製品コード R045A

TaKaRa

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase

説明書

v201102Da

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase は、世界最速の伸長速度と PrimeSTAR® HS DNA Polymerase が元来有する非常に高い正確性、高感度、高特異性、ならびに確実性を兼ね備えた世界最高水準の PCR 増幅システムです。 酵素自体が有する高いプライミング効率と独自の伸長因子の添加により、アニーリング時間と伸長時間を大幅に短縮し、PCR 反応の驚異的なハイスピード化を実現しました。また、これまで増幅困難であった多量の核酸を含む反応系においても、伸長時間を標準的な時間に設定することで増幅が可能となり、非常に使いやすくなりました。さらに、本酵素が常温下での 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用いたホットスタート用酵素であること、および反応コンポーネントをプレミックス化したことにより、常温での迅速な反応液調製が可能です。

I. 内容（100 回反応分）

PrimeSTAR® Max Premix（2×）　625 μl×4

※ Mg^{2+} 濃度は 2 mM（2 ×）です。

II. 保存

－ 20℃
過剰に凍結融解を繰り返すと活性が低下する場合がありますのでご注意ください。

III. 一般的な PCR 反応液組成（Total 50 μl）

	使用量	最終濃度
PrimeSTAR® Max Premix（2×）	25 μl	1 ×
Primer 1	10 ～ 15 pmol	0.2 ～ 0.3 μM
Primer 2	10 ～ 15 pmol	0.2 ～ 0.3 μM
Template	＜ 200 ng ＊	
滅菌蒸留水	up to 50 μl	

＊：V. 至適パラメーターの設定を参照してください。

（注意）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

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase を用いた高速増幅システムでは、伸長因子の効果を最大限発揮させるために 3 ステップでの反応をお勧めします。

（A）核酸量が 200 ng/50 μl 反応系以下の場合＊

98℃	10 sec.	30 ～ 35 cycles
55℃	5 sec. or 15 sec.	
72℃	5 sec./kb	

（B）核酸量が 200 ng/50 μl 反応系を超える場合＊

98℃	10 sec.	30 ～ 35 cycles
55℃	5 sec. or 15 sec.	
72℃	30 ～ 60 sec./kb	

もしくは

98℃	10 sec.	30 ～ 35 cycles
68℃	30 ～ 60 sec./kb	

＊：逆転写産物（cDNA）を鋳型とする高速反応（5 ～ 10 sec./kb）の場合、鋳型 cDNA 量を total RNA 125 ng 相当 /50 μl 反応系以下に設定してください。
伸長時間を長め（～ 1 min./kb）に設定することで、持込み可能な鋳型量を増やすことが可能です（～ total RNA 750 ng 相当 /50 μl 反応系）。
[VI. 特長 C. 鋳型量と反応速度（cDNA を鋳型とする場合）を参照]

● 変性条件　98℃　5 ～ 10 sec. を推奨します。94℃で行う場合は 10 ～ 15 sec. に設定してください。
● アニーリング温度　まず 55℃で試してください。
● アニーリング時間　Tm 値（下記の式で計算）が 55℃以上の場合 → 5 sec. に設定
Tm 値（下記の式で計算）が 55℃未満の場合 → 15 sec. に設定

※ Tm 値の計算方法

Tm 値（℃）＝ 2（NA ＋ NT）＋ 4（NC ＋ NG）－ 5

プライマーの長さが 25 mer 以下の場合に適用してください。25 mer を超える場合は、アニーリング時間を 5 sec. に設定してください。

＜ 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、アニーリング時間は 5 sec. もしくは 15 sec. に設定して反応を行ってください。アニーリング時間が長くなると、スメアが生じる場合があります。

3 step でスメアになる場合、2 step での反応をお試しください。
その他、V. 至適パラメーターの設定、VIII. トラブルシューティングもご確認ください。

V. 至適パラメーターの設定

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 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）鋳型 DNA 量

