増幅においてはPrimeSTAR GXLをお勧めします。添付のバッファーを用いた標準的な反応において、PrimeSTARシリーズの中で最もATリッチな鋳型に強い酵素です。ただし、バイサルファイト処理したDNAなどウラシルを含む鋳型は使用できません。

Q9 バイサルファイト処理したDNAの増幅に使用できる酵素は？

A9 TaKaRa EpiTaq HS (for bisulfite-treated DNA)をご使用ください。本酵素ではマグネシウム濃度やdNTP濃度を調整することにより増幅効率、反応特異性を調節できるため、これまで増幅できなかったターゲットに関しても良好な増幅を行うことができます。

なお、Methylation Specific PCR (MSP) 解析を行う場合には、MSP専用試薬 EpiScope MSP Kit (製品コード R100A/B) をご使用ください。

Q10 PCR阻害物質に強い酵素は？

A10 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サンプルからのPCR増幅には、Tks Gflex DNA Polymerase、MightyAmp DNA Polymerase Ver.3が最適です。Tks Gflex DNA PolymeraseはGCリッチ、ATリッチを問わず広範なターゲットを効率よく増幅します。MightyAmp Ver.3は血液サンプルなどからのダイレクトPCRも可能です。正確性を求める場合には、PrimeSTAR GXLをお勧めします。標準プロトコルでも増幅が可能ですが、PrimeSTAR GXLを2倍量使用することによりさらに反応性が改善される場合があります。これらの酵素で増幅産物が得られない場合は鋳型DNAの純度を上げる必要があります。

Q11 多サンプルの電気泳動解析に適したPCR酵素は？

A11 完全プレミックスタイプのためPCR反応液の調製が簡単で、反応後は直接アガロースゲル電気泳動にアプライできるEmeraldAmp MAX PCR Master Mix、EmeraldAmp PCR Master MixおよびSapphireAmp Fast PCR Master Mixがお勧めです。EmeraldAmpシリーズは高性能タイプで、GCリッチ、ATリッチ等にかかわらず、広範な鎖長のターゲットを特別なPCR条件設定を行うことなく増幅可能です。一方、SapphireAmp Fast PCR Master Mixは高速PCRに対応しており、迅速なPCR判定が可能です。

Q12 コロニーPCRに適した酵素は？

A12 菌体(核酸)持ち込み量の影響を受けにくく、またPCR反応液を直接アガロースゲル電気泳動にアプライできるEmeraldAmp PCR Master Mix、EmeraldAmp MAX PCR Master Mix およびSapphireAmp Fast PCR Master Mixがお勧めです。

Q13 イノシン含有プライマーを使用する際の注意点は？

A13 MightyAmp DNA Polymerase、*TaKaRa Taq* および *TaKaRa Taq* Hot Start Versionは、イノシンを含むプライマーが使用可能です。3'→5' exonuclease活性をもつPCR酵素(PrimeSTAR HS DNA Polymerase、PrimeSTAR Max DNA Polymerase、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase、Tks Gflex DNA Polymerase、*TaKaRa Ex Taq*、*TaKaRa LA Taq*など)を用いる場合、イノシンが含まれるプライマーを使用すると反応性が著しく低下しますのでご注意ください。これらのPCR酵素で混合プライマーが必要な増幅には、degeneratedプライマーを使用してください。

Q14 マルチプレックスPCRに適した酵素は？

A14 Multiplex PCR Assay Kit Ver.2をお勧めします。プライマー設定や反応条件の至適化といった煩雑な作業を必要とせず、最小限の検討でマルチプレックスPCRを行うように調製されたキットです。

Q15 各酵素での増幅産物の末端形状は？
また、最適なクローニング方法は？

A15 酵素の種類に応じて以下のようにクローニングを行ってください。

●PrimeSTARシリーズおよびTks Gflex DNA Polymeraseの場合

PrimeSTARシリーズのDNA PolymeraseやTks Gflex DNA Polymeraseは非常に強い3'→5'exonuclease活性を有するので、増幅産物のほとんどが平滑末端となります。Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード

