

## クイックガイド

Cat.No	Kit Size	
<b>KK3606</b>	200反応	2×1.25ml (200×25μl反応)
<b>KK3607</b>	2000反応	1×25ml (2000×25μl反応)

### 1. 製品概要

KAPA Taq Extra HotStart ReadyMix色素入り(2X)は、プライマーとテンプレートを除きロングレンジPCRに必要な全てのコンポーネントを含んだ、すぐに使用できる混合液です。

2X ReadyMixには、KAPA Taq Extra HotStart DNAポリメラーゼ (25μl反応あたり0.625U)、KAPA Taq EXtra Buffer (1X)、dNTPs (各dNTP 1Xで0.3mM)、MgCl<sub>2</sub> (1Xで2.0mM)、安定剤が含まれております。

2X ReadyMixには不活性の電気泳動用色素が2つ含まれておりますので、DNAローディング溶液を加えることなくPCR産物をアガロースゲル上に直接ローディングして、電気泳動による解析を行うことができます。

KAPA Taq Extra PCRシステムは、**Taq** DNAポリメラーゼとエンジニア加工した古細菌 (Bファミリー) DNAポリメラーゼのブレンドです。

どちらの酵素も5' -3' ポリメラーゼ活性を持ちますが、5' -3' エクソヌクレアーゼ活性を持つのは**Taq** ポリメラーゼだけであり、3' -5' エクソヌクレアーゼ活性を持つのはBファミリー DNAポリメラーゼだけです。

この2つの酵素から成るシステムは、難しいテンプレート、ロングレンジ、そして感度が求められるPCRをサポートするために設計されております。ホットスタートにおけるこの酵素ブレンドは、最初の変性ステップまでの間その酵素を不活性にする独自の抗体と結合しております。これにより、反応セットアップおよび開始の際に起こる非特異なプライマー結合が原因である誤った増幅産物を除去し、全体の反応効率を高めます。

### 2. アプリケーション

KAPA Taq EXtra HotStart ReadyMix (色素入り) は以下のアプリケーションに適しており、PCR産物はゲル電気泳動によって解析されます。

- 長いターゲットの増幅および濃度が低いテンプレートDNAを用いたPCR
- ショートおよびミドルレンジターゲットのスタンダードPCR
- 3' -T-オーバーハング・クローニングベクターへのライゲーションに使用されるPCR産物の増幅

### 3. バックグラウンド

**Taq** DNAポリメラーゼにはブルーフリーディング活性が無いため、誤って取り込まれた塩基を効率的に伸長することができません。ミスマッチ塩基対はPCR中に不完全な産物を生成し蓄積するため、標的が長い場合やテンプレートDNAの量が少ない場合は、反応の失敗につながります。これとは対照的にブルーフリーディング (ハイフィデリティー) 酵素は非常に正確ですが、ブルーフリーディング活性がプライマーを損傷して感度を下げてしまうため、テンプレートDNAの量が限られているロングレンジPCRには適しておりません。

**Taq** に少量のブルーフリーディングポリメラーゼを加えることにより、ミスマッチしている塩基が修復されます。このブレンド内におけるブルーフリーディング活性のポリメラーゼ活性に対する比率は、純粋なブルーフリーディングポリメラーゼよりも非常に低いため、プライマーの損傷は限定的です。よって、どちらかの酵素だけを使った場合よりも、ポリメラーゼブレンドを使った方がより長いアンプリコンのPCRをサポートできます。

この場合、**Taq** に比べて正確性は高くなりますが、純粋なブルーフリーディング酵素よりは低くなります。

KAPA Taq Extra HotStart ReadyMix (色素入り) は、難しいテンプレート、ロングレンジ、そして感度が求められるPCRのために開発されました。そのため、アンプリコンの長さまたはテンプレートDNA濃度の低さが原因で**Taq** ポリメラーゼがうまく機能しない場合に使用されます。このブレンドは標準アプリケーションにおける**Taq** の代わりに使用でき、特にPCRの収量が少ない場合に適しております。

**Taq** の性能が十分でありながらKAPA Taq EXtra HotStartを使用した場合は、収量が増えることは通常ありませんが、正確性は向上します。

#### ● 内容

KAPA Taq EXtra HotStart ReadyMix (2X) 色素入り  
2×マスターミックスには、最終濃度で2.0mMのMgCl<sub>2</sub>が含まれております。

#### ● 保存

全てのコンポーネントは-20℃で保存してください。

#### 電気泳動用色素

移動の目安 (1%ゲル)

黄色 : 75bp 青色 : 5kb

#### クイックノート

- 94℃の変性ステップは、ファストブロック装置の場合は変性時間を延ばします。
- ロングレンジ/高感度のPCRでは、68℃で伸長します。
- スタンダードPCRでは、プロトコルを変更せずに**Taq**の代わりに使えます。
- 生成物はT-オーバーハング・クローニングベクターにクローン化させることができます。

## 4. 反応セットアップ

KAPA Taq EXtra HotStart ReadyMix (色素入り) による一般的な反応は、以下のコンポーネントで行われます。

	最終濃度	25 µl反応
PCR grade water		Up to 25 µl
2X KAPATaq EXtra HotStart ReadyMix (色素入り)	1X	12.5 µl
Fwd primer (各10 µM)	各0.5 µM	1.25 µl
Rev primer (各10 µM)	各0.5 µM	1.25 µl
テンプレート	必要に応じて <sup>1</sup>	必要に応じて <sup>1</sup>
<b>合計</b>		<b>25 µl</b>

<sup>1</sup>：複雑な標的 (ヒトゲノムDNAなど) には<100ng、シンプルな標的 (プラスミドDNAやラムダDNAなど) には<1ngを使用します。

## 5. サイクルプロトコル

KAPA Taq EXtra HotStart ReadyMix (色素入り) を用いた、ショート/ミドルレンジPCRおよびロングレンジPCRの推奨サイクルプロトコルは下記の表のとおりです。

サイクルステップ	ショート/ミドルレンジ (最長で5kb)	ロングレンジ (5 ~ 15kb)
初期変性	95℃で3分間	95℃で3分間
変性	95℃で15秒間	94℃で15秒間
アニーリング	最適Tmで15秒間	最適Tmで15秒間
伸長	72℃で1分間/kb	68℃で1分間/kb
サイクル数	20 ~ 40	20 ~ 40
最終伸長 <sup>1</sup> (任意)	1分間/kb	1分間/kb

<sup>1</sup>：最終伸長は、フラグメントがTAクローン化される場合のみ必要です。

●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。

 **日本ジェネティクス株式会社** <http://www.n-genetics.com>

本社：〒112-0004 東京都文京区後楽1丁目4番14号 後楽森ビル18F Tel. 03 (3813) 0961 Fax. 03 (3813) 0962  
西日本営業所：〒604-8277 京都府京都市中京区西洞院通御池下ル565番地 ラフィーネ御池3F Tel. 075 (257) 5421 Fax. 075 (257) 5422

2012年10月現在のものです。製品は改良のため予告なく変更する場合があります。 10PR1210