

製品コード R044A

研究用

---

**Takara**

**PrimeSTAR® HS DNA Polymerase  
with GC Buffer**

---

説明書

v201908Da

PrimeSTAR HS DNA Polymerase は、タカラバイオが独自に開発した高い正確性と高い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、DNA 合成において抜群の校正力を示す一方、*Taq* DNA polymerase に優る高い増幅効率も示します。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ているため、PCR 反応前のミスプライミングやプライマーの消化を防ぐことができます。また、高いプライミング効率を有しているため、アニーリング時間を短時間に設定でき、反応時間を短縮することができます。PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer は、GC 含有率の高いターゲットの正確な増幅を目的として構築した製品です。増幅が困難である GC 含有率の高いターゲットに対して、PrimeSTAR HS DNA Polymerase が元来有する高い正確性と増幅効率を維持しつつ、高い成功率で特異性に優れた PCR 増幅を実現しました。

## I. 内容 (200 回反応分、50 $\mu$ l 反応系)

PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l) *1	100 $\mu$ l
2 $\times$ PrimeSTAR GC Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus) *2	1.7 ml $\times$ 3
dNTP Mixture (2.5 mM each)	800 $\mu$ l

### \* 1 : 【酵素の形状】

50 mM	Tris-HCl 緩衝液 (pH8.2 at 4°C)
100 mM	NaCl
0.1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0.1%	Tween20
0.1%	NP-40
50%	Glycerol

### 【活性の定義】

活性化サケ精子 DNA を鋳型/プライマーとして用い、74°Cにおいて 30 分間に 10 nmol の全ヌクレオチドを酸不溶性沈殿物に取り込む活性を 1 U とする。

\* 2 : Mg<sup>2+</sup>濃度は 2 mM (2  $\times$ ) です。

## II. 保存

− 20°C

## III. 一般的な PCR 反応液組成 (Total 50 $\mu$ l)

試薬	使用量	最終濃度
2 $\times$ PrimeSTAR GC Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	25 $\mu$ l	1 $\times$
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 $\mu$ l	200 $\mu$ M each
Primer 1	10 ~ 15 pmol	0.2 ~ 0.3 $\mu$ M
Primer 2	10 ~ 15 pmol	0.2 ~ 0.3 $\mu$ M
Template	< 200 ng	
PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	1.25 U/50 $\mu$ l
滅菌精製水	up to 50 $\mu$ l	

※ PCR 反応液の調製は室温でも可能です。ただし、酵素などの各試薬は氷上に置いて使用してください。

## IV. PCR 条件

本製品は GC リッチなターゲットの増幅を目的としているため、通常、2 step PCR で良い結果が得られます。2 step PCR で反応性、増幅効率が十分でない場合には、3 step PCR をお試しください。V. 至適パラメーターの設定、および、IX. トラブルシューティングもご確認ください。

- (A) 2 step PCR の場合
- |      |           |             |
|------|-----------|-------------|
| 98°C | 10 sec.   | } 30 cycles |
| 68°C | 1 min./kb |             |
- (B) 3 step PCR の場合
- |      |           |             |
|------|-----------|-------------|
| 98°C | 10 sec.   | } 30 cycles |
| 60°C | 5 sec.    |             |
| 72°C | 1 min./kb |             |

<重要> 本酵素はプライミング効率が非常に高い酵素ですので、3 step PCR でのアニーリング時間は 5 秒に設定して反応を行ってください。

## V. 至適パラメーターの設定

本製品は、PrimeSTAR HS DNA Polymerase の特長を維持しつつ、GC 含有率の高いターゲットの増幅が可能となるように最適化されています。本酵素の性能を最大限に引き出し、よりよい PCR 増幅結果を得るために、至適パラメーターの設定が必要な場合があります。

### (1) 酵素量

通常 1.25 U/50  $\mu$ l 反応系をお勧めします。ただし、増幅サイズ、鋳型の純度および量により、減らした方が良い場合があります。特に、目的バンドのほかに著しいスミアや非特異的バンドが見られる場合には、 $\sim 0.625$  U/50  $\mu$ l 反応系程度まで酵素量を減らすことで改善する場合があります。

### (2) 鋳型 DNA 量

鋳型 DNA の推奨使用量は次のとおりです。

(50 $\mu$ l 反応系の場合)	
ヒトゲノム DNA	5 $\sim$ 200 ng
大腸菌ゲノム DNA	100 pg $\sim$ 100 ng
cDNA	1 $\sim$ 200 ng
$\lambda$ DNA	10 pg $\sim$ 10 ng
プラスミド DNA	10 pg $\sim$ 1 ng

