

研究用

---

**TaKaRa**

***TaKaRa Z-Taq™***

---

説明書

---

*TaKaRa Z-Taq* は高速 PCR 用に新しく開発された DNA ポリメラーゼであり、反応速度が非常に速く (*Taq* DNA ポリメラーゼの約 5 倍)、約 20 分間で 1 kb の増幅が可能です。また反応性にも優れておりヒトゲノム DNA を鋳型にして、17.5 kb の増幅を行うことができます。

さらにサイクル数の増加 (~ 50 サイクル) により感度の上昇も期待できます。(通常用いられている DNA ポリメラーゼに比べ反応時間が短縮できるため、多数のサンプルを処理する場合非常に便利です。) 迅速性、反応性、高感度と三拍子そろった PCR 用酵素です。

## I. 内容

<i>TaKaRa Z-Taq</i> (2.5 U/ $\mu$ l)	200 U
10 × <i>Z-Taq</i> Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus) (30 mM)	800 $\mu$ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	800 $\mu$ l

### 【酵素の形状】

20 mM	Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0)
100 mM	KCl
0.1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0.5%	Tween 20
0.5%	Nonidet P-40
50%	Glycerol

## II. *TaKaRa Z-Taq* の特長

- 反応速度 *Taq* DNA ポリメラーゼの約 5 倍 (PCR 条件より)
- 耐熱性 92.5°C での Half life > 130 min.
- 増幅サイズ 大腸菌ゲノム DNA 少なくとも 20 kb まで増幅可能  
ヒトゲノム DNA 少なくとも 17.5 kb まで増幅可能  
 $\lambda$  DNA 少なくとも 20 kb まで増幅可能
- 逆転写酵素活性 *Taq* DNA ポリメラーゼと同程度
- exonuclease 活性 3' → 5' 活性 +  
5' → 3' 活性 ±
- 増幅断片末端 大部分が A のオーバーハング
- 至適反応温度 70°C 近辺  
(取り込み活性による)

### III. 至適パラメーターの設定

TaKaRa Z-Taq の性能を最大限に引き出し、PCR を成功させるためにパラメーターの至適化が必要です。

- Denature および annealing、extension 時間 (シャトル PCR)  
(反応 volume 50  $\mu$ l の場合)

98°C    1 ~ 5 sec.\*1  
68°C    X sec.\*2    ] 25 ~ 30 cycles

- \* 1 : 変性の条件は、サーマルサイクラーの使用機種に合わせて設定してください。
- \* 2 : 増幅サイズにより適宜変更してください。10 ~ 20 sec./kb が目安です。

例)	2 kb 増幅の場合		
	98°C	1 (or 5) sec.	] 30 cycles
	68°C	20 sec.	
	8 kb 増幅の場合		
	98°C	1 (or 5) sec.	] 30 cycles
	68°C	80 sec.	
	20 kb 増幅の場合		
	98°C	1 (or 5) sec.	] 30 cycles
	68°C	200 sec.	
※ 3 step PCR も可能です。この際 extension 時間の設定は Taq DNA ポリメラーゼ使用時の約 1/3 ~ 1/5 に設定してください。			
例)	2 kb 増幅の場合		
	98°C	1 (or 5) sec.	] 30 cycles
	55°C	1 ~ 10 sec.	
	72°C	10 ~ 20 sec.	
	8 kb 増幅の場合		
	98°C	1 (or 5) sec.	] 30 cycles
	55°C	1 ~ 10 sec.	
	72°C	80 sec.	
	20 kb 増幅の場合		
	98°C	1 (or 5) sec.	] 30 cycles
	55°C	1 ~ 10 sec.	
	72°C	200 sec.	
※ シャトル PCR、3 step PCR とともに incubation 時間が長すぎるとスミアを生じる場合があります。			

