

簡単・便利・安価、Dyeも添加済みの完全プレミックス型 **エメラルド!**
 クロードサンプルからも力強く増幅する **マイティ!**
 2種類のパワフルなPCR試薬が新登場です。

EmeraldAmp™ PCR Master Mix

製品コード RR300A/B(A×5) 160回/800回 ¥16,000/¥60,000

MightyAmp™ DNA Polymerase

製品コード R070A/B(A×4) 250 U/1,000 U ¥30,000/¥96,000

遺伝子工学研究に欠かせない技術であるPCR法は、その利用領域が広がるにつれてPCRを行う目的や取り扱うサンプルが極めて多種多様になってきました。そのため、PCR試薬に関しても、特定の用途や実験場面に適した試薬が求められるようになってきました。

今回タカラバイオでは、長年培ったPCR技術を生かし、電気泳動解析を必要とする多検体のPCRやインサートチェックのためのコロニーPCRなどを簡便かつ高感度に行えるEmeraldAmp™ PCR Master Mixと、PCR阻害物質を多く含むクロードな粗抽出サンプルからでも良好にPCR増幅ができるMightyAmp™ DNA Polymeraseの2種類の新規PCR試薬を発売しました。

本特集では、これら新規PCR試薬の優れた特長や実施例についてご紹介します。

【1】簡単・便利・安価、さらに性能にもこだわりました!

▶ EmeraldAmp™ PCR Master Mix

製品コード RR300A 160回 ¥16,000
 RR300B(A×5) 800回 ¥60,000

- プライマーと鋳型DNAを加えるだけですぐに反応を開始でき、反応後は直接電気泳動に使用可能な比重剤とLoading dyeも入った完全プレミックスタイプ
- ホットスタートPCR対応で反応液の室温調製が可能
- 鮮やかな緑色(emerald green)なのでサンプルアプライが容易
- コロニーPCRによるインサートチェックに最適

EmeraldAmp™ PCR Master MixはPCRに必要な酵素反応液組成とゲルへのアプライに必要なLoading dye、比重剤を含む完全プレミックス試薬です。プライマーと鋳型DNAを加えるだけで速やかにPCRを開始でき、反応後は反応液を直接電気泳動解析に供することができるため、操作の大幅な簡略化が可能です。また、色素と比重剤の存在下で反応液組成を高度に至適化しており、幅広いターゲットの増幅に対応します。ホットスタートPCR対応であり室温で反応液を調製できます。コロニーPCRに最適であり、また、ヒトゲノムDNAを鋳型として10 kbの増幅ができることを確認しています。増幅産物の直接制限酵素消化やTAクローニング、Exo I-SAP処理によるダイレクトシーケンスも可能です。なお、本製品は鮮やかな緑色(emerald green)をしているため、反応液のアプライが容易で、泳動中は青色と黄色の色素バンドが目視でき、泳動域の確認に大変便利です(図1)。

■ 内容(160回:50 µl反応系)

EmeraldAmp™ PCR Master Mix (2× Premix)	1 ml × 4
dH ₂ O	1 ml × 4

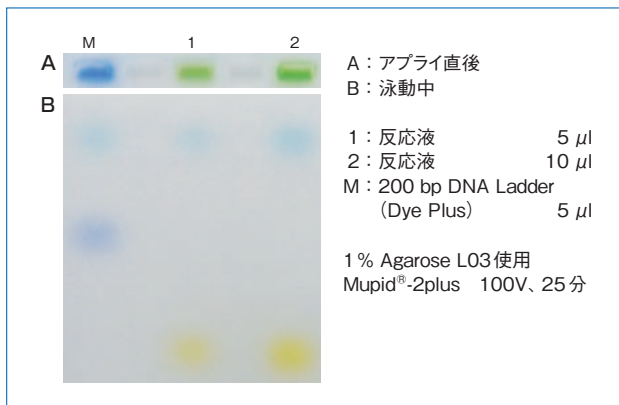


図1 アプライ直後および泳動中のゲル写真

※色素と比重剤入りでそのまま電気泳動に使用できるDNA Markerも発売中ですので、あわせてご利用ください。(関連製品のご紹介を参照)

■ 実験例 1: 同一PCR条件によるさまざまなターゲットの増幅(鋳型: ヒトゲノムDNA)

