

製品コード RR070A

研究用

TAKARA

**SpeedSTAR™ HS
DNA Polymerase**

説明書

v201906Da

SpeedSTAR HS DNA Polymerase は、高速 PCR 用に開発されたホットスタートタイプの DNA ポリメラーゼで、至適化された Fast Buffer I または II と組み合わせることにより短時間で効率の良い PCR を行うことができます。

一般に用いられている PCR 用の DNA ポリメラーゼは、伸長ステップの時間を 1 分 /kb を目安として設定しますが、本製品では 10 秒 /kb の設定が可能です。このことにより、短時間で PCR の結果を得ることができます。

また、抗体を用いたホットスタート用酵素を使用しているため、サイクリング前のミスアニーリングやプライマーダイマーに起因する非特異的増幅を抑えることができ、特異性の高い増幅結果が得られます。

I. 内容 (200 回分)

SpeedSTAR HS DNA Polymerase*1	5 U/ μ l	50 μ l
10 × Fast Buffer I (Mg ²⁺ plus)*2	10 ×	1 ml
10 × Fast Buffer II (Mg ²⁺ plus)*2	10 ×	1 ml
dNTP Mixture	2.5 mM each	800 μ l

* 1 : 【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%	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 : Mg²⁺ 濃度は Fast Buffer I が 30 mM (10 ×)、Fast Buffer II が 20 mM (10 ×) です。

II. 保存 - 20°C

III. 添付バッファーについて

本製品には 2 種類のバッファー、10 × Fast Buffer I および 10 × Fast Buffer II が含まれています。ターゲットの増幅鎖長に応じて使い分けてください。

増幅鎖長 2 kb までは 10 × Fast Buffer I を、2 ~ 4 kb には I または II を、4 kb 以上の増幅には Fast Buffer II を使用することで、最高のパフォーマンスが得られます。

注) Fast Buffer I を長鎖の増幅に使用した場合にはスミアになる可能性があり、Fast Buffer II を増幅鎖長が短い反応に用いると、増幅効率が低下する傾向があります。

IV. 一般的な PCR 反応液組成 (50 μ l 反応系)

試薬	使用量	最終濃度
10 \times Fast Buffer I or II	5 μ l	1 \times
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l	200 μ M
primer 1	10 ~ 50 pmol	0.2 ~ 1 μ M
primer 2	10 ~ 50 pmol	0.2 ~ 1 μ M
template	< 500 ng	
SpeedSTAR HS DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.25 μ l	1.25 U/50 μ l
滅菌精製水	up to 50 μ 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。

V. PCR 条件

本酵素は 2 step PCR、3 step PCR のいずれでも使用可能ですが、高速反応により反応所要時間を短縮するためには、まず 2 step PCR でお試しください。しかし、プライマーサイズが短い場合には、3 step PCR でより良い結果が得られる場合があります。また、増幅サイズが長い場合には、伸長時間を長目に設定することで良い結果が得られる場合が多いですが、長すぎるとスミアする可能性があります。

(A) 2 step PCR の場合

- 増幅鎖長が 4 kb or 6 kb 程度まで (Fast Buffer I、II とも)

95°C 5 sec.
65°C 10 (~ 20) sec./kb } 30 cycles

- 増幅鎖長が 4 kb or 6 kb 以上 (Fast Buffer II を使用)

98°C 5 sec.
68°C 10 (~ 20) sec./kb } 30 cycles

注) 増幅サイズにより、各ステップの温度を上記のように設定することで、より効率の良い反応を行うことができます。

(B) 3 step PCR の場合 (Fast Buffer I、II とも)

98°C 5 sec.
55°C 10 ~ 15 sec.
72°C 5 ~ 10 sec./kb } 30 cycles

注) 変性条件は、サーマルサイクラーの使用機種と反応チューブの種類に合わせて設定してください。設定の目安は、98°C の場合は 5 ~ 10 sec.、94°C の場合は 20 ~ 30 sec. です。

VI. 至適パラメーターの設定

SpeedSTAR HS DNA Polymerase の性能を最大限に引き出すために、各パラメーターの設定条件をご参照ください。

(1) 酵素量

通常 1.25 U/50 μ l の使用をお勧めします。鋳型 DNA 量、増幅サイズによっては、若干増減すると良い場合がありますが、酵素量が多すぎると非特異的な反応が起こりやすくなったり、スミアになる場合があります。また、少なすぎると増幅効率が悪くなることがあります。

(2) 鋳型 DNA 量

鋳型量が多すぎると、非特異的な増幅やスミアが起こる場合があります。推奨鋳型量は次の通りです。

(50 μ l 反応系の場合)

ヒトゲノム DNA の場合	5 ~ 500 ng
<i>E. coli</i> ゲノム DNA の場合	50pg ~ 100 ng
プラスミド DNA の場合	10 pg ~ 1 ng