6027)を用いて、平滑末端ベクターにクローニングしてください。Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (製品コード 6019)を用いれば、Tベクターにクローニングすることもできます。

- **TaqシリーズおよびMightyAmp DNA Polymeraseの場合**
TaKaRa Taq、*TaKaRa Ex Taq*、*TaKaRa LA Taq*、SpeedSTAR HS、EmeraldAmp、SapphireAmp Fast、およびMightyAmpによる増幅産物のほとんどは、3'末端にdAのオーバーハングを有しますので、Tベクターへのクローニングが可能です。Mighty TA-cloning Kit (製品コード 6028)をご利用ください。もちろん、Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End)を用いて、末端平滑化およびリン酸化を行って平滑末端ベクターにクローニングすることもできます。

トラブルシューティング編

Q16 増幅産物が全く得られない。 何から検討すればいいか？

A16

● 各酵素共通

プライマーの配列、長さ、GC含量を適切にしてください。20 merより短いプライマーの場合、シャトルPCR(2ステップPCR)では増幅が難しい場合があります。ForwardとReverseのプライマーのTm値が5℃以上異なる場合、うまく増幅しない場合があります。低い方のプライマーのTm値を基準としてアニーリング温度を設定し直すことで改善できる場合があります。純度の低い鋳型や阻害物質を含む鋳型は増幅が難しい場合があります。そのような場合、Tks Gflex DNA Polymerase、MightyAmp DNA Polymerase Ver.2などのPCR阻害物質に強い酵素を用いると改善される場合があります。反応液量を適切に設定してください。サーマルサイクラーとPCRチューブの組み合わせによっては、10 µl以下の少ない反応液量では増幅が起りにくい場合があります。

● PrimeSTAR HS DNA Polymeraseの場合

適切な鋳型量に変更してください。鋳型がゲノムDNAやcDNAライブラリーの場合は、反応液量が50 µlのときに添加する鋳型量を約100 ng以下にして再度お試しください。伸長時間を1分/kb以上に設定してお試しください。プライマー濃度を上げることで改善する場合があります。

● PrimeSTAR Max DNA Polymeraseの場合

鋳型量が多い場合には伸長時間を変更してください。50 µl反応液中の核酸量が200 ngを超える場合、伸長時間は30～60秒/kbを目安として設定してください。プライマー濃度を上げることで改善する場合があります。

● PrimeSTAR GXL DNA Polymeraseの場合

通常の設定は1分/kbですが、短鎖(<1 kb)を増幅する場合は伸長時間を短く10秒(～30秒)に設定してください。

● SpeedSTAR HS DNA Polymeraseの場合

通常の設定は10秒/kbですが、ヒトゲノムDNA等の複雑な鋳型の場合には伸長時間を30秒/kb程度に設定してお試しください。

● MightyAmp DNA Polymerase Ver. 3の場合

強力なホットスタート抗体を使用しているため、必ず98℃、2分の初期変性を行ってください。

● Tks Gflex DNA Polymeraseの場合

通常の設定は30秒/kbですが、クールドサンプルからの増幅や、増幅産物が得られない場合には伸長時間を1分/kbに設定してお試しください。

プライマー濃度を上げることで改善する場合があります。

● TaKaRa Taq HS Perfect MixおよびTaKaRa Taq HS Low DNAの場合

変性温度は必ず94℃に設定してください。95℃以上の設定では酵素の失活による反応性低下が起こり、増幅産物が得られない場合があります。

Q17 非特異的増幅やスミアが見られる。 どこを変えればいい？

A17

● 各酵素共通

特異性の高いプライマーを使用してください。プライマー使用量、酵素量、鋳型量は適切か、伸長時間の設定が長すぎないかを確認してください。アニーリング温度を2℃ずつ上げてお試しください。2ステップPCRが有効な場合もあります。鋳型が微量な場合には、Nested PCRも有効です。