- (注) primer の配列、鎖長によりシャトル PCR でうまく反応しない場合があります。その際は、3 step PCR をお試しください。

● 鋳型 DNA 量

至適鋳型 DNA 量は次の通りです。

ヒトゲノム DNA の場合	50 ~ 500 ng/50 $\mu$ l PCR
大腸菌ゲノム DNA の場合	1 ~ 100 ng/50 $\mu$ l PCR
$\lambda$ DNA の場合	50 pg ~ 5 ng/50 $\mu$ l PCR
プラスミドの場合	0.5 ~ 50 pg/50 $\mu$ l PCR

ただし純度により至適鋳型量が増減する場合があります。

● Primer

至適濃度 0.2 ~ 1  $\mu$ M  
サイズ 20 ~ 30 mers

Primer	PCR 増幅
5' 末端 FITC 標識 primer	可
5' 末端 ROX 標識 primer	可
5' 末端 Biotin 標識 primer	可
dUTP 含有 primer	可
dITP 含有 primer	不可

● dNTP と Mg<sup>2+</sup>

dNTP にはキレート作用があり、dNTP 濃度を高くすると実効 Mg<sup>2+</sup> 濃度が下がります。

<i>TaKaRa Z-Taq</i> の場合	Mg <sup>2+</sup>	3 mM (final conc.)
	dNTPs	200 $\mu$ M each (final conc.)

一般に過剰の Mg<sup>2+</sup> で非特異的な反応が起こりやすくなり、逆に Mg<sup>2+</sup> 濃度が不十分な時は反応性が低下します。

EDTA などのキレート剤が存在していると実効 Mg<sup>2+</sup> が下がります。通常 PCR 溶液中では、Mg<sup>2+</sup> 濃度は dNTP 濃度 (4 種類の total 濃度) より高く設定します。各 dNTP の濃度は揃えてください。各 dNTP の濃度に差がある場合 misincorporation error が起こりやすくなります。

● 各基質のとりこみ

基質	増幅
dUTP	—
Biotin-16-dUTP	—
Biotin-14-dATP	—
7-deaza-dATP	+
7-deaza-dGTP	+
Methyl-dCTP	—
DIG-dUTP	—

基質	増幅
dUTP : dTTP = 1 : 1	—
Biotin-16-dUTP : dTTP = 1 : 1	—
Biotin-14-dATP : dATP = 1 : 1	+
7-deaza-dATP : dATP = 1 : 1	+
7-deaza-dGTP : dGTP = 1 : 1	+
Methyl-dCTP : dCTP = 1 : 1	+
DIG-dUTP : dTTP = 1 : 1	—

● 反応 volume

通常 50  $\mu$ l での反応をお奨めします。

反応 volume を増減する場合は、denature 温度、時間の検討を行ってください。

---

## IV. 反応液の調製

各試薬は融解後氷上に置きます。PCR 反応液の調製もできる限り氷上で行います。これにより Primer のミスアニーリングが原因の非特異的増幅を抑えることができます。各試薬を reaction tube に順番に加えていき、最後に軽くピペッティングにより撹拌します。

試薬を加える順番 (例)

- 1) H<sub>2</sub>O
- 2) 10 × *Z-Taq* Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus)
- 3) dNTP Mixture
- 4) 鋳型 DNA
- 5) *TaKaRa Z-Taq*
- 6) Primer 1
- 7) Primer 2

反応液調製後はなるべく早く反応をスタートしてください。

※ 複数反応を行う場合は、*TaKaRa Z-Taq*、10×*Z-Taq* Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus)、dNTP Mixture 等を含む Master Mix を作製することをお勧めします。

● 一般的な PCR 反応液組成 (total 50 μl)

<i>TaKaRa Z-Taq</i> (2.5 U/ μl)	0.5 μl	
10 × <i>Z-Taq</i> Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	5 μl	
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μl	(final conc. 200 μM)
Template	< 1 μg	
Primer 1	10 pmol	(final conc. 0.2 μM)
Primer 2	10 pmol	(final conc. 0.2 μM)
滅菌精製水	up to 50 μl	

## V. TaKaRa Z-Taq 阻害物質の検討

(*E. coli* 2 kb 増幅：ゲノム DNA 100 pg/50  $\mu$ l PCR)

98°C    5 sec. ] 35 cycles  
66°C    20 sec.]

TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL (FAST MODE) 使用

添加物無しをコントロールとして、その増幅産物と比較

種類	最終濃度	影響
ホルムアミド	1%	影響なし
	5%	完全阻害
	10%	完全阻害
DMSO	1%	影響なし
	5%	50%程度阻害
	10%	完全阻害
NP-40	0.01%	80～90%程度阻害
	0.1%	80～90%程度阻害
Tween20	0.1%	影響なし
	1%	影響なし
TritonX-100	0.1%	影響なし
	1%	完全阻害
SDS	0.01%	完全阻害
	0.1%	完全阻害
グリセロール	1%	影響なし
	5%	90%程度阻害
PEG#6000	0.1%	影響なし
	1%	影響なし
EDTA	0.5 mM	影響なし
	5 mM	完全阻害
LB broth	1%	影響なし
	10%	90%程度阻害
DTT	1 mM	影響なし
	10 mM	影響なし
ゼラチン	0.01%	影響なし
	0.1%	スメアー気味
BSA	0.01%	影響なし
	0.1%	影響なし

## VI. トラブルシューティング

現象	原因	対策
全く増幅しない。 増幅効率が悪い。	extension 時間が短い。	10 ~ 20 sec./kb (at 68 ~ 72°C) に設定する。
	アニーリング温度が高い。	2°C ずつ下げて反応をしてみる。 あるいは touch down PCR を行う。
	アニーリング時間が短い。	0.5 ~ 1 min. に設定する。
	増幅断片の GC 含量が高い。 あるいは二次構造が強すぎる。	変性時間を長くする。 98°C、1 ~ 10 sec. または 94°C、10 ~ 30 sec. に設定する。
	Primer が適当でない。	純度を上げる。 GC 含量を 50% 前後にする。 サイズをなるべく長くする (20 ~ 30 mers)。 プライマー同士の 3' 端が相補的にならないようにする。
	Primer 濃度が低い。	0.2 ~ 1 μM (final conc.) で使用
	変性条件が不適當	98°C、1 ~ 10 sec. または 94°C、10 ~ 30 sec. に設定する。
	鋳型 DNA の純度が悪い。 鋳型 DNA の量が少ない。	DNA を精製しなおす。 適量の鋳型 DNA を使用する。 ヒトゲノム DNA ~ 500 ng/50 μl PCR 大腸菌ゲノム DNA ~ 100 ng/50 μl PCR λ DNA ~ 5 ng/50 μl PCR プラスミド ~ 50 pg/50 μl PCR
	サイクル数が少ない。	~ 50 cycles に設定する。
エキストラバンド がでる。	アニーリング温度が低い。	2°C ずつ上げてみる。 touch down PCR を行ってみる。
	鋳型 DNA が多い。	適量の鋳型 DNA を使用する。 ヒトゲノム DNA ~ 500 ng/50 μl PCR 大腸菌ゲノム DNA ~ 100 ng/50 μl PCR λ DNA ~ 5 ng/50 μl PCR プラスミド ~ 50 pg/50 μl PCR
	サイクル数が多い。	~ 50 cycles 2 cycles ずつ少なくしてみる。
	Primer 量が多い。	~ 1 μM (final conc.) 0.2 μM まで下げてみる。
	Primer サイズが長い。	~ 30 mers で使用する。
スミアーする。	extension 時間が長い。	10 ~ 20 sec./kb (at 68 ~ 72°C) に設定する。
	サイクル数が多い。	~ 50 cycles に設定する。
	鋳型 DNA が多い。	適量の鋳型 DNA を使用する。 ヒトゲノム DNA ~ 500 ng/50 μl PCR 大腸菌ゲノム DNA ~ 100 ng/50 μl PCR λ DNA ~ 5 ng/50 μl PCR プラスミド ~ 50 pg/50 μl PCR

## VII. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- *TaKaRa Z-Taq* はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**テクニカルサポートライン**

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

---

**タカラバイオ株式会社**