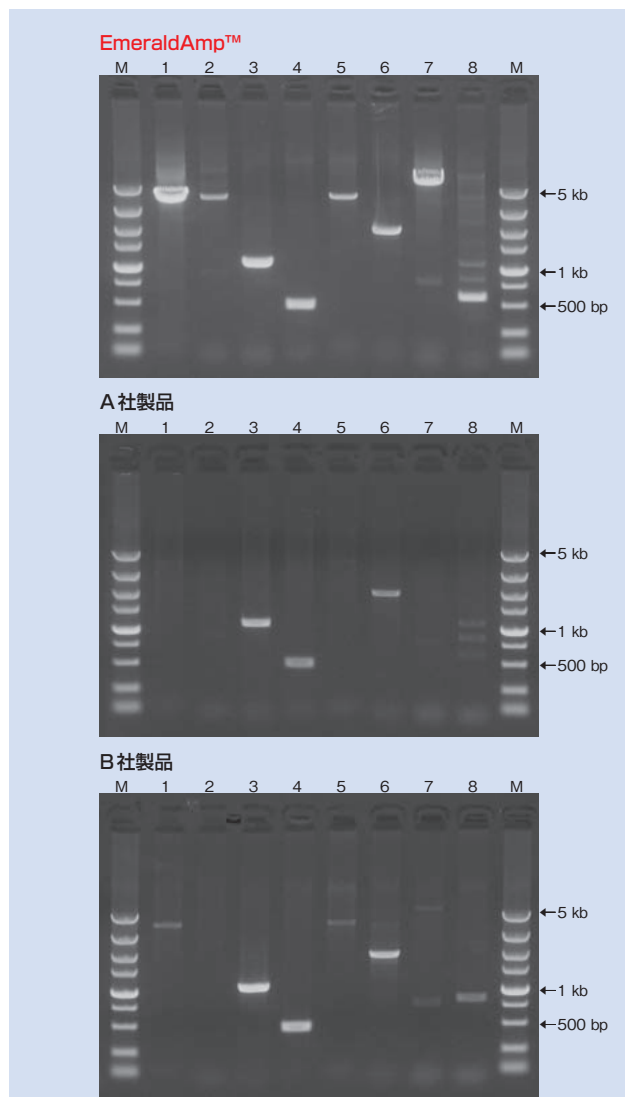
【方法】

本製品を用いて、98℃ 10秒/55℃ 30秒/72℃ 6分(30サイクル)の同一条件の3ステップPCRで、ヒトゲノムDNA 100 ngを鋳型としてさまざまな領域のPCR増幅を行った。また、色素入りプレミックスタイプのA社およびB社PCR製品についても、それぞれの推奨条件に基づく同一条件(伸長時間6分)でPCR増幅を行い、結果を比較した。なお、本稿でのPCR増幅にはすべてTaKaRa PCR Thermal Cycler Dice®を使用した。

2種類のパワフルなPCR試薬が新登場です。
EmeraldAmp™ PCR Master Mix
MightyAmp™ DNA Polymerase

【結果】

EmeraldAmp™ PCR Master Mixでは、増幅鎖長(0.5~6 kb)、GC含量(36~68%)にかかわらず同一の反応条件で良好なターゲットの増幅が確認できました(図2)。なお、GC含量が高く非特異的な増幅産物が見られる場合はアニーリング温度を高く設定することで特異性が向上する場合があります。



鑄型: ヒトゲノムDNA (100 ng/50 μl 反応系)
 アプライ量: 5 μl
 [ターゲット遺伝子 増幅サイズ(GC含量)]

[EmeraldAmp™ のPCR条件]
 98℃ 10秒
 55℃ 30秒
 72℃ 6分
 30サイクル

※他社製品の反応条件は、伸長時間6分以外は推奨条件に従いました。
 1% Agarose L03使用

図2 同一PCR条件によるさまざまなターゲットの増幅

■ 実験例 2: コロニーPCRによるインサート確認-1 (1 kb前後のcDNAライブラリー)

【方法】

pBlueScript II SK+(Stratagene社)に1 kb前後のヒトcDNAをクローニングし、大腸菌を形質転換した。出現した白コロニーを鑄型に、T7プライマーとT3プライマーを用いて本製品によるコロニーPCRを行い、インサートを確認した(図3)。

【結果】

調べた16クローンすべてで、0.5 kbから1.5 kbのインサートを確認できました(図4)。EmeraldAmp™ PCR Master Mixでは簡単かつ確実にコロニーPCRを行うことができます。