● PrimeSTAR HS DNA PolymeraseとPrimeSTAR Max DNA Polymeraseの場合

3ステップPCRのアニーリング時間の設定を確認してください。特異的な増幅を行うためにはアニーリング時間を短く設定する(5秒あるいは15秒/kb)ことが非常に重要です。

● PrimeSTAR GXL DNA Polymeraseの場合

1 kb以下の増幅を行う場合、プライマーをTm値が55℃を超えるように設計し、アニーリング温度を60℃に設定して反応してください。プライマーのTm値が55℃以下の場合は、伸長時間を5秒～10秒/kbまで短縮してお試しください。

● TaKaRa Ex Taq、TaKaRa LA Taqの場合

プライマーによってはPCR酵素をHot Start Versionに変更することで、著しく改善する場合があります。

● SpeedSTAR HS DNA Polymeraseの場合

伸長時間を必要以上に長く設定するとスミアが生じる場合があります。10～20秒/kbを目安に設定してください。増幅量が少ない場合には、5サイクル程度増やしてお試しください。

● Tks Gflex DNA Polymeraseの場合

伸長時間を必要以上に長く設定するとスミアが生じる場合があります。特に増幅サイズが短い場合(1 kb以下の場合)、10～20秒/kbまで短縮してお試しください。

目的にあわせてお選びください！

エンドポイントPCR装置

A4サイズに収まるコンパクトなサーマルサイクラー

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® **Touch**

コンパクトボディの中にワイドタッチパネルやハイスペックブロックモジュールを搭載した、多機能で高性能な96ウェルタイプの標準的なサーマルサイクラーです。

タッチダウンPCR、ロングレンジPCRなどの設定もでき、様々な条件でのPCRが可能です。



- ◆ 大きくて入力しやすい7インチカラータッチパネルを採用
- ◆ 最大24℃の温度勾配が設定可能なグラジエント機能を搭載
- ◆ 横幅 18 cm×奥行 28.5 cm、重量 5.0kgの超コンパクト設計

製品コード	価格(税別)
TP350	¥580,000

信頼と実績のスタンダードサーマルサイクラー

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® **Gradient**



- ◆ 4段階可動式操作パネルの採用により使いやすい角度に設定可能
- ◆ 最大20℃の温度勾配が設定可能なグラジエント機能を搭載

製品コード	価格(税別)
TP600	¥550,000

【仕様】

製品名	Dice Touch	Dice Gradient
製品コード	TP350	TP600
価格	¥580,000	¥550,000
外形寸法(mm)	180(W) × 285(D) × 205(H) (リッド収納時)	260(W) × 345(D) × 260(H) (パネル収納時)
重量	5.0 kg	11.5 kg
定格電源電圧	AC 100~240V、50/60Hz 5 A(100 V時)	AC 100~240 V、50/60 Hz 4.9 A(100 V時)
加熱冷却方式	ペルチェ素子	ペルチェ素子
加熱速度	最大3.0℃/秒	最大3.0℃/秒
冷却速度	最大2.5℃/秒	最大2.0℃/秒
搭載ブロック	0.2 ml × 96 アルミブロック	0.2 ml × 96 アルミブロック
温度精度	±0.5℃ (30.0~99℃)	±0.5℃ (30.0~99.9℃) ±2.0℃ (4.0~15.0℃)
温度均一性	±0.3℃ (30.0~99℃)	±0.5℃ (30.0~99.9℃)
温度設定範囲	4.0~99℃	4.0℃~99.9℃
反応液量	5~100 µl (推奨10~50 µl)	5~150 µl
プログラム容量	内蔵メモリに10,000以上 USBメモリ使用可能	最大200
グラジエント機能	12段階(最大温度幅24℃)	12段階(最大温度幅20.0℃)
ディスプレイ	7インチ カラータッチパネル(感圧式)	ブルー/ホワイトドットマトリックスLCD (240×64ドット)

