

Product Information

JumpStart™ Taq DNA Polymerase

15 mM MgCl₂ 含有 10× 反応バッファー付属

製品番号 D9307

保存温度 -20 °C

TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

製品概要

JumpStart Taq DNA Polymerase (JumpStart Taq) は、Sigma の高性能 Taq DNA Polymerase と JumpStart Taq 抗体が最適に混合されています。JumpStart Taq DNA Polymerase において、Taq DNA ポリメラーゼ活性は、Taq DNA ポリメラーゼに対する中和モノクローナル抗体である JumpStart Taq 抗体に本酵素を結合させることによって不活性化されています。抗体で不活性化されていることで、ホットスタート PCR[†]用の簡単で効率的な操作が行えます。ホットスタート PCR は、非特異的な増幅産物およびプライマー二量体アーチファクトの産生を減少させることによって、著しく DNA 増幅の結果を向上させることが可能です。PCR で使用する際、JumpStart Taq DNA Polymerase は低温 (室温) では不活性です。温度がサイクリング工程の最初の変性段階で 70 °C 以上に上昇すると、その複合体が解離し、ポリメラーゼが完全に活性化します。

JumpStart Taq の代表的な用途には PCR 反応があり、これは複合ゲノムまたは cDNA テンプレート、ターゲットのコピー数が極めて少ない、熱サイクル数が多い (>35) および同一の反応チューブ内に複数のプライマー対が存在するなどの、1 つ以上の要因が関与する PCR 反応です。

本酵素は 2.5 units/mL で供給され、15 mM MgCl₂ を含む最適化された 10× 反応バッファーが付属しています。

ユニットの定義: 1 unit は、74 °C において 30 分で酸不溶性 DNA に 10 nmol の総デオキシリボヌクレオシド三リン酸を取り込みます。

付属する試薬

- JumpStart Taq DNA Polymerase、製品番号 D6558
75 mM KCl, 15 mM トリス HCl, pH 7.5, 50% グリセロール, 0.05 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 安定剤, 0.25% IGEPAL®CA-630 中 2.5 units/μL。(50、250 または 1,500 units で提供)

- 10× PCR バッファー、製品番号 P2192
100 mM トリス HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% (w/v) ゼラチン
1.5 mL バイアル入り

本製品以外にご用意いただく試薬および器具

- 10 mM dATP、製品番号 D6920
- 10 mM dCTP、製品番号 D7045
- 10 mM dGTP、製品番号 D7170
- 10 mM TTP、製品番号 T7791
または
- 10 mM dATP、10 mM dCTP、10 mM dGTP、10 mM TTP を含有するデオキシヌクレオチド混合物、製品番号 D7295
- 水、PCR 試薬、製品番号 W1754
- ミネラルオイル、製品番号 M8662
- 0.2 mL および 0.5 mL の薄壁 PCR マイクロチューブ、製造番号 P3114 および P3364
- サーマルサイクラー
- プライマー
- 増幅させる DNA
- クロロホルム、製品番号 C7559 (オプション)

注意事項と免責事項

本製品は試験研究用のみを目的として販売されています。医薬品、家庭用その他試験研究以外の用途には使用できません。危険性や安全な取り扱いに関しては化学物質安全データシート (MSDS) をご覧ください。

保存/安定性

-20 °C で保存してください。4 °C で最長 3 カ月まで、-20 °C で最高 6 カ月まで保存できます。供給時の保存バッファーおよび供給時の濃度において、JumpStart Taq は、-20 °C で凍結することはありません。-20 °C 以下で JumpStart Taq を凍らせることは、推奨されません。凍結融解のサイクルを繰り返すと、その機能に悪影響を及ぼす恐れがあります。

手順

酵素-抗体複合体を妨げる可能性があるため、JumpStart Taq DNA ポリメラーゼと DMSO またはホルムアミドとの使用は推奨されません。他の共溶媒、溶質 (例えば、塩) および極端な pH または他の反応条件により、Taq DNA ポリメラーゼに対する JumpStart Taq 抗体の親和性が減少し、それによってその有効性を損なう可能性があります。

