

High-Fidelity PCR 酵素の決定版 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase は、タカラバイオが独自に開発した、きわめて高い正確性と優れた増幅効率を併せ持つ DNA polymerase です。本酵素は非常に強力な 3' 5' exonuclease 活性を有し、PCR 増幅において抜群の校正力を示す一方、現在広く用いられている *Taq* DNA Polymerase (*rTaq*) に優る高い増幅効率も示します。ここでは、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase の優れた性能と、実際の使用例についてご紹介いたします。また、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase を用いた PCR 産物のクローニングに最適な Mighty Cloning Kit (Blunt End) と、高フィデリティ RT-PCR キットである PrimeSTAR™ RT-PCR Kit を併せてご紹介いたします。

特長

- (1) PCR における最高レベルの正確性をご提供します。
- (2) *Taq* DNA Polymerase に優る効率の高い増幅が可能です。
- (3) GC リッチな配列にも対応し、効率よくしかも正確に増幅できます。
- (4) プライミング効率が高いため、アニーリング時間を短く設定することにより特異性の高い増幅が可能です。
- (5) 抗体を加えた Hot Start 用 PCR 酵素です。

内容(200回反応分)

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

* : Mg²⁺ 濃度は 5 mM (5 ×) です。

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase と各種 PCR 酵素との正確性の比較

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase と由来の異なる 3 種類の PCR 酵素を用いて、GC リッチな *Thermus thermophilus* HB8 genomic DNA を鋳型として任意に選択した 8 領域(増幅サイズはそれぞれ約 500 bp)を PCR 増幅しました。増幅産物を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そのシーケンスを確認し、塩基配列レベルのエラー率を求めました(図 1)。PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase は実際に解析した約 25 万塩基中にエラーはわずか 12 塩基であり、*rTaq* と比べて Fidelity が 10 倍高く、High-Fidelity 酵素として知られる *Thermococcus kodakaraensis* 由来 DNA Polymerase、*Pyrococcus* 属由来 DNA Polymerase をも上回る非常に高い正確性を示しました。*rTaq* の 10 倍という Fidelity は、mutant phenotype をカウントする Kunkel や Cline の方法で求めた従来の表記方法と比べると大きな差には見えないかもしれませんが、これは実際にシーケンス解析を行って得た値であり、実際の PCR 実験にもっとも即した Fidelity の求め方です。正確性が要求される重要な反応にも安心してご使用いただけます。

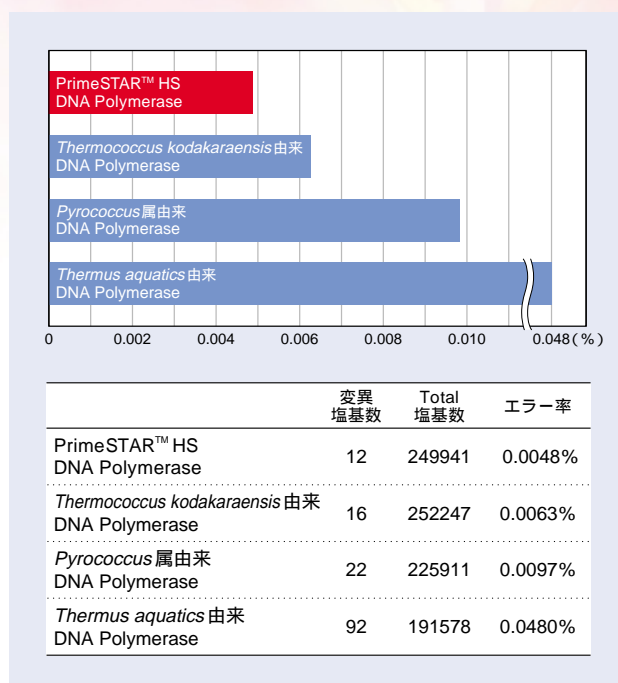


図 1 PCR 増幅におけるエラー率の比較

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。(50 μl 反応系、30 サイクル)

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase と各社 PCR 酵素との増幅効率の比較

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase では、酵素自身が備えている性能に加え、反応バッファーを高度に至適化しているので、幅広いターゲットに対する高感度の PCR 増幅が可能です。

- (1) ヒト DCLRE1A 遺伝子 2 kbp をターゲットとした PCR 増幅

ヒト DCLRE1A 遺伝子 2 kbp をターゲットとして、*rTaq* および他社 High-Fidelity 酵素と PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase の反応性を比較しました(図 2)。

