

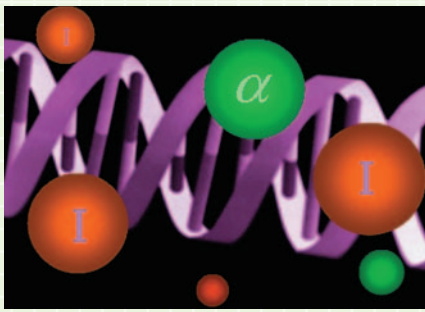
Blend Taq®

品名	包装	Code No.	価格
Blend Taq®	50Units × 1本	BTQ-101T	¥5,000
	250Units × 1本	BTQ-101	¥19,000
	1,000Units × 1本	BTQ-102	¥62,000
	1,000Units × 3本	BTQ-103	¥170,000
Blend Taq® -Plus- (Hot Start Version)	50Units × 1本	BTQ-201T	¥6,000
	250Units × 1本	BTQ-201	¥21,000

次世代の改良型Taqポリメラーゼです。幅広いターゲットを効率良く、確実に増幅できます。

PCR酵素の新スタンダード

1 Blend Taq®を用いたPCR実施例



はじめに

今日、各社より様々なPCR用酵素が販売されていますが、それらは主にPol I型、 α 型、および混合型に大別できます。なかでもTaqに代表されるPol I型酵素は、優れたDNA合成能を持つことから、PCR技術発明当初より幅広く使用されています。しかしながら、Pol I型酵素には3'→5' Exonuclease (Proofreading) 活性がないことから、間違っただ塩基を取り込んでしまった場合には伸長反応がストップし、その結果として、増幅できるターゲットのサイズや増幅量には限界があることが知られています。一方、KODやPfuに代表される α 型の酵素は、3'→5' Exo活性を有し、間違っただ塩基を除去・修復することができます。しかし、その強いExo活性故にPCR効率の点では一般的にPol I型に劣ると言われています。そこで、Pol I型酵素に微量の α 型酵素を加えることにより両者の欠点を補い、長所を合わせ持つようにしたのが混合型の酵素です。

Blend Taq®及びBlend Taq®-Plus-は、Taq DNAポリメラーゼをベースに α 型酵素を最適な割合でブレンドした混合型酵素です。 α 型酵素の種類及びそのブレンド比を徹底的に検討することにより、増幅効率、伸長性において非常に優れたものとなっています。さらに、Blend Taq®-Plus-においては、抗Taqモノクローナル抗体により、簡単にホットスタートPCRを行うことができ、高い特異性が得られます。

今回は、本酵素の持つこれらの特長についてご紹介いたします。

方法

反応は、取扱説明書に従い、以下のようにPCR mixtureを調製しました。

D.W.	33.5 (μ l)
10×Buffer for Blend Taq®	5
2mM dNTPs	5
Primer F (10 μ M)	1
Primer R (10 μ M)	1
Template DNA (5~200ng)	4
Blend Taq® (2.5units/ μ l)	0.5
Total	50 μ l

PCRサイクルは、基本的に以下の表に従い実施しました。すなわち、6kb未満のターゲットに対しては3ステップで、6kb以上のターゲットに対しては2ステップのサイクルを用いました。さらに10kb以上のターゲットの場合は、dNTPの終濃度を0.3mMにして実施しました。

Segment	Target			Number of Cycles
	<1kb	1kb~6kb	>6kb	
1	94°C 2min.			30
2 Denaturation	94°C 30sec.*1			
3 Annealing	Primer Tm-5°C (55~60°C) 30sec.		68°C 1min./kb PCR target*2	
4 Extension	72°C 1min.	72°C 1min./kb PCR target		

*1: ターゲットによっては、98°C、5~10秒の条件にて良好な結果が得られる場合もあります。

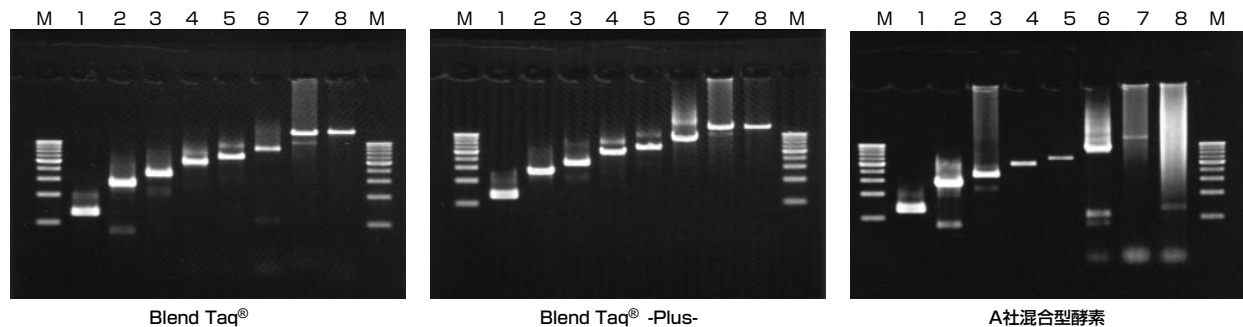
*2: 6kb以上の長いターゲットの場合はプライマーのTmが70°C以上になるように設計します。

結果

1. 種々のサイズの遺伝子をターゲットとした伸長性の評価

Human β -globin遺伝子あるいはhuman myosin heavy chain遺伝子をターゲットとして、種々のサイズの増幅を試みました。鋳型にはヒトゲノムDNA 100ngまたは200ngを使用しました。また、同時に、比較のため他社混合型酵素を用いて、その推奨条件にてPCRを行いました。