PCR Master Mixの調製および熱サイクリングのパラメータ

Taq DNA ポリメラーゼは、マグネシウムイオン依存性酵素なので、Taq、テンプレート DNA、プライマーおよび MgCl₂ の濃度の最適条件は、利用されるシステムによって決まります。個々の成分に対して最適条件を判定することが必要です。このことは JumpStart Taq、サイクリングパラメータおよび MgCl₂ の濃度では特に当てはまります。最適の効率を決定するために本酵素および MgCl₂ を滴定することが推奨されます。

チューブとチューブの変動を最小化するために、JumpStart Taq との PCR master mix の調製が推奨されます。実施する PCR 反応数に基づいて調製される量を決めてください。

1. 1 回の反応に対して、下記の試薬を 0.2 または 0.5 mL マイクロチューブに下記の順序で加えてください。

量	構成	最終濃度
x μ L	水	
5 μ L	10x PCR バッファー	1x
1 μ L*	10 mM dATP	200 μ M
1 μ L*	10 mM dCTP	200 μ M
1 μ L*	10 mM dGTP	200 μ M
1 μ L*	10 mM TTP	200 μ M
y μ L	プライマー	0.1~0.5 μ M
1 μ L	JumpStart Taq DNA Polymerase	0.05 units/ μ L
z μ L	テンプレート DNA (一般的に 10 ng)	200 pg/ μ L
50 μ L	総反応量	

*個々のヌクレオチド (各 10 mM 溶液 1 μ L、合計 4 μ M) は、1 μ L の Deoxynucleotide Mix (製品番号 D7295) と交換することができます。

2. 静かに攪拌して、短時間遠心し、チューブの底に全ての成分を集めます。
3. 蒸発を防ぐために各チューブの上部に 50 μ L のミネラルオイルを加えてください (サーマルサイクラーのモデルによって任意に行ってください)。
4. 増幅のパラメータは、使用するプライマーおよびサーマルサイクラーによって異なります。個々のプライマー、テンプレートおよびサーマルサイクラーごとにシステムを最適化する必要があります。

典型的なサイクリングパラメータ

初期の変性	94 °C	1 分
25~35 サイクル		
変性	94 °C	30 秒
アニーリング	55 °C~68 °C	30 秒
伸長	72 °C	1 分 (最小限)*
最終伸長	72 °C	1 分 (最小限)*
ホールド	4 °C	

*最小限で 1 分間または予期される単位複製配列の kb あたり 1 分間

増幅した DNA は、アガロースゲル電気泳動法およびその後の臭化エチジウム染色によって評価することができます。ミネラルオイルの重層は、1 回のクロロホルム抽出 (1:1) により除去でき、水相を回復させることができます。

トラブルシューティングガイド

問題	提案
JumpStart Taq を使用する時、非特異的な生成物の減少が認められない。	<p>マニュアルのホットスタート法を使用して PCR システムを試験してください。</p> <p>酵素-抗体複合体を妨げるので、JumpStart Taq と DMSO またはホルムアミドの使用は推奨されません。他の共溶媒、溶質 (例えば、塩) および極端な pH または他の反応条件により Taq ポリメラーゼに対する JumpStart Taq 抗体の親和性が減少し、それによってその有効性を損なう可能性があります。</p>
JumpStart Taq PCR およびマニュアルのホットスタート PCR により複数の非特異的な生成物が産生する。	<p>2〜3 °C 刻みでアニーリング温度を上げてください。温度を上げることで、プライマーによる結合の特異性を向上させますが、プライマーの結合および伸長を減少させる可能性があります。アニーリング温度を上げることで、副反応物の比例減少率はわずかで、特定の生成物の収量が減少したならば、プライマーの再デザインが必要と思われます¹。</p> <p>特定 PCR 生成物プライマーおよび非特異的 PCR 生成物プライマー (二量体アーチファクトなど) による PCR 反応の交差汚染を避けるために、特別な予防措置をとってください²。</p>
JumpStart Taq PCR がマニュアルのホットスタート PCR より多く非特異的な生成物を産生する。	JumpStart Taq の滴定が、PCR の反応条件を最適化させるために必要となるかもしれません。特に、条件が本文書に記載のものと異なる場合は当てはまります。この場合、推奨濃度より 2 から 4 倍高い濃度の JumpStart Taq の希釈標準溶液から始めてください。
特定の生成物の収量が JumpStart Taq を使用すると低い。	<p>反応容積を 150 µL 以上に増やしてください。</p> <p>増幅サイクル数を増やしてください。現在、25〜30 サイクルを使用しているならば、サイクル数を 35〜40 サイクルに増やしてください。このことにより著しい副反応物の増加なしに収量が増加するはずです。</p> <p>PCR のプライミングの機会を増やすために、反応条件・標的の選択を変更してください。例えば、変性の問題を解決するために、変性時間の 1〜1.5 分までの増加や変性温度を 95 °C のレベルまで上げてください。</p> <p>酵素-抗体複合体を妨げる可能性があるので、JumpStart Taq と DMSO またはホルムアミドとの使用は推奨されません。</p>

