

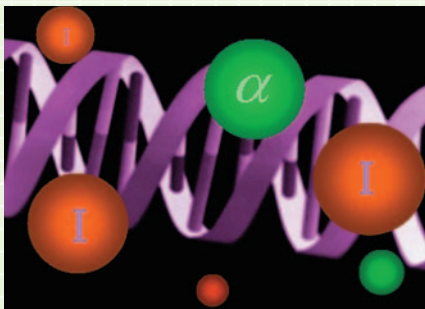
Blend Taq®

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。

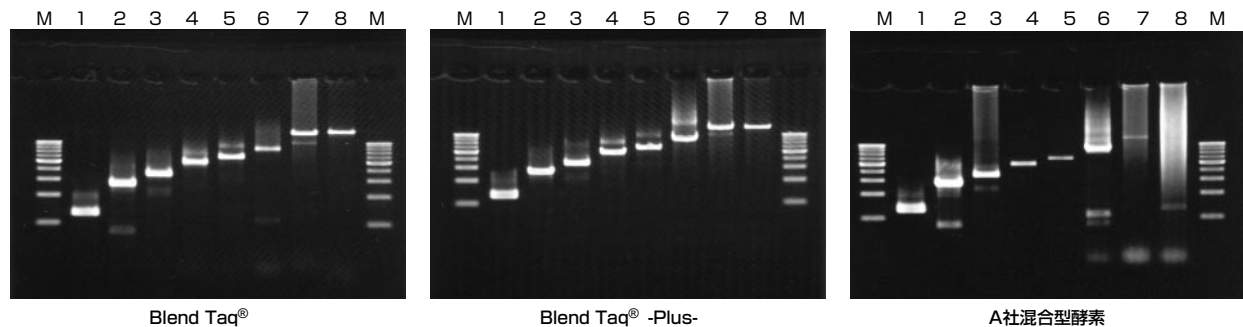
*2: 6kb以上の長いターゲットの場合はプライマーのTmが70°C以上になるように設計します。

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 : 1 kb 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。

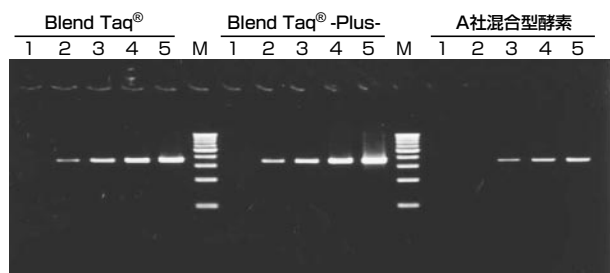


図2. 微量サンプルを鋳型とした増幅効率の評価

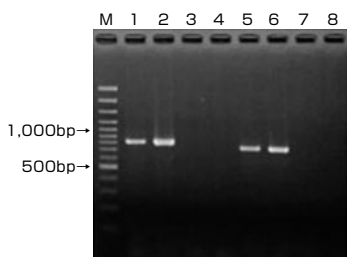
Lane M : 1 kb DNAラダーマーカー
 Lane 1 : Templateなし
 Lane 2 : ゲノムDNA 5ng
 Lane 3 : ゲノムDNA 10ng
 Lane 4 : ゲノムDNA 20ng
 Lane 5 : ゲノムDNA 40ng

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

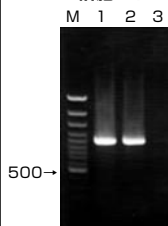


マガキ (*Crassostres gigas*) ミトコンドリア領域A 1-4
 マガキ (*Crassostres gigas*) ミトコンドリア領域B 5-8

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

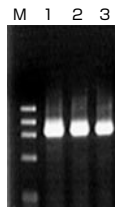
PC12細胞からの細胞分化因子のRT-PCR



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

2 Blend Taq[®]およびKOD Dash[®]を用いるコロニーダイレクトPCR

はじめに

Blend Taq[®]およびKOD Dash[®]は混合型PCR用酵素であり、優れたパフォーマンスが必要なPCRに幅広く応用することができます。今回、一般的な研究室において最も頻繁に行われていると予想される、大腸菌コロニーを直接鋳型とするインサートチェックPCRへ本酵素を応用した例をご紹介します。それぞれの酵素には、以下のような特性があり、それぞれの用途に応じて使い分けることで、最適な結果を得ることが可能です。

	Blend Taq [®]	KOD Dash [®]
説明	高度に精製されたTaq DNAポリメラーゼに3'→5' Exonuclease活性を有するDNAポリメラーゼを最適な混合比でブレンドすることにより、優れたパフォーマンスを実現した高効率DNAポリメラーゼ。	3'→5' Exonuclease活性を欠損させたKOD DNAポリメラーゼをベースとして、KOD DNAポリメラーゼを混合した高効率DNAポリメラーゼ。合成速度に優れ、かつ安定なKOD DNAポリメラーゼの利点を継承している。
特長	① 確実 ② Taq DNAポリメラーゼ感覚で条件を設定可能 ③ 安価 (¥19,000 / 250U) ④ 場合によっては、ホットスタート可能なBlend Taq [®] -Plus- を使用することも可能。	① 確実 ② 短時間増幅 (伸長時間30sec. / 1kb) ③ PCR溶液とした後、そのまま凍結保存し、何度も凍結融解しながら使用することが可能。