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase は良好な反応性を示し、*rTaq* および他社 High-Fidelity 酵素よりも特異性が高く、1 オーダー高い検出感度が得られました。

High-Fidelity PCR 酵素の決定版 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase

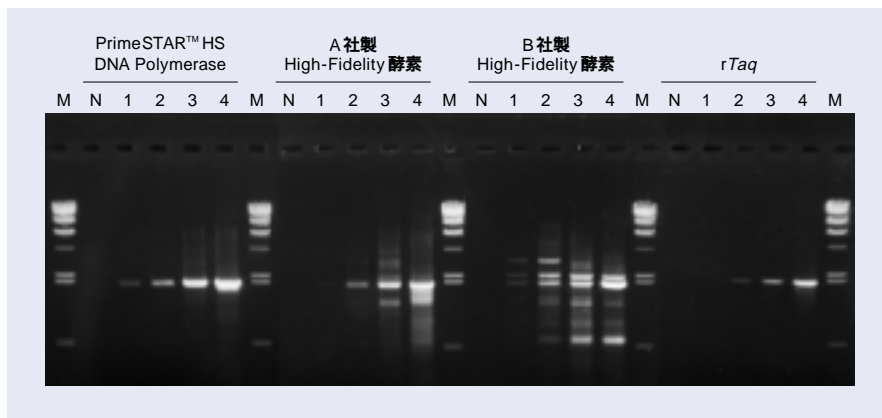


図2 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase と各社 PCR 酵素との増幅効率の比較

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。

(50 μl 反応系、30 サイクル; TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice を使用)

レーン M : λ-Hind III digest

N : No template

1 : ヒト genomic DNA 100 pg

2 : ヒト genomic DNA 1 ng

3 : ヒト genomic DNA 10 ng

4 : ヒト genomic DNA 100 ng

各 3 μl を泳動

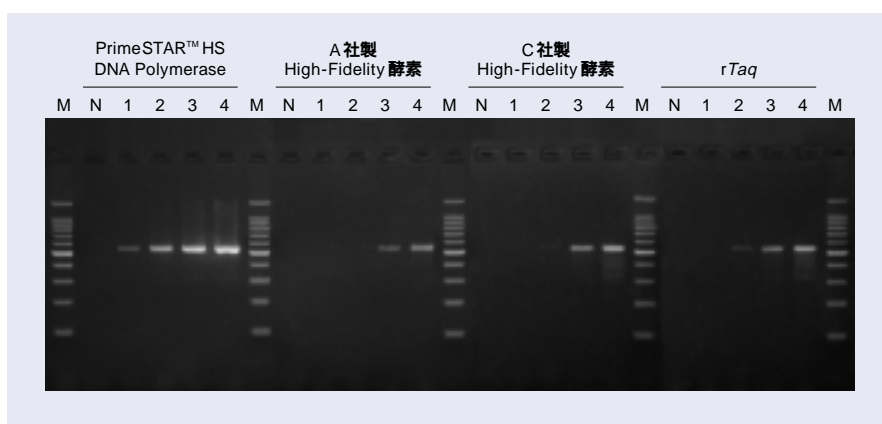


図3 GCリッチな領域での反応性の比較

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。

(50 μl 反応系、30 サイクル; TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice を使用)

レーン M : 100 bp DNA Ladder

N : No template

1 : Template 10 pg

2 : Template 100 pg

3 : Template 1 ng

4 : Template 10 ng

各 3 μl を泳動

(2) GC 含量の高い領域をターゲットとした PCR 増幅
Thermus thermophilus HB8 genomic DNA を鋳型に用い GC リッチ領域(増幅サイズ 537 bp、GC 含量約 70%)をターゲットとして、*rTaq* および他社 High-Fidelity 酵素と反応性を比較しました(図3)。

GC リッチな領域に対しても、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase は良好な反応性を示し、*rTaq* および他社 High-Fidelity 酵素よりも高い検出感度を得られました。

なお、この増幅において PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase のエラー率は 0.0056% であり、高い正確性を維持していました。

長鎖 DNA の PCR 増幅

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase は、Fidelity や増幅効率が高いだけでなく、長鎖 DNA の増幅にも適しています。ここではヒトゲノム DNA および大腸菌ゲノム DNA を鋳型として、各種サイズの増幅を行った例を示します(図4、5)。少なくともヒトゲノム DNA で 8.5 kbp、大腸菌ゲノム DNA では 10 kbp の増幅が良好に見られました。高次構造をとりやすいゲノムを鋳型にした場合でも、長鎖の増幅が効率よく行えることがわかります。

