

プロメガのPCR Master Mixの優れた製品特性のご紹介



By Mark Denhart, M.S., and Vinayak Doraiswamy, Ph.D.
Promega Corporation

要約

プロメガの PCR Master Mix は、多くの一般的なゲノム、および cDNA の鋳型を簡単に増幅できるように作成されました。PCR Master Mix は2kb までの PCR 産物を増幅するために最適化されており、より優れた安定性を示します。またプライマーと鋳型DNAを除くすべての必要な反応コンポーネントを含む2×溶液として提供されるため、ピペティングの回数や、セットアップの時間を大幅に削減できます。

はじめに

PCR 増幅反応 は分子生物学でルーチンに使われています。一般に、共通の反応コンポーネント（例えば、バッファー、dNTP、MgCl₂、および Taq DNAポリメラーゼ）と一緒に混ぜて、『マスターミックス』を作成し、それを個々の反応チューブに分注します。プライマーと鋳型DNAはPCRの直前に加えられます。プロメガの新しい PCR Master Mix は、増幅反応のために必要とされるすべてのコンポーネントを含む2×の濃度のマスターミックス溶液です。反応に特定のプライマー、DNA 鋳型、および Nuclease-Free Waterを 1× になるように加えるだけでPCRが行えます。

... PCR Master Mix ... は増幅のために必要とされる
すべての反応コンポーネントを
2× の濃度で含んでいます。

感度

研究者の微量のDNAを分析する必要性が増加するにつれ、PCR 増幅感度がより重要になっています。PCR Master Mix で行われた増幅の感度を示すために、プロメガでは Human Genomic DNA（カタログ番号 G3041）を段階希釈し、α 1-antitrypsin 遺伝子の断片を増幅しました。α 1-antitrypsin はゲノム遺伝子あたり1コピー存在します。図1に示すように、PCR Master Mix を使ってこの遺伝子をわずか2コピーしか含まない希釈液から 360bp 断片を増幅することができました。

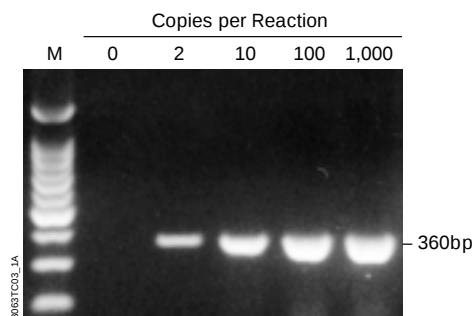


図1. PCR Master Mix を用いた少ないコピー数のテンプレートからの検出
ヒトの α 1-antitrypsin 遺伝子の 360bp 断片を、Human Genomic DNA（カタログ番号 G3041）の示された量をそれぞれ用いて増幅した。レーンM、100bp DNA Ladder（カタログ番号G2101）。

テンプレートの多様性

DNAテンプレートはバクテリアから植物やヒトまで、さまざまな種に由来します。図2に見られるように、プロメガではバクテリア、λ ファージ、ダイズ、ヒト、およびウィルスの ssRNA（5'-UTR の断片を増幅するための鋳型として）を含む多くの試料からのDNAの段階希釈をおこない PCR Master Mix を試験しました。

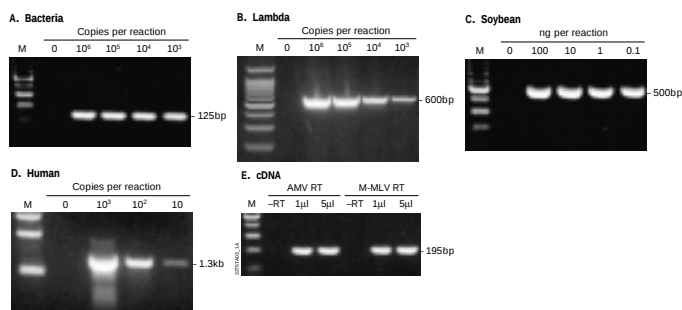


図2. 異なる試料からのDNAを使った PCR増幅反応

パネルA：大腸菌の hemL 遺伝子の 125bp 断片⁽¹⁾。
パネルB：λ ファージDNAからの 600bp 断片⁽²⁾。
パネルC：ダイズ DNA からの rbcL 遺伝子の 500bp 断片。
パネルD：Human Genomic DNA からの α 1-antitrypsin 遺伝子の 360bp 断片。
パネルE：ssRNA ウィルスから cDNA を使った5'-NTP からの 195bp 断片。
パネルA、B、C、およびEにおけるレーンMは、100bp DNA Ladder。
パネルDにおけるレーンMは、1kb DNA Step Ladder。

安定性

プロメガではPCR Master Mixの安定性試験を行なうに当たり、1) 保存による活性の経時変化と、2) 凍結融解回数による活性への影響について調べました。最初にPCR Master Mixを解凍し、それぞれ室温と4で15ヶ月まで保存した後PCRを行ない、ヒト α 1-antitrypsin から 360bp 断片を増幅しました。図3では、PCR Master Mixが15ヶ月間の保存後でも変わらずにPCRによりターゲット断片を増幅したことを示しています。

PCR Master Mixは15ヶ月間の保存後でも
変わらずにPCRにより
ターゲット断片を増幅した。

次にPCR Master Mix を使用前に10回まで凍結融解しました。『低速』と『高速』の2種類の凍結融解速度を試験しました。『低速』融解では、PCR Master Mix を-20 の冷凍庫から取り出し、室温（約25度）で融解しました。『高速』融解では、-70 の冷凍庫から直接50 の恒温槽に移し、融解しました。PCR増幅は5または10回の凍結融解後に行われました。図4で明らかなように、PCR Master Mixは10回の凍結融解後でも変わらずにターゲット断片を増幅しました。