その結果、Blend Taq®およびBlend Taq®-Plus-では、ターゲット長が23.0kbでも良好な増幅が見られ、他社混合型酵素と比べて優れた伸長性を示すことが確認できました(図1)。また、Blend Taq®で認められる若干の非特異的増幅バンドがBlend Taq®-Plus-では見られず、ホットスタートの効果も確認できました。



Blend Taq®

Blend Taq® -Plus-

A社混合型酵素

Lane M : 1kb DNAラダーマーカー
 Lane 1 : β -globin 1.3kb Lane 5 : Myosin h.c. 6.2kb
 Lane 2 : β -globin 2.7kb Lane 6 : β -globin 8.5kb
 Lane 3 : β -globin 3.6kb Lane 7 : β -globin 17.5kb
 Lane 4 : Myosin h.c. 5.2kb Lane 8 : β -globin 23.0kb

図1. 種々のサイズの遺伝子をターゲットとした伸長性の評価

2. 微量サンプルを鋳型とした増幅効率の評価

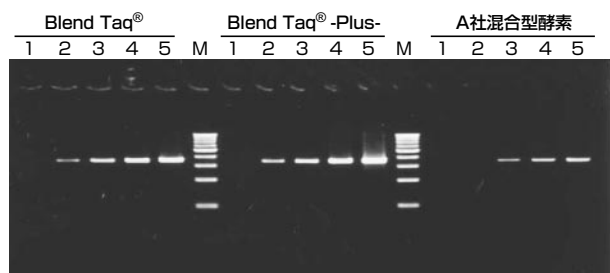
ヒトゲノムDNAを段階希釈したものを鋳型として、Human β -globin遺伝子3.6kbの増幅を試みました。

その結果、Blend Taq® 及びBlend Taq® -Plus-では、ゲノムDNA 5ngを鋳型とした場合でも明瞭な増幅を確認でき、他社混合型酵素と比べて優れた増幅効率を示すことが確認できました (図2)。

まとめ

以上、本コーナーでは、Blend Taq®の優れた伸長性および増幅効率についてお示しました。また、本酵素は、TaqベースのPCR酵素であるため、Taqと同じサイクル条件を適用でき、PCR産物のTAクローニングが可能なおも特長です。なお、Blend Taq®は、Taqの3~4倍の正確性を持っていますが、さらに正確性を要する用途には、弊社のHigh Fidelity酵素KOD、KOD -Plus-もしくはKOD -Plus-Ver.2を用いられることをお奨めします。

最後に、Blend Taq®を使用された先生方からいただいたPCR実施例をご紹介します。紙面の都合上、一部しかご紹介できませんが、多くの先生方にご好評いただいています。反応条件等の詳細は、<http://www.toyobo.co.jp/bio>をご覧ください。



Lane M : 1kb DNAラダーマーカー
 Lane 1 : Templateなし
 Lane 2 : ゲノムDNA 5ng
 Lane 3 : ゲノムDNA 10ng
 Lane 4 : ゲノムDNA 20ng
 Lane 5 : ゲノムDNA 40ng

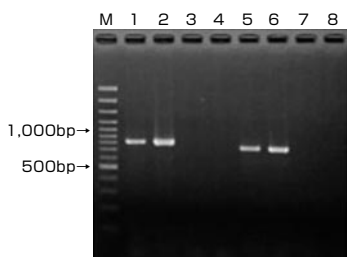
図2. 微量サンプルを鋳型とした増幅効率の評価

参考文献

Barns, W.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**:2216-2220 (1994)

ユーザーの先生方からご提供いただいたBlend Taq®使用例

マガキのミトコンドリア領域のPCR

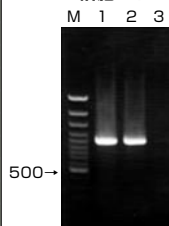


マガキ (*Crassostres gigas*) ミトコンドリア領域A 1-4
 マガキ (*Crassostres gigas*) ミトコンドリア領域B 5-8

Lane M : 100bpラダーマーカー
 Lane 1, 5 : Blend Taq® 0.050U/10 μ l
 Lane 2, 6 : A社混合型酵素 0.125U/10 μ l
 Lane 3, 7 : A社混合型酵素 0.050U/10 μ l
 Lane 4, 8 : A社混合型酵素 0.025U/10 μ l

資料ご提供：
 長崎大学大学院生産科学研究科
 博士後期課程 沖本 宣音先生
 高崎大学大学院農学研究科
 水族生理学分野 荒西 太士先生

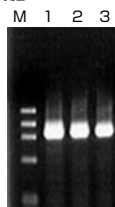
PC12細胞からの細胞分化因子のRT-PCR



Lane M : 100bpラダーマーカー
 Lane 1 : Blend Taq®
 Lane 2 : Blend Taq® -Plus-
 Lane 3 : A社混合型酵素

資料ご提供：
 大阪府立大学大学院
 農学生命科学研究科 獣医学専攻
 細胞分子生物学研究室
 竹中 重雄先生

ES細胞からのRT-PCR



Lane 1 : Blend Taq® -Plus-
 Lane 2 : Blend Taq®
 Lane 3 : A社混合型酵素

資料ご提供：
 大阪大学微生物病研究所
 遺伝子動態研究分野