(3) dNTP と Mg²⁺

添付の Fast Buffer I には最終濃度 3 mM、Fast Buffer II には最終濃度 2 mM の Mg²⁺ が含まれており、dNTP を最終濃度 200 μ 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至適化されています。

(4) プライマー

プライマーは、プライマー設計ソフト (OLIGO Primer Analysis Software など) を使用して、最適な配列を選択してください。

基本的には 20 ~ 25 mer のプライマーで良好な結果が得られます。長鎖を増幅する場合には 25 ~ 30 mer に設定することで良い結果が得られる場合があります。注意点として、GC 含量は 40 ~ 60% とし、配列中で塩基の偏りが無く、プライマーの 3' 末端部が GC リッチにならないようにします。また、上流、下流のプライマーの Tm 値は揃えるようにします。

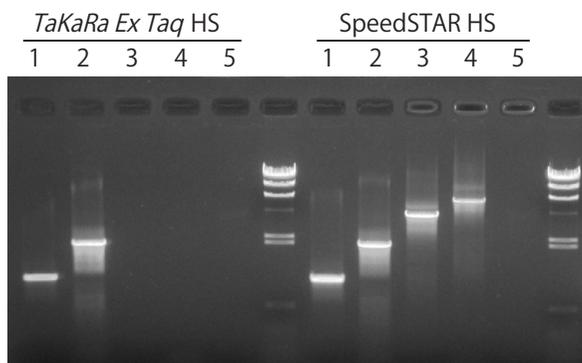
プライマーの使用量は、最終濃度 0.2 ~ 1.0 μ M で至適濃度を検討します。プライマー濃度が低すぎると増幅量が低下する場合があります。逆にプライマー濃度が高すぎると、非特異的な反応が進み、特異的な増幅反応に影響する場合があります。

VII. 参考資料

<迅速性>

下記のデータは、2 step PCR で伸長時間を 45 秒に設定した場合に何 kb まで増幅可能かを比較したものです。*TaKaRa Ex Taq*[®] Hot Start Version では 2 kb まででしたが、SpeedSTAR HS では 6 kb までの増幅が可能でした。

(なお、伸長時間を適切に設定した場合、*TaKaRa Ex Taq* HS も良好な増幅を示しました。)



Template :

E. coli ゲノム DNA 50 ng/50 μ l

増幅長

1. 1 kb < PCR 条件 >

2. 2 kb 94 $^{\circ}$ C 1 min.

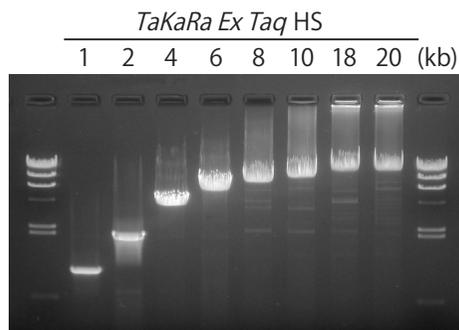
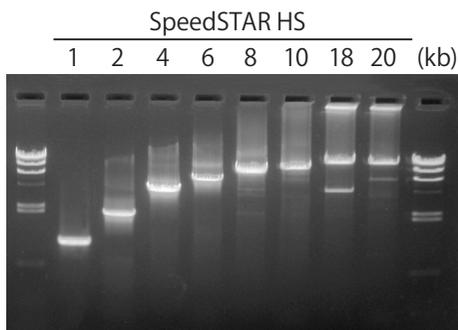
3. 4 kb ↓

4. 6 kb 95 $^{\circ}$ C 5 sec.] 30 cycles

5. 8 kb 68 $^{\circ}$ C 45 sec.]

<反応性>

SpeedSTAR HS および *TaKaRa Ex Taq* HS を用いた 2 step PCR により *E. coli* ゲノム DNA を鋳型として、各種サイズのターゲットを増幅しました。各反応の PCR 条件と、反応所要時間を下記に示します。



< SpeedSTAR HS >

1 kb、2 kb 約 33 分
 94°C 1 min.
 ↓
 95°C 5 sec. } 30 cycles
 65°C 20 sec. }
 Fast Buffer I 使用

4 kb、6 kb 約 53 分
 94°C 1 min.
 ↓
 95°C 5 sec. } 30 cycles
 65°C 60 sec. }
 Fast Buffer II 使用

8 kb、10 kb 約 83 分
 94°C 1 min.
 ↓
 98°C 5 sec. } 30 cycles
 68°C 2 min. }
 Fast Buffer II 使用

18 kb、20 kb 約 3 時間 29 分
 94°C 1 min.
 ↓
 98°C 5 sec. } 35 cycles
 68°C 5 min. }
 ↓
 72°C 5 min.
 Fast Buffer II 使用