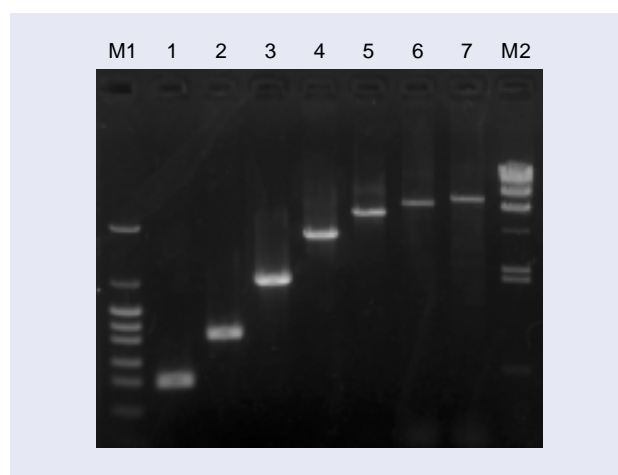


図4 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase を用いたヒトゲノム DNA の増幅

鋳型 : ヒト Genomic DNA 50 ng / 50 μl 反応系

PCR 条件 : 0.5 ~ 6 kbp の場合

98 10 秒

60 5 秒

30 サイクル

72 1 分 / kb

7.5 ~ 8.5 kbp の場合

98 10 秒

68 8 分

30 サイクル

(TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice 使用)

レーン M1 : pHY Marker

1 : 0.5 kbp

2 : 1 kbp

3 : 2 kbp

4 : 4 kbp

5 : 6 kbp

6 : 7.5 kbp

7 : 8.5 kbp

M2 : λ-Hind III digest

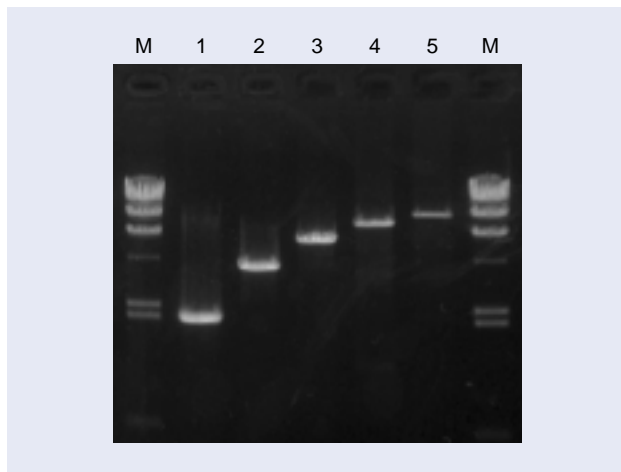


図5 PrimeSTAR™ HS DNA Polymeraseを用いた大腸菌ゲノムDNAの増幅

鋳型 : *E. coli* genomic DNA 100 pg/50 μl 反応系
 PCR条件 : 98 10秒
 60 5秒 30 サイクル
 72 1分/kb
 (TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice 使用)

レーン M : λ-*Hind* III digest 3 : 6 kbp
 1 : 2 kbp 4 : 8 kbp
 2 : 4 kbp 5 : 10 kbp

さまざまな長さの遺伝子をターゲットとした同一 PCR 条件での増幅

ヒトゲノムを鋳型として、さまざまな長さのターゲット遺伝子を同一 PCR 条件で増幅しました。

Template : ヒト genomic DNA 100 ng/50 μl 反応系

PCR条件 : 98 10秒
 68 8分 30 サイクル
 (TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice 使用)