必要量以上の鋳型 DNA を使用することは避けてください。とくに鋳型 DNA 量が 200 ng を超える反応系では反応性が低下する場合があります。

バイサルファイト処理した DNA などのウラシルを含む鋳型は使用できません。

### (3) dNTP と $Mg^{2+}$

dNTP にはキレート作用があり、dNTP 濃度を高くすると実効  $Mg^{2+}$  濃度が下がります。

本製品の場合、添付の  $2 \times$  PrimeSTAR GC Buffer には最終濃度 1 mM の  $Mg^{2+}$  が含まれており、dNTP を最終濃度 200  $\mu$ M each で使用することで良好な結果が得られるように反応系が最適化されています。dNTP 濃度を変更することはできるだけ避けてください。

また、PrimeSTAR HS DNA Polymerase では、dTTP の代わりに dUTP を使用することはできません (著しく反応性が低下します)。

#### (4) プライマーと PCR 条件

プライマーは、できるだけプライマー設計ソフト (OLIGO Primer Analysis Software : Molecular Biology Insights 社) などを利用して、最適な配列を選択するようにしてください。

基本的には 20 ~ 25 mer のプライマーで十分な結果が得られます。

本製品では、イノシンを含むプライマーの使用は避けてください。degenerated primer は使用可能です。

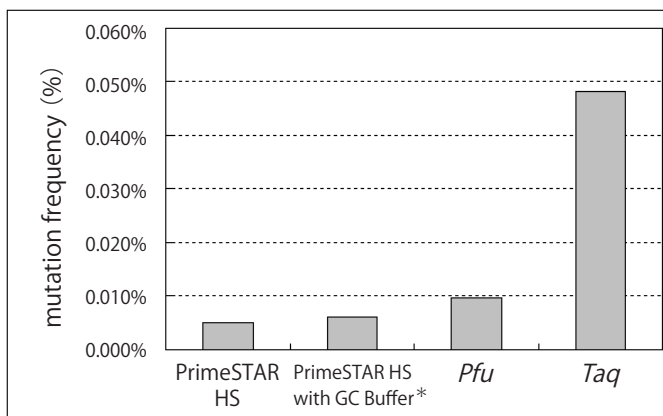
## VI. 正確性について

GC rich 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 増幅後、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、mutation frequency を求めました。

その結果、PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer の正確性は、*Pfu* Polymerase に比べて高く、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (PrimeSTAR Buffer 使用) とほぼ同程度でした。

この方法は、実際の PCR に最も即した Fidelity の求め方です。正確性が重要な反応に安心してご使用いただけます。

各酵素の Fidelity 比較



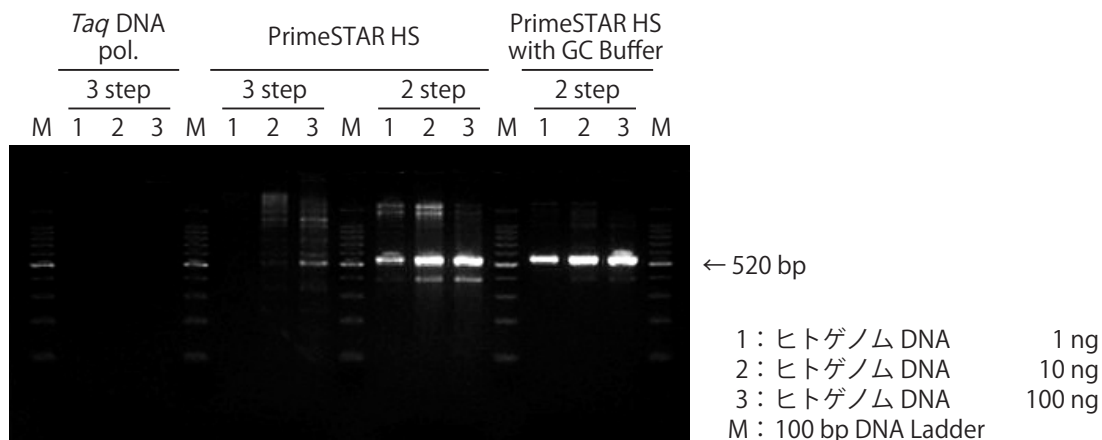
\* : 本製品で増幅した場合、実際に解析した 304,110 塩基のうち、エラーはわずかに 25 塩基でした。