高速（5 sec./kb）で増幅できる至適鋳型 DNA 量は次のとおりです。（50 μl 反応系の場合）

ヒトゲノム DNA の場合	5 ng ～ 200 ng
大腸菌ゲノム DNA の場合	100 pg ～ 200 ng
λDNA の場合	10 pg ～ 10 ng
プラスミド DNA の場合	10 pg ～ 1 ng

200 ng を超える核酸を 50 μl 反応系に鋳型として使用する場合は伸長時間を 30 ～ 60 sec./kb に設定することで良好な結果が得られます。

なお、逆転写産物（cDNA）を鋳型として高速（5 ～ 10 sec./kb）で増幅する場合には、鋳型 cDNA 量を total RNA 25 ～ 125 ng 相当 /50 μl 系に設定してください。
［ VI. 特長　C. 鋳型量と反応速度（cDNA を鋳型とする場合）を参照 ］

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。

（2）増幅鎖長

5 sec./kb（逆転写産物が鋳型の場合は、5 ～ 10 sec./kb）の高速反応で良好に増幅可能な鎖長は次のとおりです。

ヒトゲノム DNA の場合	～ 6 kb
大腸菌ゲノム DNA の場合	～ 10 kb
逆転写産物（cDNA）	～ 6 kb
λDNA の場合	～ 15 kb

至適増幅鎖長を超える増幅反応を行う場合は、伸長時間を 15 ～ 30 sec./kb に設定してお試しください。ただし、増幅の成否は鋳型の量、質、ターゲット領域の配列などにより影響を受けます。

（3）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：製品コード NB100 など）を利用するなどして、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 のプライマーで充分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。
［ IV. PCR 条件 ］に基づいて、PCR 条件を選択してください。

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 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。

（4）アニーリング条件

［ IV. PCR 条件 ］に基づいて設定してください。良好な結果が得られない場合は、以下の方法で検討してください。

＜ スメア、エキストラバンドが生じる場合 ＞

（1） アニーリング時間を短くする。15 sec. で行っている場合は 5 sec. に設定する。

（2） 既に 5 sec. に設定している場合は、アニーリング温度を 58 ～ 63℃に上げる。

（3） 2 step PCR にする。

＜ 目的産物が増幅しない（少ない）場合 ＞

（1） アニーリング時間を長くする。5 sec. で行っている場合は 15 sec. に設定する。

（2） アニーリング温度を 50 ～ 53℃に下げる。

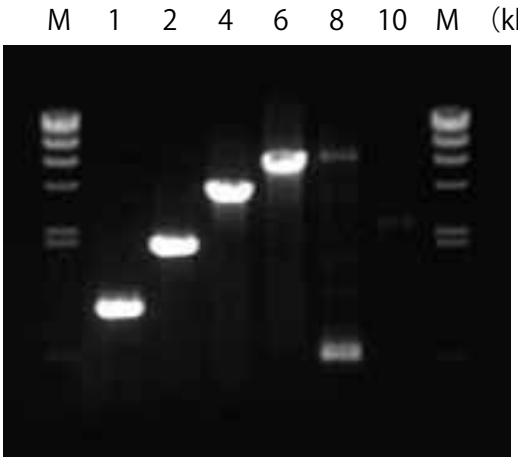
VI. PrimeSTAR® Max DNA Polymerase の特徴

A. 増幅速度

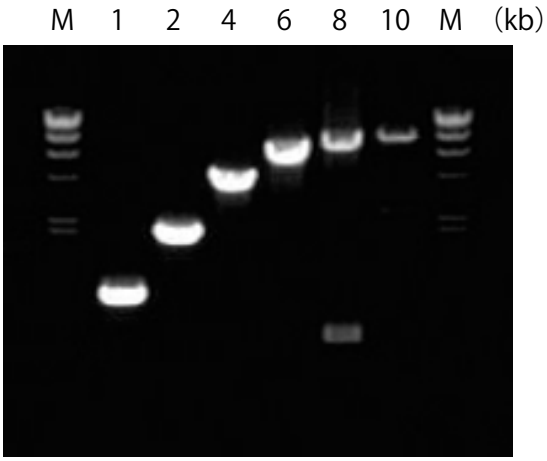
（1）λDNA を鋳型として、各サイズの増幅をアニーリング時間 5 秒、伸長時間 10 秒あるいは 30 秒で行いました。

鋳型	λDNA 1 ng / 50 μl 反応系		
サーマルサイクラー	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice®		
PCR 条件	98℃	10 sec.	30 cycles
	55℃	5 sec.	
	72℃	10 or 30 sec.	

