

-monoclonal antibody for Hot Start PCR-

anti-Taq high

(Code No. TCP-101,TCP-101X5)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A3268K

ご注意

本キットに含まれる試薬類はすべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

この製品は、日本国特許No.2647794のライセンスによる契約及び同意の下で、製造・販売されています。

[1] はじめに

anti-Taq highは *Thermus aquaticus* YT-1株由来のTaq DNAポリメラーゼに対するモノクローナル抗体で、従来お使いいただいているTaq DNAポリメラーゼに添加するだけで簡単にホットスタートPCRを行うことができる試薬です。

本製品には、以下の特徴があります。

1. 操作が簡単

お手持ちのTaq DNAポリメラーゼと混合するだけですぐお使いいただけます。また、Taq DNAポリメラーゼをベースとしたLong PCR用酵素にもお使いいただけます。

2. マウスゲノミックDNAのコンタミネーションがない

マウス L1リピート コンセンサスシーケンス特異的プライマーセットをもちいたPCRで、プロダクトが検出されないことを確認しています。

3. 高いDNA合成阻害能

40°CにおいてTaq DNAポリメラーゼの活性を95%以上阻害することを確認しています。

[2] ホットスタートPCR 法の原理

PCRの第一サイクルにおいては、プライマーが鋳型DNAと非特異的に2本鎖ハイブリッドを形成したり、プライマー同士が2本鎖ハイブリッドを形成することがあります。これらが鋳型プライマーとしてDNAポリメラーゼの基質となり、伸長反応が起こった場合、エキストラバンドやプライマーダイマーが生成し、目的断片の収量が低下する原因となります。ホットスタート法は、PCRの第一サイクルにおいてこれらの反応を回避して、目的断片の増幅効率を高める方法です。

従来のホットスタートPCR法では、酵素、プライマー、鋳型DNA、dNTPsなど伸長反応に必要なコンポーネントのうちいずれかを除いた反応液をミスアニーリングが解消される温度まで昇温した後、除いておいたコンポーネントを加えるという方法が採られていました。しかし、この方法は非常に煩雑でコンタミネーションの可能性もありました。

anti-Taq highは70°C以下でTaq DNAポリメラーゼに結合し、その活性をブロックします。そのため、あらかじめanti-Taq highと結合したTaq DNAポリメラーゼを用いれば、PCRの第一サイクルにおけるミスアニーリングハイブリッドからの伸長反応を防ぐことができます。また、anti-Taq highは70°C以上で失活するため、第一サイクルの変性ステップで完全に不活化され、その後のTaq DNAポリメラーゼの反応を阻害しません。

[3] キットに含まれているもの(-20°C保存)

anti-Taq high	100 μ l	1.0 mg/ml
(for 500unit of Taq DNA polymerase)		

anti-Taq high 10X PCR buffer	1000 μ l	100mM Tris-HCl (pH8.3 at 25°C)
		15mM MgCl ₂
		500mM KCl

※TCP-101X5は、TCP-101の5セット組です。

[4] ご用意いただくもの

PCRを行う際には、本製品のほかに以下のものが必要となります。

1. 試薬

- ・Taq DNAポリメラーゼ、或いはTaq DNAポリメラーゼをベースとしたLong PCR用酵素
- ・dNTPs mixture
- ・ミネラルオイル(必要に応じて)
- ・滅菌蒸留水
- ・PCR用プライマー

2. 機器・器具

- ・サーマルサイクラー
- ・マイクロ遠心機
- ・PCR用チューブ

[5] プロトコール

1. Taq DNAポリメラーゼとの混合液の調製

Taq DNAポリメラーゼ1 unitあたり0.2 μ lのanti-Taq highを添加し軽く混合します。
Taq DNAポリメラーゼが5unit/ μ lならば等量のanti-Taq highを添加します。
そのまま室温(20~25 $^{\circ}$ C)で5分間放置します。これで結合は完了します。

2. 混合液の保存

anti-Taq highは凍結融解を繰り返すと、その機能が低下します。Taq DNAポリメラーゼとの混合液を保存する際は、凍結しないようご注意ください。

anti-Taq highは50%グリセロールを含んだ溶液の形で供給されています。50%グリセロールを含む溶液のTaq DNAポリメラーゼと混合した場合、-20 $^{\circ}$ Cで保存してください。6ヶ月は安定です。

50%以上のグリセロールを含んでいないTaq DNAポリメラーゼと混合した場合は4 $^{\circ}$ Cで保存してください。2週間までは安定であることを確認しています。

3. PCR反応液の調製

PCR反応液に必要な量の混合液を添加します。通常のPCRではTaq DNAポリメラーゼを1~5unit(上記で調製した混合液0.4~2 μ l)の範囲で加えます。

サンプル間のピペッティングによる誤差を抑えるため、反応液を調製する際はマスターミックスを作製することをお勧めします。以下にマスターミックスの調製例を示します。

マスターミックス調製例(DNAサンプル 2 μ l、10反応分)