## VII. 増幅例

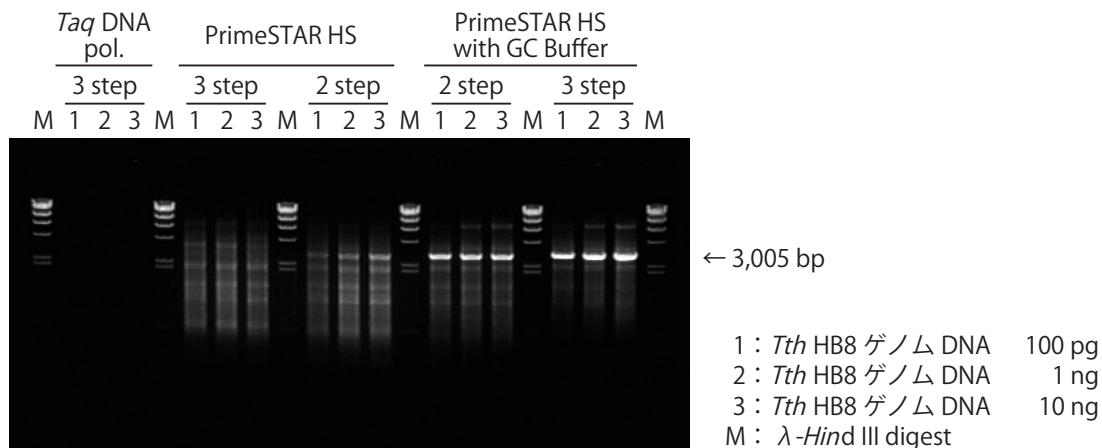
### 比較 -1

ヒト *APOE* 遺伝子 (520 bp、GC 含有率 74.8%)、*Tth* HB8 (3,005 bp、GC 含有率 73.2%) をターゲットとして、*Taq* DNA polymerase、PrimeSTAR HS DNA Polymerase、PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer で反応性を比較しました。反応液組成および PCR 条件はそれぞれの推奨プロトコールに従いました。

#### 【ヒト *APOE* 遺伝子 520 bp】



#### 【*Tth* HB8 3,005 bp】

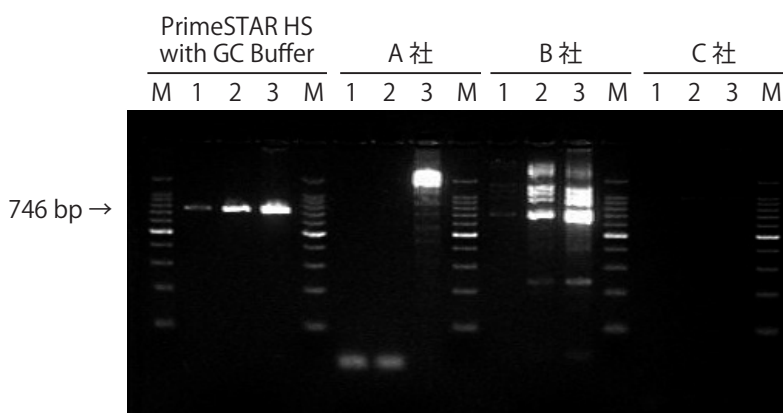


GC 含有率の高いターゲットにおいて、PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer は他の酵素よりも特異的な増幅結果が得られました。

## 比較-2

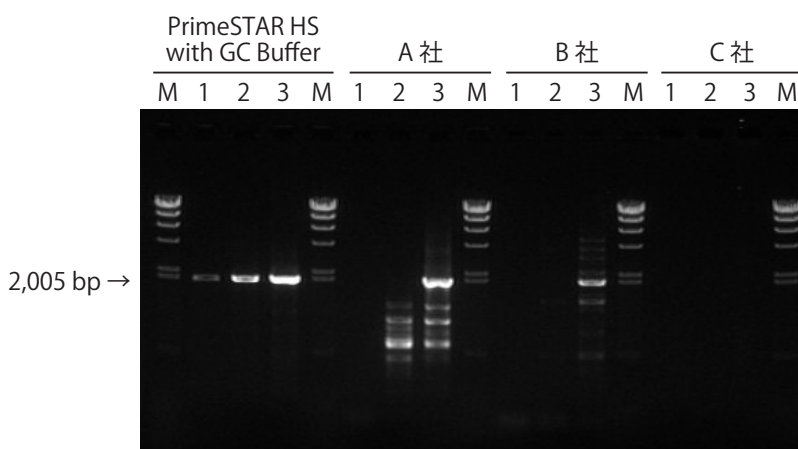
ヒト *APOE* 遺伝子 (746 bp、GC 含有率 73.9%)、ヒト *TGF $\beta$ 1* 遺伝子 (2,005 bp、GC 含有率 68.8%)、*Tth* HB8 (3,005 bp、GC 含有率 73.2%、および 5,030 bp、GC 含有率 71.2%) をターゲットとして、A 社、B 社および C 社の GC リッチ対応 High Fidelity 酵素と PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer との反応性を比較しました。A 社、B 社および C 社酵素での反応液組成および PCR 条件は、それぞれの推奨プロトコールに従いました。