【 伸長時間　10 秒 】



【 伸長時間　30 秒 】



M： λ-*Hin*d III digest

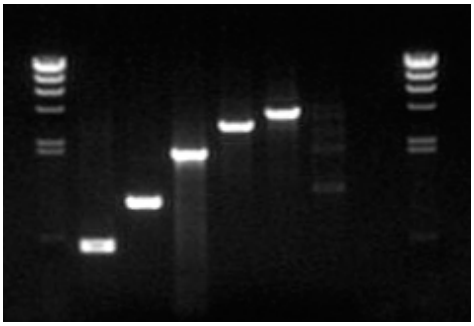
伸長時間 10 秒で 6 kb、30 秒で 8 kb まで良好な増幅が見られ、λDNA を鋳型とする系では 5 sec./kb の伸長時間設定が可能と考えられます。

(2)　ヒトゲノムを鋳型として、各サイズの増幅をアニーリング時間 5 秒、伸長時間 10 秒あるいは 30 秒で行いました。

鋳型	ヒトゲノム DNA 100 ng / 50 μl 反応系		
サーマルサイクラー	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice®		
PCR 条件	98℃	10 sec.	30 cycles
	55℃	5 sec.	
	72℃	10 or 30 sec.	

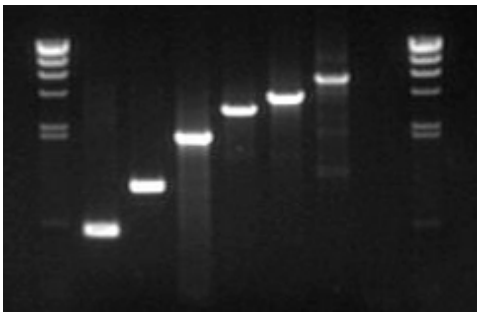
【伸長時間　10 秒】

M 0.5 1 2 3 4 6 7.5 M (kb)



【伸長時間　30 秒】

M 0.5 1 2 3 4 6 7.5 M (kb)



M：λ-*Hin*d III digest

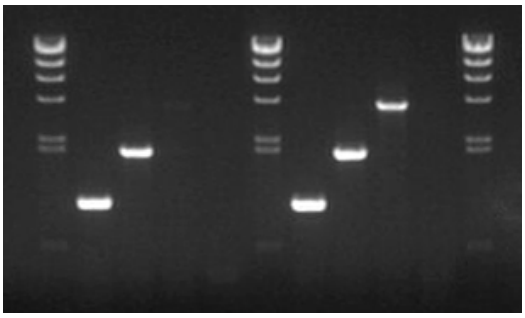
伸長時間 10 秒で 4 kb、30 秒で 6 kb まで良好な増幅が見られ、ヒトゲノム DNA を鋳型とする系でも 5 sec./kb の伸長時間設定が可能と考えられます。

(3)　cDNA を鋳型として、各サイズの増幅をアニーリング時間 15 秒、伸長時間 10 秒あるいは 30 秒で行いました。

鋳型	cDNA（Total RNA 100 ng 相当）/ 50 μl 反応系		
サーマルサイクラー	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice®		
PCR 条件	98℃	10 sec.	30 cycles
	55℃	15 sec.	
	72℃	10 or 30 sec.	