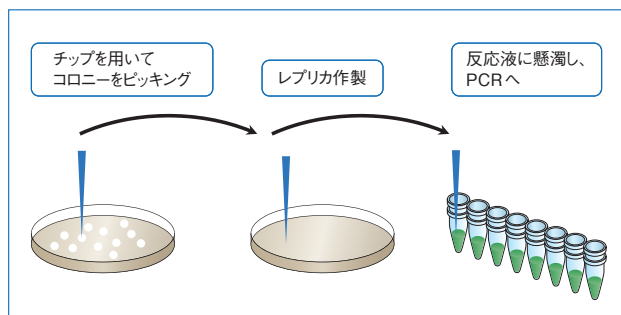


図3 コロニーPCRの操作方法

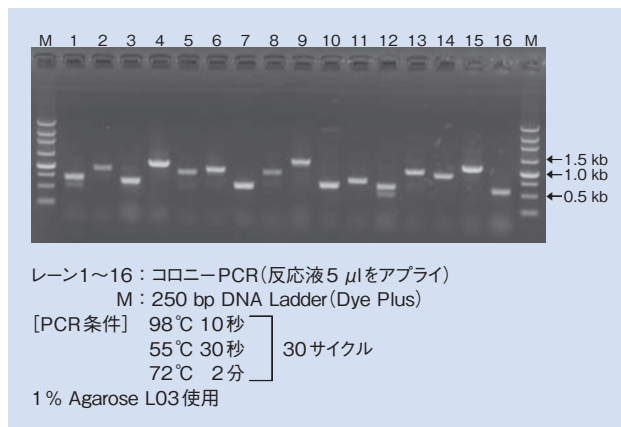


図4 コロニーPCRによるインサート確認-1

■ 実験例 3: コロニーPCRによるインサート確認-2 (5 kb以上のE. coliゲノムライブラリー)

【方法】

5 kb以上のE. coliゲノムDNA断片をpUC19にクローニングし、大腸菌を形質転換した。出現した白コロニーを鑄型に、M4プライマーとRVプライマーを用いて本製品によるコロニーPCRを行い、インサートを確認した。

【結果】

調べた8クローンすべてでインサートの確認ができました(次ページ図5)。EmeraldAmp™ PCR Master Mixでは、5 kbを超える長鎖のコロニーPCRも簡単、確実に行えます。

2種類のパワフルなPCR試薬が新登場です。

EmeraldAmp™ PCR Master Mix
MightyAmp™ DNA Polymerase

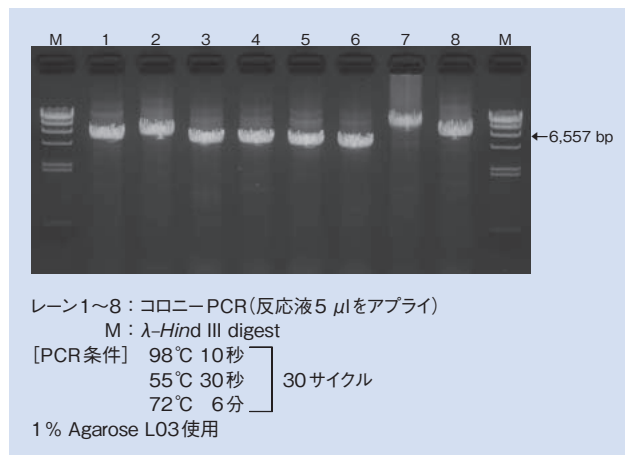


図5 コロニーPCRによるインサート確認-2

■ **実験例 4：EmeraldAmp™ PCR Master Mixで得られたPCR産物の制限酵素処理**

【方法】

PCR後の反応液を精製することなく、直接、制限酵素処理を行い電気泳動解析が可能であるかどうかを次の方法で確認した。pUC19 DNAを鋳型として本製品によりPCRを行い、マルチクローニングサイト領域を含む約1.8 kbの増幅産物を得た。PCR反応液5 μlにマルチクローニングサイト内を切断する各制限酵素0.5 μlを添加した。それぞれ制限酵素の至適温度で30分間反応後、全量(5.5 μl)を電気泳動解析に用いた。正しく切断された場合、約600 bpと約1.2 kbの産物を得ることができる。

【結果】

マルチクローニングサイト内を切断する13種類の制限酵素すべてで特異的な切断が認められました。反応時間30分ではSal Iで切れ残りが見られましたが、それ以外の12種類の制限酵素では十分な切断を確認できました(図6)。このようにEmeraldAmp™ PCR Master Mixで増幅したPCR産物は、反応液を直接制限酵素処理後、そのまま電気泳動に供して解析することもでき、操作を大幅に簡便化することができます。