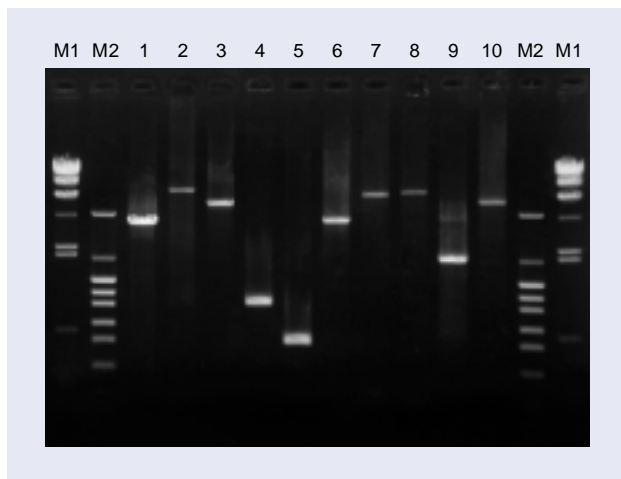


図6 同一 PCR 条件下でのさまざまなサイズの増幅

レーン M1 : λ-*Hind* III digest 5 : p53 0.5 kbp
 M2 : pHY Marker 6 : p53 4 kbp
 1 : DCLRE1A 4 kbp 7 : β-globin 7.5 kbp
 2 : β-globin 8.5 kbp 8 : DCLRE1A 8 kbp
 3 : β-globin 6 kbp 9 : DCLRE1A 2 kbp
 4 : DCLRE1A 1 kbp 10 : p53 6 kbp

このように同一 PCR 条件でも 0.5 kbp から 8.5 kbp までの各種ターゲットを増幅することができました。本酵素は高い Fidelity も兼ね備えており、ライブラリーからのクローニングなどに最適です。

cDNA を鋳型としての PCR

ヒト心臓 total RNA の M-MLV RTase による逆転写産物を鋳型として、PCR を行いました。

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase は、他社 High-Fidelity PCR 酵素に比べて逆転写後の cDNA を鋳型とした場合にも効率よく増幅できました(図7)。

なお、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase と M-MLV RTase (RNase H free) の組み合わせによる 2 step タイプの、PrimeSTAR™ RT-PCR Kit を販売しています(詳細は 8 ページをご覧ください)。

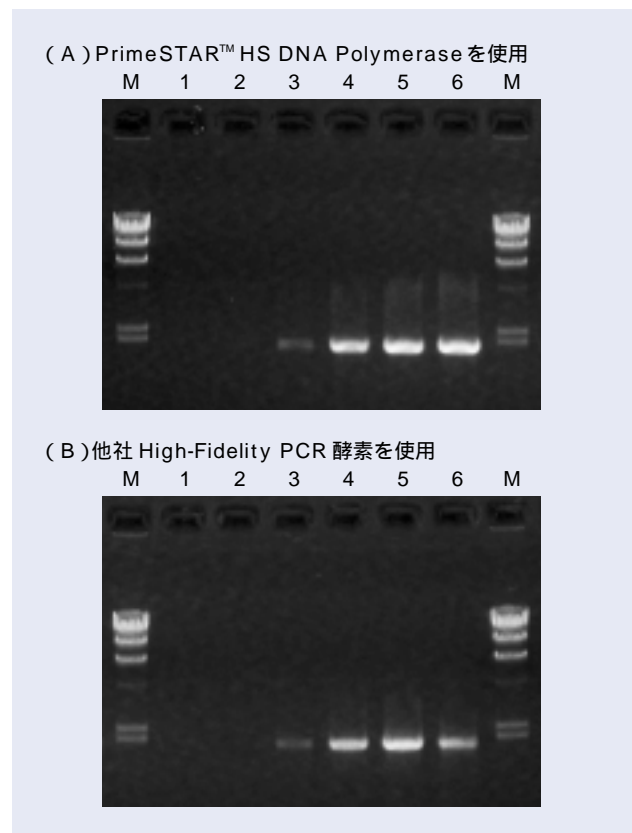


図7 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase と他社 High-Fidelity PCR 酵素の増幅効率の比較(逆転写産物を鋳型として使用)

サンプル : ヒト心臓 total RNA の逆転写産物

ターゲットの長さ : 2 kbp

鋳型量 : さまざまな濃度の total RNA から逆転写を行った反応液 20 μl のうち、5 μl を鋳型として使用

PCR条件 : 98 10秒
 55 15秒 30 サイクル
 72 2分

* 他社 High-Fidelity PCR 酵素の反応条件は推奨プロトコールに従った。(TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice 使用)

レーン M : λ-*Hind* III digest

1 : total RNA 50 pg 相当 4 : total RNA 50 ng 相当
 2 : total RNA 500 pg 相当 5 : total RNA 100 ng 相当
 3 : total RNA 5 ng 相当 6 : total RNA 250 ng 相当

他社 High-fidelity 酵素との品質の比較

現在、市販されている PCR 酵素の多くは、クローン化したものを大腸菌で発現させ精製しているため、*E. coli* ゲノム DNA による内因性コンタミネーションの可能性があります。このため、精製時に *E. coli* 由来の DNA 量を最低限に抑えた、高品質の酵素を使用することは、実験上の種々のトラブルを防止する上で重要なポイントになっています。