【伸長時間　10 秒】【伸長時間　30 秒】

M 1 2 4 6 M 1 2 4 6 M (kb)



M：λ-*Hin*d III digest

伸長時間 10 秒で 2 kb、30 秒では 4 kb まで良好な増幅が確認できました。cDNA を鋳型とする系では、5 ～ 10 sec./kb の伸長時間設定が必要です。

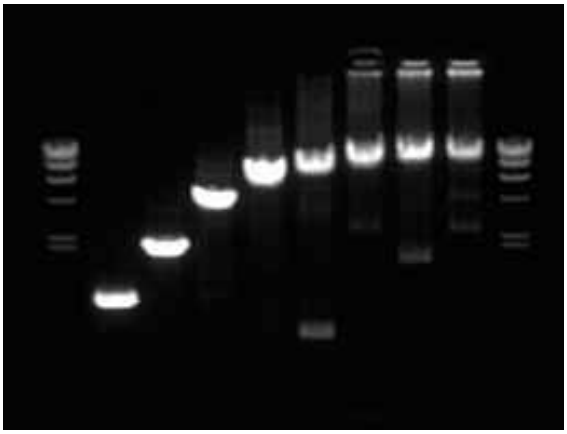
B. 増幅鎖長

λDNA、大腸菌ゲノム DNA、ヒトゲノム DNA および cDNA を鋳型として、アニーリング時間 5 秒もしくは 15 秒、伸長時間 5 sec./kb（cDNA の場合は 10 sec/kb）の設定で増幅可能なサイズを確認しました。

鋳型	λDNA	1 ng	
	大腸菌ゲノム DNA	50 ng	
	ヒトゲノム DNA	100 ng	
	cDNA total RNA	100 ng 相当	
サーマルサイクラー	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice®		
PCR 条件	98℃	10 sec.	30 cycles
	55℃	5 or 15 sec.	
	72℃	5（or 10）sec./kb	