各装置の実機を用いるデモンストレーションを受付中です。ご希望の方は弊社支店、弊社販売店までお問い合わせください。

【チューブおよびプレート】

キャップ付き0.2 ml シングルチューブ

製品名	包装量	製品コード	価格(税別)
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap	1,000 本	NJ200	¥9,350
0.2ml Single-Tube Dome Cap	1,000 本	NJ204	¥6,600
0.2ml Single-Tube Flat Cap	1,000 本	NJ205	¥6,600

0.2 ml シングルチューブ		Dice Gradient (TP600)	Dice Touch (TP350)
製品名	製品コード	対応液量※1	対応液量※1
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap	NJ200	5~50 µl	5~50 µl
0.2ml Single-Tube Dome Cap	NJ204		
0.2ml Single-Tube Flat Cap	NJ205		

※1：少ない液量でPCRを行う場合は反応結果が安定しない場合があります。Dice Gradientは最大150 µl、Dice Touchは最大100 µlまで装置の液量設定で入力可能です。対応液量を超える液量で使用する場合は、温度保持時間が通常より長く必要になることがあります。

0.2 ml 8連チューブ&8連キャップ

製品名	包装量	製品コード	価格(税別)
0.2 ml Hi-8-Tube	8連 × 125 本	NJ300	¥16,500
0.2 ml Hi-8-Dome Cap	8連 × 125 本	NJ301	¥4,400
0.2 ml Hi-8-Flat Cap	8連 × 125 本	NJ302	¥4,400
TaKaRa PCR Micro Strip 8-Tube	8連 × 120 本	9148	¥28,600
TaKaRa PCR Micro Strip 8-Cap	8連 × 120 本	9149	¥6,600

【注意】 NJ300にはNJ301またはNJ302を、9148には9149を組み合わせでご使用ください。

0.2 ml 8連チューブ&キャップ		Dice Gradient (TP600)			Dice Touch (TP350)		
製品名	製品コード	5 µl	10 µl	50 µl	5 µl	10 µl	50 µl
0.2 ml Hi-8-Tube	NJ300	△	—	◎	×	◎	◎
0.2 ml Hi-8-Dome Cap	NJ301						
0.2 ml Hi-8-Tube	NJ300	△	—	◎	△	◎	◎
0.2 ml Hi-8-Flat Cap	NJ302						
PCR Micro Strip 8-Tube	9148	—	◎	◎	—	—	—
PCR Micro Strip 8-Cap	9149						

◎：安定した増幅を示した。
△：ウェルごとの増幅に多少のばらつきがみられ、反応液の蒸発がみられた。
×：不適
—：未検討

プレート&8連キャップ

製品名	包装量	製品コード	価格(税別)
0.2ml 96well-plate for Real Time (Frosted)	10 plates	NJ401	¥5,000
Flat Cap for PCR Plate	125 strips	NJ402	¥12,000
96 well snap plate	10 plates	NJ710	¥7,150
Flat cap for snap plate	120 strips	NJ720	¥6,380

	専用Cap	適応PCR Thermal Cycler
0.2ml 96well-plate for Real Time (Frosted)※2 (製品コード NJ401)	Flat Cap for PCR Plate※2 (製品コード NJ402)	Diceシリーズ (TP600/TP350)
96 well snap plate (製品コード NJ710)	Flat Cap for snap plate (製品コード NJ720)	Diceシリーズ (TP600/TP350)

【注意】 各チューブ、各プレートには必ず専用Capを使用してください。専用品以外のCapやシールを使った場合、反応液が蒸発する場合があります。

※2：NJ401 およびNJ402は、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient(製品コード TP600)、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch(製品コード TP350)で使用できることを確認しています。