方法

コロニーダイレクトPCRの推奨反応条件を図1に、操作フローを図2に示しました。

今回は、弊社TAクローニングキット:TA Target Clone[™]を用いて、pTA2 Vectorに4.5kbのPCRプロダクトをクローニングした後、コロニーダイレクトPCRを行って、インサートの有無を確認しました。比較のため、同一コロニー (宿主はJM109使用) についてBlend Taq[®]およびKOD Dash[®]を用いて増幅を実施し、5 μlを1%アガロースゲルにて解析しています。プライマーおよびPCRサイクルは図1および下記に示した条件を用いました。

〈Primer配列〉

F primer : TCGAGGTCGACGGTATCGAT (20mer GC=55%)

R primer : CGCTCTAGAACTAGTGGATC (20mer GC=50%)

※プライマーはベクター上に設計

〈アニーリング温度および伸長時間〉

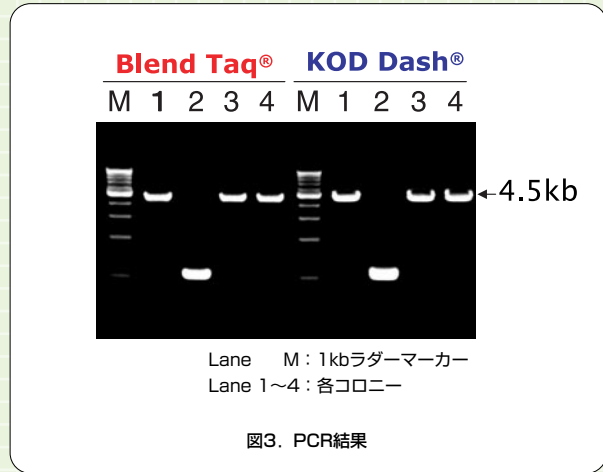
Blend Taq[®] アニーリング : 55°C、伸長時間 : 4.5min.

KOD Dash[®] アニーリング : 60°C、伸長時間 : 2.5min.

Blend Taq [®]			
	(1サンプル分)	() サンプル分	
D.W.	21.9 (μl)	() <input type="checkbox"/>	
10× Buffer for Blend Taq [®]	3	() <input type="checkbox"/>	
2mM dNTPs	3	() <input type="checkbox"/>	
Forward primer (10pmole/μl)	0.9	() <input type="checkbox"/>	
Reverse primer (10pmole/μl)	0.9	() <input type="checkbox"/>	
Blend Taq [®]	0.3	() <input type="checkbox"/>	
Total	30 (μl)	30 μl ずつ分注	

KOD Dash [®]			
	(1サンプル分)	() サンプル分	
D.W.	23 (μl)	() <input type="checkbox"/>	
10× KOD Dash [®] buffer	3	() <input type="checkbox"/>	
2mM dNTPs	3	() <input type="checkbox"/>	
Forward primer (10pmole/μl)	0.35	() <input type="checkbox"/>	
Reverse primer (10pmole/μl)	0.35	() <input type="checkbox"/>	
KOD Dash [®]	0.3	() <input type="checkbox"/>	
Total	30 (μl)	30 μl ずつ分注	

図1. それぞれの酵素におけるコロニーダイレクトPCRの反応条件



結果及び考察

4つのコロニーにおいて、いずれも良好な結果を得ることができました。3コロニーにインサートが挿入されていたことが確認できます。プライマーダイマーの生成はほとんど確認できませんでした。またデータは示しませんが、精製後のシーケンス解析結果も良好でした。

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD Dash®	250U×1本	-20℃	LDP-101	¥25,000
TArget Clone™	10回用	-20℃	TAK-101	¥12,000
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-	200回用	室温	NPK-601	¥25,000
Magical Trapper 【磁性スタンド】	1個	室温	MGS-101	¥38,000

Asterand

Asterand社ヒト病理組織

世界各地の提携先より提供された様々な病理組織を、厳密な品質管理の下、詳細な臨床データを添えてお届けいたします。

充実のラインナップ

世界各国40ヶ所以上の提供先から提供された病理組織を臨床データを添えて約10万サンプル（2004年末現在）保有しております。お客様のご要望にマッチしたサンプルを検索し、ご提供いたします。事前に各検体のHE画像、RNAの品質、既往歴、投薬歴などの臨床データをご覧いただけます。

豊富な保存形態・関連試料

凍結切片、パラフィン包埋切片（FFPE）の他、血清、血漿、RNA、DNAもお届け可能です。

※詳細につきましては右記ホームページにてご覧いただくことができます。 <http://www.asterand.com>

倫理面での厳格な対応

これらの検体は、研究、臨床開発用途での使用を目的とした試料、関連情報の提供、保有に適合されるすべての法律、規則、ガイドラインに従って入手、提供されています。

- すべてのサンプルでインフォームドコンセントが得られています。
- すべてのサンプルで2度にわたる匿名化が行われています。
- サンプルの分譲にあたっては、弊社とのMTA (Material Transfer Agreement) の締結及び、御使用される施設の生命倫理委員会での承認が必要になります。