【 λDNA 】

M 1 2 4 6 8 10 12 15 M （kb）

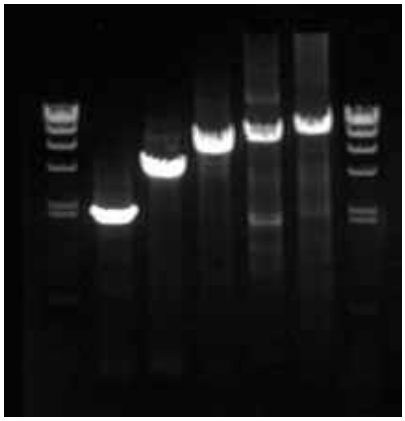


M： λ-*Hin*d III digest

5 sec./kb の高速反応で 15 kb までの良好な増幅を確認しました。

【 大腸菌ゲノム DNA 】

M 2 4 6 8 10 M （kb）

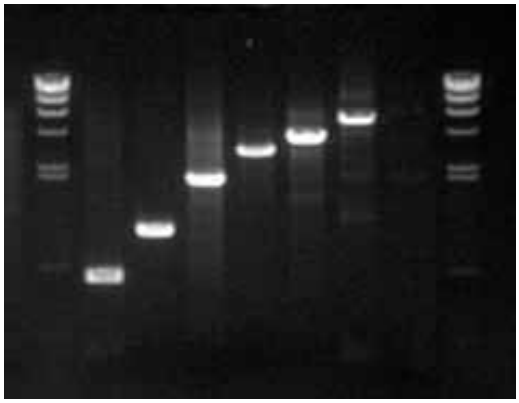


M： λ-*Hin*d III digest

5 sec./kb の高速反応で 10 kb までの良好な増幅を確認しました。

【 ヒトゲノム DNA 】

M 0.5 1 2 3 4 6 7.5 M （kb）

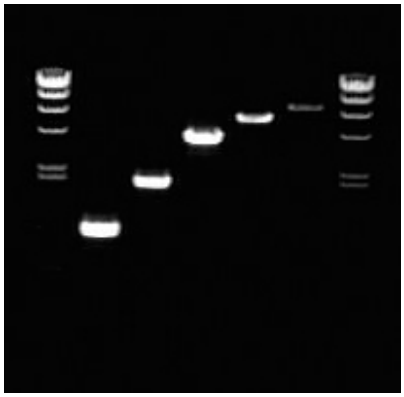


M： λ-*Hin*d III digest

5 sec./kb の高速反応で 6 kb までの良好な増幅を確認しました。

【 cDNA 】

M 1 2 4 6 8 M （kb）

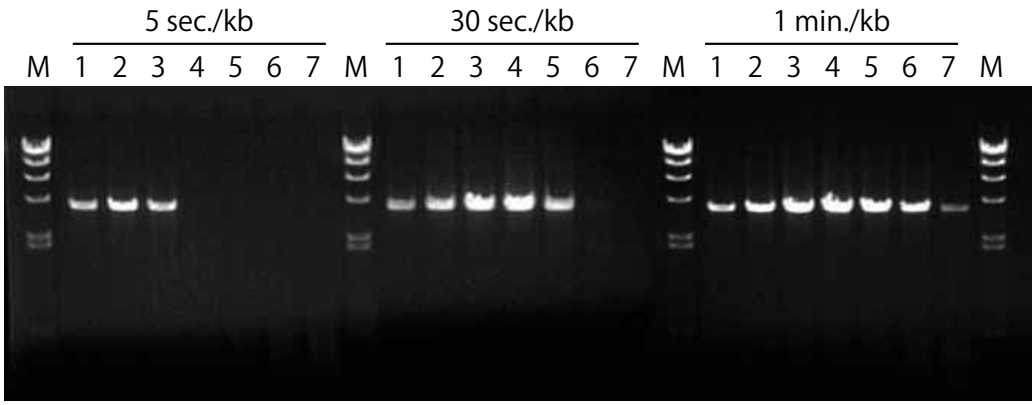


M： λ-*Hin*d III digest

10 sec./kb の高速反応で 6 kb までの良好な増幅を確認しました。

C. 鋳型量と反応速度（cDNA を鋳型とする場合）

さまざまな濃度の total RNA を逆転写して得られた cDNA を鋳型に、トランスフェリンレセプター（TFR）4 kb を、伸長時間 20 秒（5 sec./kb）、2 分（30 sec./kb）および 4 分（1 min./kb）に設定した PCR で増幅し、増幅効率を比較しました。



鋳型量（50 μl 系）

1：total RNA	25 ng 相当	5：total RNA	500 ng 相当
2：total RNA	50 ng 相当	6：total RNA	750 ng 相当
3：total RNA	125 ng 相当	7：total RNA	1 μg 相当
4：total RNA	250 ng 相当	M：λ-*Hin*d III digest	

伸長時間 5 sec./kb の高速反応では、鋳型として用いる cDNA 量を total RNA 125 ng 相当 /50 μl 反応系以下に設定する必要があります。伸長時間を長め（～ 1 min./kb）に設定することで、持ち込み可能な cDNA は著しく増加します（～ total RNA 750 ng 相当 /50 μl 反応系）。

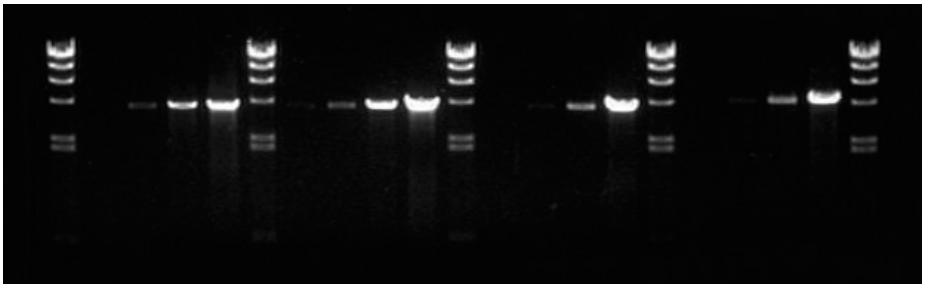
D. 感度

ヒトゲノム DNA、大腸菌ゲノム DNA、λDNA、プラスミド DNA を鋳型に、伸長時間 20 秒で 4 kb を増幅する場合の感度を確認しました。

サーマルサイクラー　TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice®

PCR 条件

98℃	10 sec.	30 cycles
55℃	5 sec.	
72℃	20 sec.	