<製品一覧>

本ガイドでご紹介した製品のうち、主要なものを一覧にまとめています。

		製品名	容量	製品コード	価格(税別)
高い成功率！ 様々な場面に Tks Gflex™	Tks Gflex™ DNA Polymerase		250 U	R060A	¥31,500
			1,000 U (A×4)	R060B	¥101,000
	Tks Gflex™ DNA Polymerase Low DNA		100回	R091A	¥24,000
高正確性PCR酵素 PrimeSTAR®シリーズ	PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase		250 U	R050A	¥37,000
			1,000 U (A×4)	R050B	¥110,000
	PrimeSTAR® Max DNA Polymerase		100回	R045A	¥31,500
			400回	R045B	¥101,000
	PrimeSTAR® HS DNA Polymerase		250 U	R010A	¥31,500
			1,000 U (A×4)	R010B	¥101,000
パワフルなPCR クルードサンプルに	MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3		250 U	R076A	¥34,000
			1,000 U (A×4)	R076B	¥108,000
	MightyAmp™ Genotyping Kit		200回	R074A	¥52,500
(基本のPCR) TaKaRa Ex Taq®シリーズ	TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version		250 U	RR006A	¥31,500
			1,000 U (A×4)	RR006B	¥101,000
	TaKaRa Ex Taq®		250 U	RR001A	¥30,000
			1,000 U (250 U×4)	RR001B	¥97,000
			3,000 U (B×3)	RR001C	¥260,000
	TaKaRa Ex Taq® (Mg ²⁺ free Buffer)		250 U	RR01AM	¥30,000
			1,000 U (AM×4)	RR01BM	¥97,000
			3,000 U (AM×12)	RR01CM	¥260,000
(基本のPCR) TaKaRa LA Taq®シリーズ	TaKaRa LA Taq® Hot Start Version		125 U	RR042A	¥29,000
			500 U (A×4)	RR042B	¥93,000
	TaKaRa LA Taq®		125 U	RR002A	¥27,500
			500 U (A×4)	RR002B	¥88,000
	TaKaRa LA Taq® with GC Buffer		125 U	RR02AG	¥27,500
			500 U (AG×4)	RR02BG	¥88,000
(基本のPCR) TaKaRa Taq™シリーズ	TaKaRa Taq™ Hot Start Version		250 U	R007A	¥29,000
			1,000 U (A×4)	R007B	¥92,000
	TaKaRa Taq™		250 U	R001A	¥27,500
			1,000 U (250 U×4)	R001B	¥88,000
			3,000 U (B×3)	R001C	¥231,000
	TaKaRa Taq™ (Mg ²⁺ free Buffer)		250 U	R001AM	¥27,500
			1,000 U (AM×4)	R001BM	¥88,000
			3,000 U (AM×12)	R001CM	¥231,000
	TaKaRa Taq™ HS Perfect Mix		100回	R300A	¥10,500
			400回 (A×4)	R300B	¥33,500
	TaKaRa Taq™ HS Low DNA		100回	R090A	¥16,000
キャリアオーバー防止	TaKaRa Taq™ Hot PCR Kit, UNG plus		50回	R013S	¥20,000
			200回	R013A	¥63,800
マルチプレックスPCR用	Multiplex PCR Assay Kit Ver.2		100回	RR062A	¥34,000
			400回 (A×4)	RR062B	¥109,000
バイサルファイト処理済 DNA用	TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA)		250 U	R110A	¥33,000
			1,000 U (A×4)	R110B	¥99,000
Dye入りプレミックス試薬	EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix		160回	RR320A	¥6,700
			160回	RR300A	¥17,000
	EmeraldAmp® PCR Master Mix		800回 (A×5)	RR300B	¥66,000
			160回	RR350A	¥17,000
	SapphireAmp® Fast PCR Master Mix		800回 (A×5)	RR350B	¥66,000

- ・本カタログで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用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。
- ・本カタログに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。
- ・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。
- ・本カタログ記載の価格は2018年9月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282
関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995
テクニカルサポートライン
TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995
Website <http://www.takara-bio.co.jp>
Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店