参考文献

1. Huang, L. M. and Jeang, K.-T. *BioTechniques* **16**:242-246 (1994)
2. Kwok, S. and Higuchi, R. *Nature* **339**:237-238 (1989)

一般参照

- Griffin, H. G. and Griffin, A. M. (Eds.) *PCR Technology: Current Innovations*, CRC Press, 1994. 製品番号 Z357499
- Innis, M. A., et al. (Eds.), *PCR Strategies*, Academic Press, New York (1995). 製品番号 Z364452
- Innis, M., et al. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, California (1990). 製品番号 P8177
- Newton, C. R. (Ed.), *PCR: Essential Data*, John Wiley & Sons, New York (1995). 製品番号 Z364916
- Sambrook, J. F., et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2000). 製品番号 M8265

†PCR 法は、Hoffman-LaRoche 社が所有する特許によって保護されています。

ご購入者への通知: 限定ライセンス

Roche Molecular Systems および F. Hoffmann-La Roche Ltd (Roche) が所有する米国特許 4,683,202、4,683,195、4,965,188 および 5,075,216、またはこれら当該の海外特許下のライセンスには、前払い金事項およびランニング・ロイヤルティ事項が存在します。本製品の購入価格には、ランニング・ロイヤルティ事項の下での限定譲渡不可権が含まれ、その使用は、本製品のこの分量を、単に購入者の研究開発活動のためのポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) および前記特許に記載の関連の工程、ならびにその使用が前払い金事項に包含されるサーマルサイクラーと本製品を併用する際の、購入者の研究開発活動を実施するための使用にのみ限定されています。前払い金事項に対する権利は、PCR 工程でこの製品を使用するための完全なライセンスを持つために、エンドユーザーによって入手される必要があります。前払い金事項の下でのこれらの権利は、Applied Biosystems から購入するか、正規のサーマルサイクラーを購入することによって得ることができます。制限なく、手数料またはその他の商業的報酬を得るために購入者の行為の結果を報告することを含む、PCR を使用するいかなる商業サービスを実施または提供する権利もここに含意または禁反言によって与えられません。PCR 工程実施のライセンスに関する詳細は、Director of Licensing at Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404 または the Licensing Department at Roche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501 に連絡を取ることで得ることができます。

JumpStart および JumpStart Taq 抗体は、米国特許番号 5,338,671 および 5,587,287、ならびに外国の当該特許の下で、in vitro での研究使用のためにライセンスを受けています。

JumpStart™ は、Sigma-Aldrich™ Biotechnology LP の商標です。

IGEPAL® は、Rhone-Poulenc AG Co. の登録商標です。

TR, PHC 11-06-1

Sigma ブランド製品は Sigma-Aldrich, Inc. を通じて販売されています。

Sigma-Aldrich, Inc. は同社製品がこの文書およびその他の Sigma-Aldrich 発行文書に含まれる情報に合致していることを保証します。お客様の個別の用途と製品の適合性についてはお客様にてご判断ください。掲載の品目、製品情報、価格などは予告なく変更される場合がございます。納品伝票または同梱の内容明細書の裏面をご覧ください。