λ-*Hin*d III digest

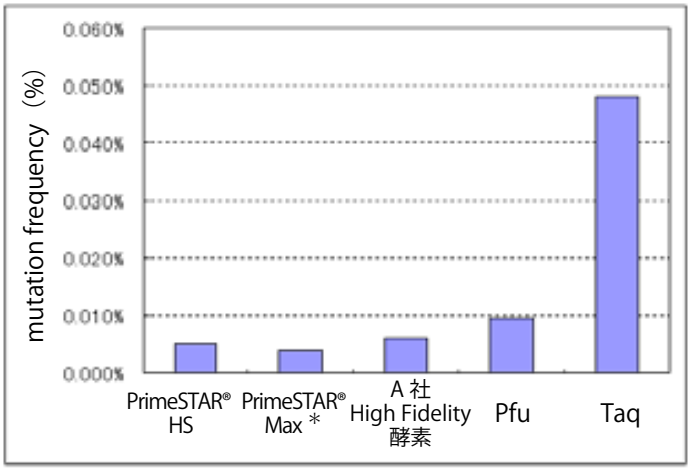
	レーン 1	レーン 2	レーン 3	レーン 4
ヒトゲノム DNA	100 pg	1 ng	10 ng	100 ng
大腸菌ゲノム DNA	1 pg	10 pg	100 pg	1 ng
λDNA	100 fg	1 pg	10 pg	100 pg
プラスミド DNA	100 fg	1 pg	10 pg	100 pg

E. 正確性

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® Max DNA Polymerase は *Taq* DNA Polymerase と比べて 10 倍 Fidelity が高く、PrimeSTAR® HS DNA Polymerase や A 社 High Fidelity 酵素に比べても同等以上の正確性を示しました。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



mutation frequency

＊：PrimeSTAR® Max DNA Polymerase で増幅した場合、実際に解析した 230,129 塩基のうち、エラーはわずかに 9 塩基でした。

VII. 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

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase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）増幅産物のクローニング

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase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® Extract II（製品コード740609.10/.50/.250）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® Max 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シングを行う前にフェノール／クロロホルム処理、NucleoSpin® Extract II（製品コード740609.10/.50/.250）などのタンパク質除去操作を行うことをお勧めします。

VIII. 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	伸長時間10～60 sec./kbに設定する＊。
	サイクル数	35～40 cyclesに設定する。
	アニーリング時間	15 sec.に設定する。
	アニーリング温度	2℃ずつ下げてみる。
	反応液量	25 μlで反応してみる。
	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＊。
	プライマー濃度	0.2～0.5 μM（final conc.）で検討する。
エキストラバンドがでる スメアする	アニーリング時間	5 sec.に設定する。
	アニーリング温度	63℃まで2℃ずつ上げてみる。 2 step PCRを試す。
	鋳型DNA量	適量の鋳型DNAを使用する。必要以上に使用しない。
	サイクル数	25～30 cyclesに設定する。
	プライマー濃度	0.2～0.3 μM（final conc.）で検討する。

＊：熱抽出液等の多量のRNAを含むcrudeなサンプルを鋳型とする場合、伸長時間を60 sec./kbに設定することで改善することがあります。

X. 関連製品

PrimeScript® High Fidelity RT-PCR Kit（製品コード R022A）
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® Mutagenesis Basal Kit（製品コード R046A）
NucleoSpin® Extract II（製品コード 740609.10/.50/.250）
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）
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient/Standard（製品コード TP600/TP650）

XI. 注意

・本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用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。

NOTICE TO PURCHASER : LIMITED LICENSE

[L15] Hot Start PCR
Licensed under U.S. Patent No. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

[M54] PrimeSTAR® HS DNA Polymerase
This product is covered by the claims of U.S. Patent Nos. 7,704,713 and its foreign counterparts.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201102Da