### 【ヒト *APOE* 遺伝子 746 bp】



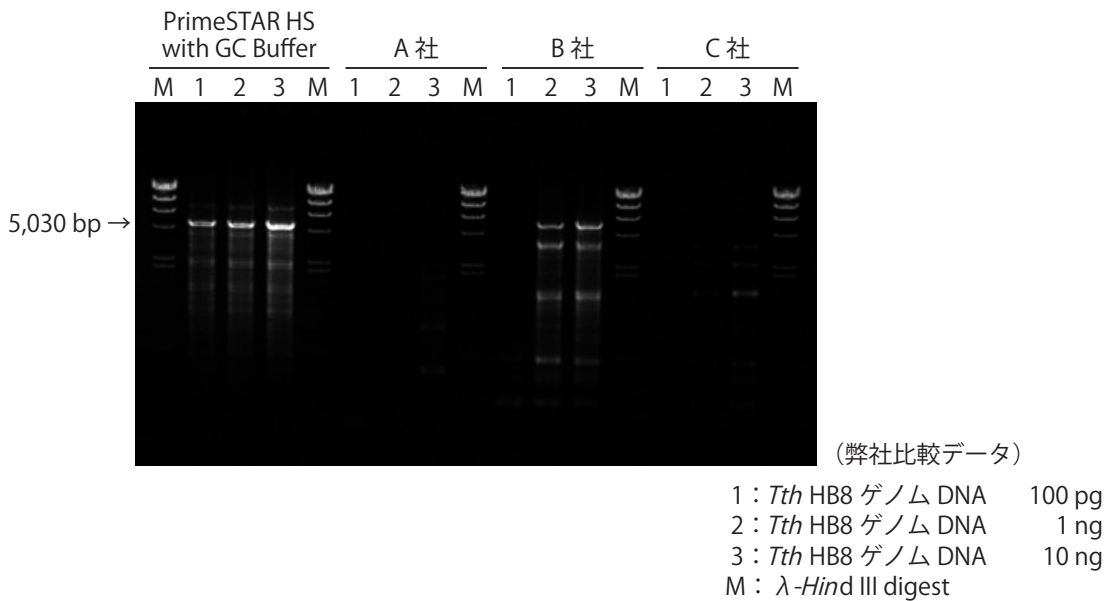
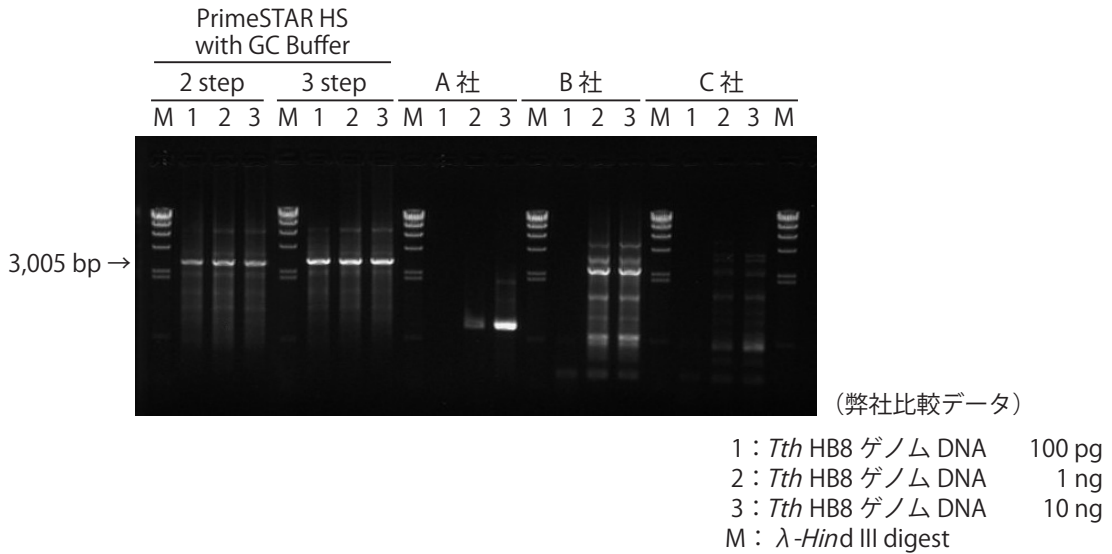
1 : ヒトゲノム DNA 1 ng  
2 : ヒトゲノム DNA 10 ng  
3 : ヒトゲノム DNA 100 ng  
M : 100 bp DNA Ladder