< *TaKaRa Ex Taq* HS >

1 kb、2 kb 約 96 分
 94°C 1 min.
 ↓
 98°C 10 sec. } 30 cycles
 68°C 2 min. }

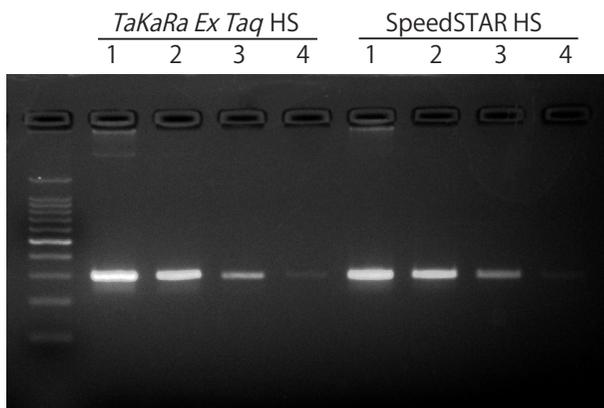
4 kb、6 kb 約 3 時間 46 分
 94°C 1 min.
 ↓
 98°C 10 sec. } 30 cycles
 68°C 6 min. }
 ↓
 72°C 10 min.

8 kb、10 kb 約 5 時間 46 分
 94°C 1 min.
 ↓
 98°C 10 sec. } 30 cycles
 68°C 10 min. }
 ↓
 72°C 10 min.

18 kb、20 kb 約 8 時間 16 分
 94°C 1 min.
 ↓
 98°C 10 sec. } 30 cycles
 68°C 15 min. }
 ↓
 72°C 10 min.

<検出感度>

ヒトゲノム DNA を鋳型とした反応で、SpeedSTAR HS と *TaKaRa Ex Taq* HS のそれぞれの至適条件下での検出感度を比較しました。() 内は反応所要時間です。



< *TaKaRa Ex Taq* HS > (67 分)

98°C 5 sec. }
55°C 30 sec. } 30 cycles
72°C 30 sec. }

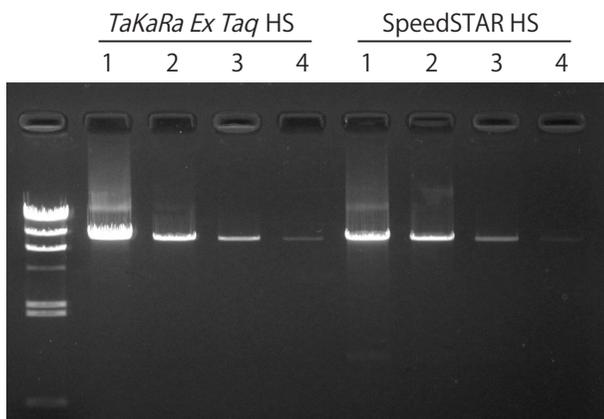
< SpeedSTAR HS > (39 分)

98°C 5 sec. }
55°C 10 sec. } 30 cycles
72°C 5 sec. }
Fast Buffer I 使用

増幅鎖長 300 bp

1.	ヒトゲノム DNA	100 ng
2.	ヒトゲノム DNA	10 ng
3.	ヒトゲノム DNA	1 ng
4.	ヒトゲノム DNA	0.1 ng

in 50 μ l



< *TaKaRa Ex Taq* HS >

(4 時間 59 分)

94°C 1 min.
↓
98°C 5 sec. }
68°C 8.5 min. } 30 cycles
↓
72°C 10 min.

< SpeedSTAR HS >

(1 時間 40 分)

94°C 1 min.
↓
98°C 5 sec. }
68°C 2 min. } 35 cycles
↓
72°C 3 min.
Fast Buffer II 使用

増幅鎖長 8.5 kb

1.	ヒトゲノム DNA	100 ng
2.	ヒトゲノム DNA	10 ng
3.	ヒトゲノム DNA	1 ng
4.	ヒトゲノム DNA	0.1 ng

in 50 μ l

VIII. 増幅産物について

SpeedSTAR HS DNA polymerase を用いて増幅した PCR 産物のほとんどは、3' 末端に A が 1 塩基付加されています。従って、その PCR 産物をそのまま T-Vector にクローニングすることが可能です。また、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可能です。

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	伸長時間	20 sec./kb に設定する
	アニーリング温度	2℃ずつ下げて反応する 3 step PCR で反応する
	鋳型 DNA	DNA の精製度を上げる 長鎖の増幅の場合は、損傷の少ない DNA が必要
	プライマー	プライマーの設定をやり直す プライマーの使用量を増やす
エキストラバンドが出る スメアする	伸長時間	必要以上に伸長ステップの時間を長くしない (目安) 2 step の場合：10 ~ 20 sec./kb 3 step の場合：5 ~ 10 sec./kb
	アニーリング温度	2℃ずつ上げて反応する 2 step PCR で反応する
	鋳型 DNA	適量の鋳型 DNA を使用する 必要以上に使用しない
	プライマー	プライマーの使用量を少なくする

X. 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 Ex Taq* はタカラバイオ株式会社の登録商標です。SpeedSTAR 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