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase と、他社 High-Fidelity PCR 酵素について、製品に混入している *E. coli* ゲノム DNA の程度を、ori 領域の nested PCR を行って検証した例を示します。

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase では、*E. coli* ゲノム DNA のコンタミネーションは認められませんでした(図8A)。これに対し、他社 High-Fidelity PCR 酵素では、鑄型を加えない系においても ori 領域(143 bp)の増幅が認められました(図8B)。これらの結果から、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase に混入している *E. coli* ゲノム DNA 量は、100 fg 未満であると考えられ、他社 High-Fidelity PCR 酵素よりも品質が高いことがわかります。

PCR 反応阻害物質(SDS、腐植酸)の存在下における他酵素との活性の比較

SDS や腐植酸のコンタミネーションが疑われる DNA サンプルを鑄型として PCR を行う際にも、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase は非常に有効です。

(1) SDS 存在下での酵素活性

SDS を含むサンプルを鑄型として PCR を実施することがあります。PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase は SDS による PCR 反応の阻害を受けにくい傾向があるので、このような系にも安心して使用することができます。

PCR 酵素として、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase および *rTaq* を用いて、SDS を PCR 反応液に加え、PCR 反応の阻害を検討しました。反応系は *E. coli* ゲノム DNA を鑄型として、1.5 kb を増幅するモデル反応系です。

rTaq では、反応系の SDS 終濃度が 0.005% の場合、完全に反応が阻害されました。一方、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase では、反応系の SDS 終濃度が 0.01% の場合でも増幅が可能でした(図9)。

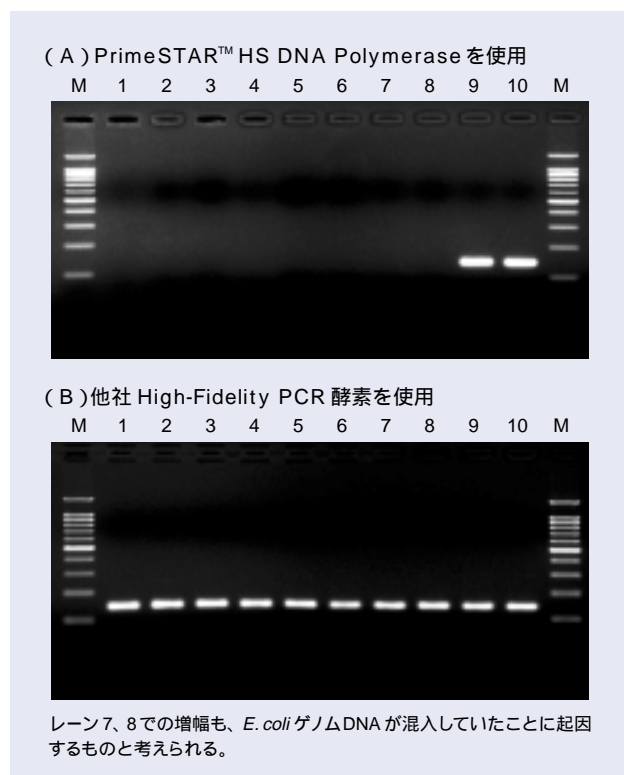


図8 *E. coli* ori 領域の nested PCR の比較

増幅領域: *E. coli* ori region
増幅サイズ: 2nd PCR 143 bp

レーン M: 100 bp DNA Ladder
1~6: Negative Control (鑄型 DNA なし)
7: *E. coli* JM109 ゲノム DNA 1 fg を添加
8: *E. coli* JM109 ゲノム DNA 10 fg を添加
9: *E. coli* JM109 ゲノム DNA 100 fg を添加
10: *E. coli* JM109 ゲノム DNA 1 pg を添加

レーン7~10は、positive control として、それぞれ1 fg、10 fg、100 fg、1 pg の *E. coli* JM109 ゲノム DNA を 1st PCR 時に加えて nested PCR を行った。