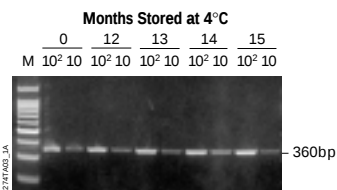


図3. 4におけるPCR Master Mixの安定性

PCR Master Mixを室温で融解した後、4で15ヶ月間保存した。保存期間終了後、表示した分子数のヒトゲノムからヒトα1-antitrypsin 遺伝子の360bp断片を増幅した。レーンM、100bp DNA Ladder。

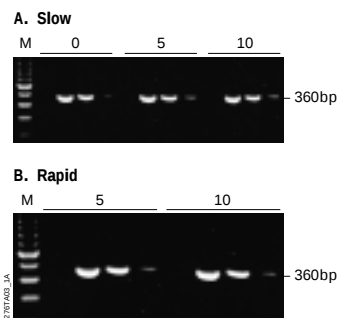


図4. PCR Master Mixの連続凍結融解による活性変化

PCR Master Mixの-20℃冷凍保存から室温での融解(『低速』:パネルA)と、-70℃冷凍保存から50℃の恒温槽での融解(『高速』:パネルB)を行なった。この図では5回と10回凍結融解を繰返した後、ヒトα1-antitrypsin 遺伝子の360bp断片を増幅した結果を示す。

高温での安定性

サーマルサイクラーは1~2℃の温度誤差を生じることがあります。このようなことを考慮して、PCR Master MixはTaq DNAポリメラーゼを高温で安定化するための特別なバッファーを含んでいます。ポリメラーゼを高温で安定化することは、高温での鋳型変性やサイクル数を増やす場合に特に重要となりえます(3)。

プロメガではPCR Master Mixを用いて、95、96、97℃で鋳型変性を行ない、ヒトα1-antitrypsin 遺伝子に含まれる360bp断片を増幅し、Taq DNAポリメラーゼの温度耐性を試験しました。図5では、他社のPCRミックスと同条件で比較した結果を示します。

他社のPCRミックスでは、95℃より高温の変性温度ではバンドの増幅が確認されませんでしたが、プロメガのPCR Master Mixではどの変性温度でも変わりなくターゲットバンドを増幅していることがわかります。

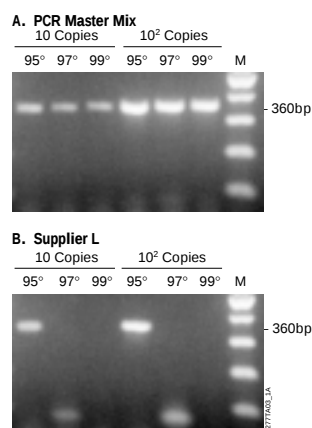


図5. PCR Master Mixの高温変性温度における温度耐性

表示した変性温度にてプロメガ社のPCR Master Mix (パネルA) と他社のPCR マスターミックス (パネルB) でヒトα1-antitrypsin 遺伝子に含まれる360bp断片を10または100分子のヒトゲノムPCR増幅を比較検討した。レーンMは100bp DNA Ladder。

スケール調整の容易さ

最後に反応容量の検討を行いました。アプリケーションにより異なる容量でPCRを行うことを要求されますが、一般的には10~50μlで反応が行なわれています。PCR Master Mixは10~50μlの反応容量で一貫した増幅結果を示しました。

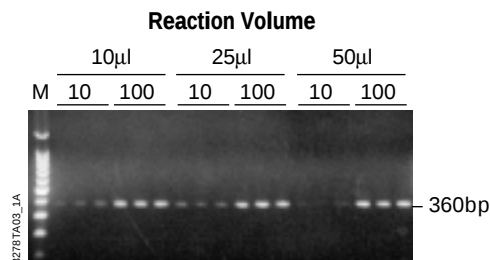


図6. PCR Master Mixのスケール調整の自在さ

ヒトα1-antitrypsin 遺伝子に含まれる360bp断片を10または100分子のヒトゲノムから増幅した。同反応は3回繰返された。レーンM、100bp DNA Ladder。

結論

この記事ではPCR Master Mixが高い感度を持ち、わずか2コピーのヒトゲノムから目的の遺伝子断片を増幅することをご紹介しました。また、125bpから1.3kbの断片を問題なく増幅し、哺乳類、植物、細菌やウイルスのゲノムを鋳型として問題なくターゲットを増幅することが示されました。また、安定性がPCR Master Mixの主要な特長となっていますが、ここでは反応容量の柔軟性に加え、4℃での長期保存の後、または凍結融解を10回繰返した後もわずかな鋳型からターゲットシークエンスを増幅できることを実験データにより示しました。さらに、このキットにはNuclease-Free Waterが添付されており、良好な結果を得られるように配慮しています。分子生物学分野の研究においてPCR増幅が重要な位置を占めるようになるにつれ、方法論の合理化が要求されています。このような状況下で2×マスターミックスとして発売されたPCR Master Mixは、反応セットアップを単一チューブで行なえるようにデザインされており、ピペティングや操作の煩雑さを減らし、試薬の無駄をなくせます。

参考文献

1. Ilag, L.L. et al. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 3408-3413.
2. Lin, J.-J. et al. (2000) *BioTechniques* **28**, 346-350.
3. Ruano G. et al. (1992) *BioTechniques* **13**, 266-274.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
PCR Master Mix	1,000回分	M7505	75,000
	100回分	M7502	10,000

* 有償サンプルとしてM7501、10回分(2,000円)がございました。