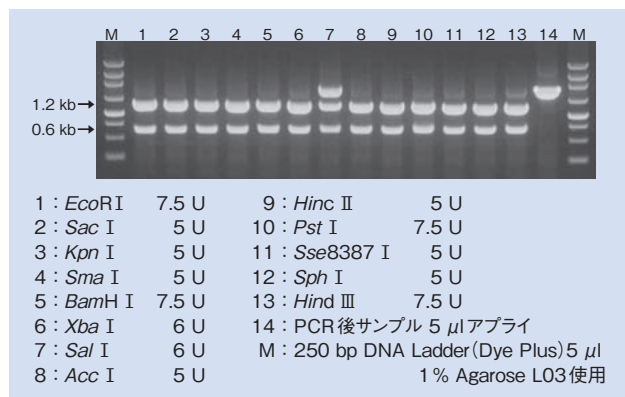


図6 PCR産物の制限酵素処理

[2] クールドサンプルからも力強く増幅

▶ **MightyAmp™ DNA Polymerase**

製品コード R070A	250 U	¥30,000
R070B (A × 4)	1,000 U	¥96,000

- PCR阻害物質を多く含むクールドなサンプルでの増幅に最適
- 阻害物質存在下で、少量の鋳型からの増幅、GCリッチやATリッチなターゲットの増幅にも強力に対応
- 98℃までポリメラーゼ活性を抑制する強力なHot Start抗体を使用

MightyAmp™ DNA Polymeraseは、特に2 kb程度までの短鎖の増幅において、極限の反応性を追求し開発された新規のDNAポリメラーゼです。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ールドな抽出液を用いて、GCリッチ、ATリッチを問わず、広範なターゲットの増幅が可能となりました。少量の鋳型からの増幅でも良好な反応性を示します。

ここでは、多様な試料より簡便な操作で抽出したクールドなDNA抽出液を鋳型として用い、本製品でPCR増幅を行った各種実験例をご紹介します。

■ **内容(200回反応：50 μl反応系)**

MightyAmp™ DNA Polymerase (1.25 U/μl)	200 μl
2 × MightyAmp™ Buffer (Mg ²⁺ plus, dNTP plus)	1 ml × 5

■ **実験例 5：マウス各組織のアルカリ熱抽出液を鋳型とするPCR**

【方法】

マウスの各組織(尾、肝臓、脾臓、胸腺、脳)5~10 mgに50 mM NaOHを180 μl添加し、95℃で10分間インキュベートした後、1 M Tris-HCl (pH 8.0)を20 μl加えて中和し、アルカリ熱抽出液を得た。各アルカリ熱抽出液2.5 μlを鋳型として(25 μl反応系)、マウス Tfrc 遺伝子(2 kb)をターゲットに、MightyAmp™ DNA Polymerase、A社、およびB社の阻害物質耐性酵素、またはTaKaRa Taq™ Hot Start Version (TaKaRa Taq™ HS) (製品コード R007A)を用いてPCR増幅を行った。各反応液3 μlを電気泳動に供し、反応性を比較した。

【結果】

TaKaRa Taq™ HSではほとんどPCR増幅産物が得られないアルカリ熱抽出液に対しても、MightyAmp™ DNA Polymeraseでは良好な増幅が見られ、他社阻害物質耐性酵素と比べて最も高い増幅効率を示しました(図7)。

2種類のパワフルなPCR試薬が新登場です。
EmeraldAmp™ PCR Master Mix
MightyAmp™ DNA Polymerase

DNA Polymerase では、簡単な熱抽出液を鋳型とした場合でもPCR増幅することができました。

■ 実験例 7：ヒト爪からSimplePrep™ reagent for DNA(標準プロトコール)で調製した抽出液を鋳型とするPCR

【方法】

ヒト爪約5 mgにSimplePrep™ reagent for DNA(製品コード 9180)を44 µl添加し、標準プロトコールに従って37℃ 6分、95℃ 3分インキュベートした後、滅菌水を80 µl添加し混合した。上清(抽出液)2.5 µlを鋳型として(25 µl反応液)、1 kb(GC含量 26%、50%および72%)、2 kb(GC含量 27%、50%および69%)、4 kb(GC含量 33%、44%および63%)の領域をターゲットに、本酵素またはA社およびB社の阻害物質耐性酵素を用いてPCR増幅を行った。各反応液3 µlを電気泳動に供し、反応性を比較した。