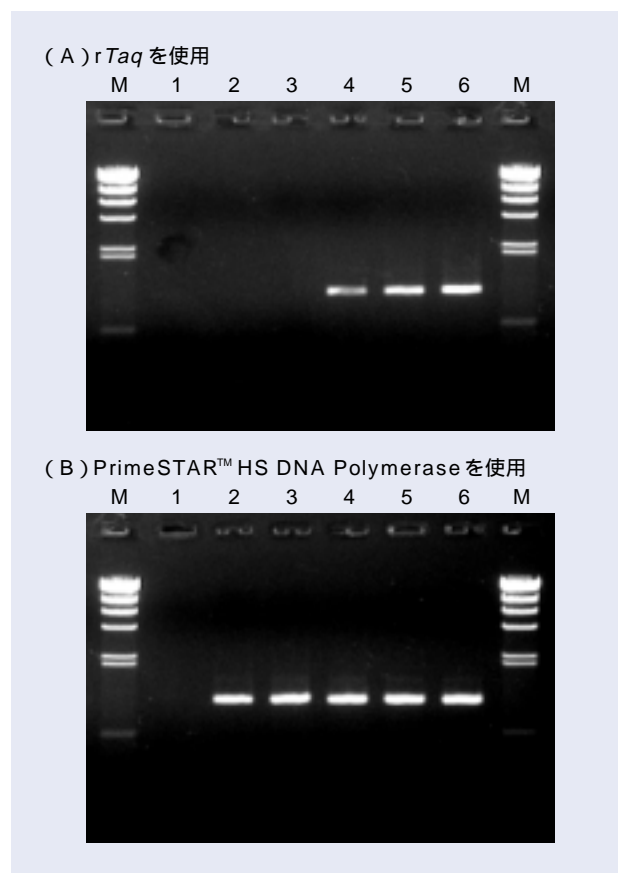


図9 SDS 存在下での PCR

レーン M: λ -Hind III digest
1: 鑄型および SDS の添加なし
2: SDS 終濃度 0.01%
3: SDS 終濃度 0.005%
4: SDS 終濃度 0.002%
5: SDS 終濃度 0.001%
6: SDS の添加なし

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase

(2) 腐植酸存在下での酵素活性

最近の研究では、土壌などの環境サンプルから直接DNAを抽出して解析する手法がさかんに行われています。このようなDNAサンプルからPCRを行う場合、腐植酸のコンタミネーションに注意しなければいけません。腐植酸は、腐植土のアルカリ可溶、酸不溶画分であり、土壌のほか海底堆積物などに含まれる赤褐色ないし黒褐色の有機物画分です。腐植酸は、微量でも強くPCR反応を阻害します。PrimeSTAR™ HS DNA Polymeraseは腐植酸の存在下でも酵素活性を示すので、検出可能なサンプルの範囲が広がります。粗抽出した腐植酸液(土壌抽出液)を希釈したものをPCR反応液に加え、PCR酵素として、PrimeSTAR™ HS DNA Polymeraseおよび*rTaq*を用いて、PCR反応の阻害を検討しました。反応系は*E. coli*ゲノムDNAを鋳型として、1.5 kbpを増幅するモデル反応系です。

*rTaq*では腐植酸0.01 μl相当を添加した場合でも、強く反応が阻害されました。一方、PrimeSTAR™ HS DNA Polymeraseでは、0.01 μl相当を添加した場合には無添加の場合と同様に増幅が可能でした(図10)。このようにSDSや腐植酸のコンタミネーションが疑われるDNAサンプルを鋳型としてPCRを行う際にも、PrimeSTAR™ HS DNA Polymeraseは非常に有効です。

* : 腐植酸は標準となる試薬がないので、土壌よりアルカリで溶出し、酸で沈殿させたものをアルカリに再度溶解したものを腐植酸液とした。この原液はA₂₈₀ = 10、A₇₀₀ = 0である。