### 【ヒト *TGF $\beta$ 1* 遺伝子 2,005 bp】



1 : ヒトゲノム DNA 1 ng  
2 : ヒトゲノム DNA 10 ng  
3 : ヒトゲノム DNA 100 ng  
M :  $\lambda$ -*Hind* III digest

【*Tth* HB8 3,005 bp および 5,030 bp】



PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC Buffer は他社の GC リッチ対応の High fidelity 酵素よりも特異性が高く、高い検出感度が得られました。

※トラブルシューティングもご参照ください。

---

## VIII. 増幅産物の電気泳動、クローニング、シーケンスについて

### (1) 増幅産物の電気泳動

本製品を用いて増幅した PCR 産物を電気泳動する場合は、TAE Buffer の使用を推奨します。TBE Buffer を使用すると、泳動パターンがやや裾広がりになり、きれいな泳動結果が得られない場合があります。

### (2) クローニング

本製品を用いて増幅した PCR 産物のほとんどは平滑末端になっています。したがって、PCR 産物をそのまま（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可能です。平滑末端ベクターへのクローニングには Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027) をご利用ください。T-vector にクローニングしたい場合には、3' 末端への dA 付加反応を行う必要があります。Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (製品コード 6019) をご利用ください。

### (3) 制限酵素処理を行う場合

増幅産物を制限酵素処理する場合は、フェノール/クロロホルム処理、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250) を用いる PCR クリーンアップなどのタンパク質除去操作を行ってください。特に 3' - 突出型の制限酵素（例えば *Pst* I など）の場合、PrimeSTAR HS DNA Polymerase の 3' → 5' exonuclease 活性が残存していると、制限酵素処理中に 3' - 突出末端が削られてしまいます。

### (4) ダイレクトシーケンスを行う場合

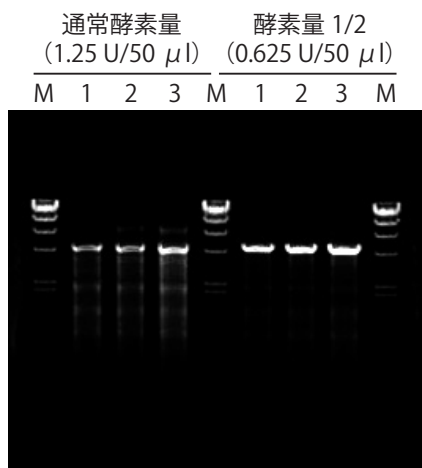
本酵素は 3' → 5' exonuclease 活性を有するため、ダイレクトシーケンスを行う前にフェノール/クロロホルム処理、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up を用いる PCR クリーンアップなどのタンパク質除去操作を行うことをお勧めします。



## IX. トラブルシューティング

現象	問題点	対策
全く増幅しない 増幅効率が悪い	鋳型 DNA の純度・量	適量の鋳型 DNA を使用する。 DNA の精製度を上げる。
	アニーリング／伸長温度	2°C ずつ下げしてみる。 3 step PCR で行う。
	プライマー濃度	0.2 ~ 0.5 μM (final conc.) で検討する。
	アニーリング時間	3 step PCR のアニーリング時間を 15 sec. に 設定する。
エキストラバンドがでる スメアする	酵素量	~ 0.625 U/50 μl 程度まで下げしてみる。*
	鋳型 DNA 量	適量の鋳型 DNA を使用し、必要以上に使用 しない。
	アニーリング／伸長温度	2 step PCR のアニーリング／伸長温度を 2°C ずつ上げてみる。
	プライマー濃度	0.2 ~ 0.3 μM (final conc.) で検討する。
	サイクル数	25 ~ 30 cycles に設定する。

\* : 【 検討例 : *Tth* HB8 5,030 bp 】



## X. 関連製品

PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (製品コード R010A/B)  
PrimeSTAR® HS (Premix) (製品コード R040A)  
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (製品コード R050A/B)  
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)  
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027)  
Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR® (製品コード 6019)  
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)

## XI. 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。
- PrimeSTAR はタカラバイオ株式会社の登録商標です。PrimeScript 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**