【結果】

A社およびB社の阻害物質耐性酵素ではターゲットの鎖長やGC含量によっては増幅不能や増幅不良の結果となりましたが、MightyAmp™ DNA Polymeraseではすべてのターゲットに対して目的サイズの増幅結果を得ることができました(図9)。DNA抽出が難しいヒト爪から簡便な操作で調製した抽出液を鋳型とした場合でも、MightyAmp™を用いることで、特異的増幅が難しいGCリッチやATリッチなターゲットであっても効率良くPCR増幅することができました。



図7 各組織のアルカリ熱抽出液を鋳型としたPCR増幅

■ 実験例 6：植物葉から簡易調製した抽出液を鋳型とするPCR

【方法】

5 mm角のホウレンソウおよびトマトの葉に溶解試薬*を100 µl添加し、95℃で10分間インキュベートした。各抽出液1 µlを鋳型として(25 µl反応液)、ホウレンソウcoxI遺伝子(約0.5 kb)とトマトXET遺伝子(0.65 kb)をターゲットに、本酵素、A社阻害物質耐性酵素、またはTaKaRa Taq™ HSを用いてPCR増幅を行った。各反応液5 µlを電気泳動に供し、反応性を比較した。対照として精製DNA 100 ngを鋳型としたPCRも行った。

* 100 mM Tris-HCl (pH9.5)、1 M KCl、10 mM EDTA

【結果】

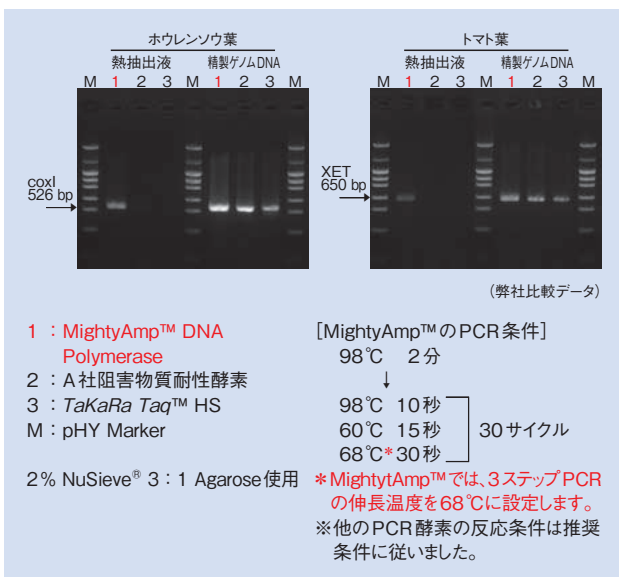


図8 植物の熱抽出液を鋳型としたPCR増幅

図8に示すように、A社阻害物質耐性酵素およびTaKaRa Taq™ HSではホウレンソウ、トマトとも精製DNAを鋳型にした場合にのみ増幅が見られました。一方、MightyAmp™

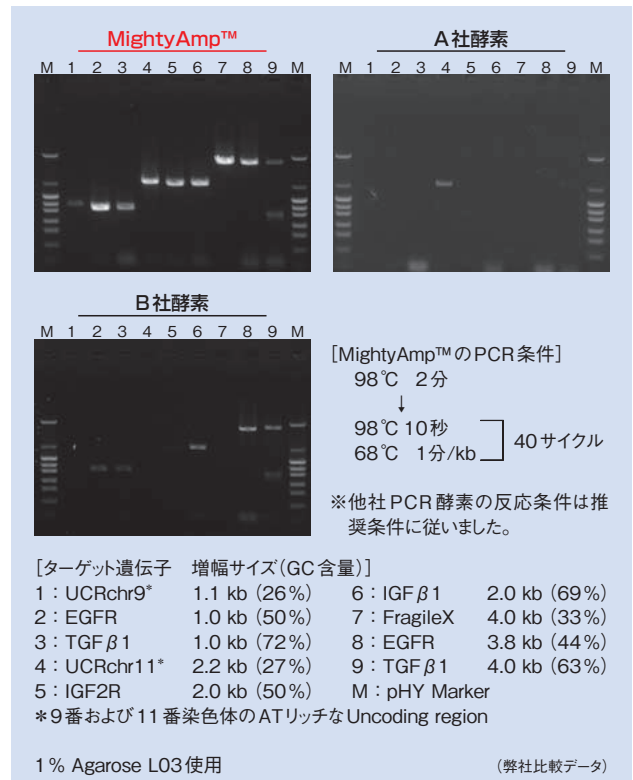


図9 ヒト爪からSimplePrep™ で簡易調製した抽出液を鋳型に用いたPCR増幅