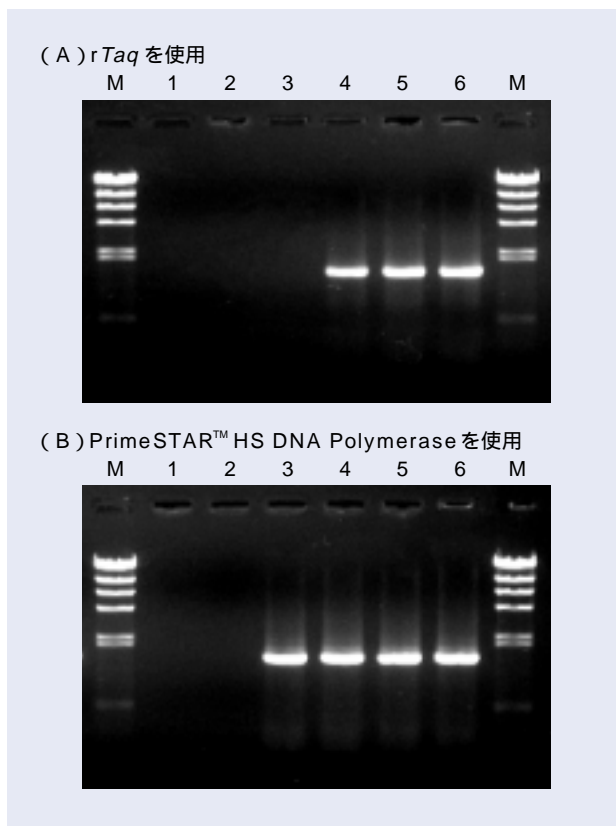


図10 腐植酸存在下でのPCR

- レーン M : λ-Hind III digest
- 1 : 鋳型および腐植酸液 添加なし
 - 2 : 腐植酸液0.1 μl相当を添加
 - 3 : 腐植酸液0.01 μl相当を添加
 - 4 : 腐植酸液0.001 μl相当を添加
 - 5 : 腐植酸液0.0001 μl相当を添加
 - 6 : 腐植酸液 添加なし

環境サンプルの16s rRNA 配列クローン解析(細菌)受託サービスも承ります

土壌などの環境サンプルから直接DNAを抽出し、細菌の16S rRNA遺伝子を増幅、クローニングし、得られたクローン96個のシーケンス解析、BLAST検索および系統樹作成を行います。環境サンプル中の細菌相、種の多様性、群集構造の推定などが可能になります。詳細は下記へお問い合わせください。

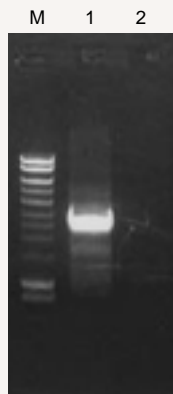
【お問い合わせ先】

タカラバイオ(株)ドラゴンジェノミクスセンター TEL : 0593-29-8560 FAX : 0593-29-8556

【お客様からご提供いただいた PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase の使用例】

Thermus thermophilus HB8 Genomic DNA を鋳型に用いた PCR

他社 High-Fidelity PCR 酵素では増幅しませんでした。PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase では増幅産物を得ることができました。また、シーケンスにより計 5010 塩基配列の確認を行ったところ、エラーはありませんでした。



M : 分子量マーカー
1 : PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase の増幅産物
2 : 他社 High-Fidelity PCR 酵素の増幅産物

サンプル : *Thermus thermophilus* HB8 Genomic DNA Solution (製品コード 3071)

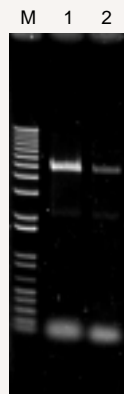
ターゲットの長さ : 2.5 kbp
鋳型量 : 50 ng/μl 濃度のものを 1 μl を鋳型として使用

PCR 条件 : 98 10 秒
55 15 秒 30 サイクル
72 3 分
4 保存

データ提供 : 東京理科大学理工学研究科応用生物科学専攻 坂口研究室の竹原将英氏

イネいもち病菌の total RNA の逆転写産物を鋳型にした PCR

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase は他社 High-Fidelity PCR 酵素に比べて高い増幅効率を示しました。



M : 分子量マーカー
1 : PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase の増幅産物
2 : 他社 High-Fidelity PCR 酵素の増幅産物

サンプル : イネいもち病菌の total RNA の逆転写産物

ターゲットの鎖長 : 約 5 kbp
鋳型量 : 約 1.0 μg の total RNA から逆転写を行った反応液 20 μl のうち、1.0 μl を鋳型として使用

PCR 条件 : 96 10 秒
55 15 秒 28 サイクル
72 4 分
72 10 分 1 サイクル

データ提供 : 神戸大学農学部環境制御学科植物病理学中屋敷研究室 角谷直樹氏

関連製品のご紹介

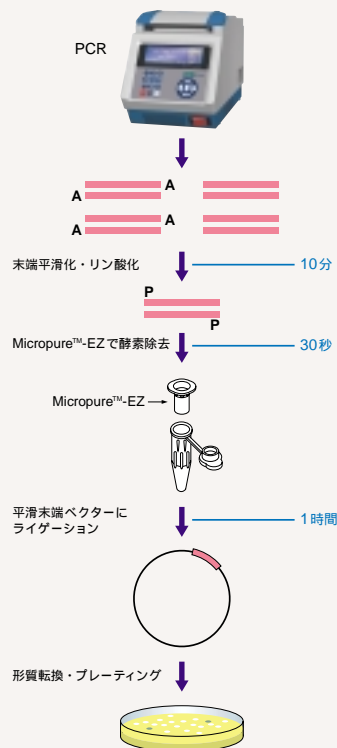
▶ Mighty Cloning Kit(Blunt End)