①anti-Taq high Taq DNAポリメラーゼ混合液を調製します。

Taq DNAポリメラーゼ (5units/ μ l)	4 μ l
---------------------------------	-----------

anti-Taq high	4 μ l
---------------	-----------

total	8 μ l
-------	-----------

室温(20~25 $^{\circ}$ C)で5分間放置します。

②以下の試薬を混合しマスターミックスを調製します。

試薬	1反応あたり	10反応
滅菌蒸留水	35.8 μ l	358 μ l
anti-Taq high 10 \times PCR Buffer*	5 μ l	50 μ l
5' プライマー (10 pmoles/ μ l)	1 μ l	10 μ l
3' プライマー (10 pmoles/ μ l)	1 μ l	10 μ l
0.2mM each dNTPs mixture	5 μ l	50 μ l
anti-Taq high Taq DNAポリメラーゼ混合液	0.8 μ l	8 μ l
total	48 μ l	480 μ l

*anti-Taq high 10 \times PCR Bufferには、15mM MgCl₂が含まれています。

*Long PCR用酵素をご使用の場合、その酵素に添付されている専用バッファーもお使いいただけます。

③マスターミックスを分注しDNAサンプルを加えます。

マスターミックス	48 μ l
DNAサンプル	2 μ l
total	50 μ l

必要に応じミネラルオイルを滴下します。

4. サイクル反応

通常のサイクル反応を行います。抗体を変性失活させるためのステップは特に必要ありません。以下にその1例を示します。

95°C 30秒
55°C 30秒 X30サイクル
72°C 60秒

サイクル反応は、用いるプライマーおよび目的断片の配列、増幅長、DNAサンプルの量等により至適条件が異なります。それぞれの組み合わせに適したサイクル反応条件で行ってください。

[6] トラブルシューティング

1. 増幅バンドが確認できない、または、増幅効率が悪い。

原因		対策
サンプルDNA	<ul style="list-style-type: none"> ・純度が悪い ・鋳型量が少ない ・劣化している 	<ul style="list-style-type: none"> ・再調製する ・PCRのサイクル数を増やす ・鋳型量を増やす ・再調製する。 ・使用頻度が高い場合は、あらかじめ少量ずつ分注しておく
プライマー	<ul style="list-style-type: none"> ・Tm値が低い ・配列が適切でない ・プライマー量が少ない 	<ul style="list-style-type: none"> ・アニーリング温度を下げる、またはプライマーを再設計する ・配列が正しいことを確認する ・プライマー内、あるいはプライマー間に相補的な領域がないことを確認する ・PCRのプライマー2つが同一鎖にアニールしないことを確認する ・1反応当り、10 pmol 以上使用する
サイクル条件	<ul style="list-style-type: none"> ・アニーリング温度が高い ・伸長時間が短い ・サーマルサイクラーの作動が適切でない 	<ul style="list-style-type: none"> ・サイクル条件を検討する ・サイクル条件を検討する ・動作が正常であるかを確認する

2. 非特異的なバンドが多い

原因		対策
サンプルDNA	<ul style="list-style-type: none"> ・量が多すぎる 	<ul style="list-style-type: none"> ・鋳型量を減らす
プライマー	<ul style="list-style-type: none"> ・配列が適切でない ・プライマー量が多すぎる 	<ul style="list-style-type: none"> ・ターゲット領域以外にもアニーリングしやすい領域がある→プライマーを再設計する ・プライマー量を検討する
PCR条件	<ul style="list-style-type: none"> ・アニーリング温度が低い 	<ul style="list-style-type: none"> ・アニーリング温度を上げる
その他	<ul style="list-style-type: none"> ・サンプル間のコンタミネーション 	<ul style="list-style-type: none"> ・チップをこまめに交換する ・フィルターチップを用いる

[7] 参考文献

1. D'Aquila, R. T. *et al.* (1991) *Nucl. Acids. Res.* **19**, 3749
2. Chou, Q. *et al.* (1992) *Nucl. Acids. Res.* **20**, 1717
3. Kellogg, D. E. *et al.* (1994) *BioTechniques* **16**, 1134

[8] 関連商品

品名	内容	Code No.
rTaq (recombinant Taq) DNA Polymerase 〈Mg 別添タイプ〉	250U	TAP-201
rTaq (recombinant Taq) DNA Polymerase 〈Mg 含有タイプ〉	250U	TAP-211
dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTPの4本セット)	50 μ mol \times 4	NTP-101
100 bp DNA ラダー 他 DNA ラダーマーカー各種	カタログを御参照く ださい	
λ / <i>Hind</i> III digest 他 DNAサイズマーカー各種	カタログを御参照く ださい	
UV サンプル撮影装置 FAS-III & FAS-III mini	カタログを御参照く ださい	



【製造・販売元】

－納期・注文に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部（大阪）
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部（東京）
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号 住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00 (土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>