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase を用いて増幅した PCR 産物のほとんどは平滑末端になります。したがって、PCR 産物をそのまま、あるいは必要に応じてリン酸化を行って平滑末端のベクターにクローニングすることができます (T-vector へのクローニングはできません)。

平滑末端ベクターへのクローニングには、別売の Mighty Cloning Kit(Blunt End)(製品コード 6026) の使用をお勧めします。

本キットは、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase で増幅した平滑末端 PCR 産物以外にも、末端に A が付加する PCR 産物からでも、PCR 産物を精製することなく、末端平滑化とリン酸化を 1 step で行うことができます。反応後、タンパク質除去フィルターを装着した遠心チューブ Micropure™-EZ で処理し、ろ液をライゲーションに用います。ライゲーション試薬として平滑末端のライゲーションに優れた Ligation Mighty Mix を用いているため、脱リン酸化平滑末端ベクターへの簡便で高効率なクローニングが可能です。

【Mighty Cloning Kit(Blunt End) を用いた PCR からクローニングまでの手順】



PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase

【キットの内容(製品コード 6026)】

• Reagent Set for Mighty Cloning Kit(Blunt End) 20回分	
1. 10 × Blunting Kination Buffer	40 μl
2. Blunting Kination Enzyme Mix	20 μl
3. Ligation Mighty Mix	120 μl
4. Control Vector(pUC118-Hinc II / BAP) (50 ng/μl)	20 μl
5. Control Insert(200 ng/μl)	10 μl
6. ddH ₂ O	340 μl
• Micropure™-EZ	24個

Reagent Set for Mighty Cloning Kit(Blunt End) (製品コード 6027) と Micropure™-EZ (製品コード AM003) はそれぞれ単品としても販売しています。

本稿でご紹介した製品

• PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase		
製品コード R010A	250 U	¥30,000
製品コード R010B	250 U × 4	¥96,000
• Mighty Cloning Kit(Blunt End)		
製品コード 6026	20回	¥30,000
• PrimeSTAR™ RT-PCR Kit		
製品コード R021A	50回	¥40,000
製品コード R021B	200回	¥130,000

*PCR 酵素につきましては、5,000 U 以上を一括して購入される場合にはバルクディスカウントいたしますので、弊社販売課または弊社試薬取扱店までご相談ください。

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は43ページをご覧ください。

[①](#) [②](#)

▶ PrimeSTAR™ RT-PCR Kit

RNA PCR キットシリーズに、新しく PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase を用いた高フィデリティ RT-PCR キットが加わりました。PrimeSTAR™ RT-PCR Kit は、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase を用いた 2 step タイプの RT-PCR キットで、最高レベルの正確性と高い増幅効率を実現します。本製品は RT-PCR に必要な試薬をすべて含むオールインワンなキットであり、鋳型と PCR プライマーを準備するだけで、すぐにお使いいただけます。3'-RACE 法にも対応しています。

1 反応あたり (50 μl PCR 系) ヒト心臓由来 total RNA 100 ng 相当量を用いた場合、ジストロフィン領域の 6 kbp まで、HL60 細胞由来 total RNA 100 ng 相当量を用いた場合、トランスフェリンレセプター領域の 4.4 kbp まで増幅が可能であることを確認しています。

【キットの内容(製品コード R021A : 50回分)】

5 × M-MLV Buffer	200 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	100 μl
Oligo dT-3 sites Adaptor Primer (2.5 μM)	50 μl
Random 6 mer (20 μM)	50 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	25 μl
M-MLV RTase (RNase H free) (200 U/μl)	25 μl
RNase Free dH ₂ O	550 μl
EASY Dilution	500 μl
5 × PrimeSTAR™ Buffer	500 μl
PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase (2.5 U/μl)	25 μl
3sites Adaptor Primer (20 μM)	25 μl
Control F-1 Primer (20 μM)	10 μl
Control R-1 Primer (20 μM)	10 μl
Positive Control RNA (2 × 10 ⁵ copies/μl)	20 μl