

製品コード R005A

研究用

---

**TAKARA**

***Pyrobest*<sup>TM</sup>**  
**DNA Polymerase**

---

説明書

v201906Da

*Pyrobest* DNA Polymerase は *Pyrococcus* sp. 由来の 3' → 5' exonuclease 活性 (proof reading 活性) を有する耐熱性  $\alpha$  型 DNA ポリメラーゼです。

$\alpha$  型 DNA ポリメラーゼは、Pol I 型ポリメラーゼ (*Taq* DNA ポリメラーゼなど) に比べて PCR での至適範囲が狭く、最適な反応条件を見つけるのが難しいといわれています。

しかし *Pyrobest* はバッファーの至適化がなされており *Taq* DNA ポリメラーゼとほぼ同程度の反応性を示します (少なくとも、ヒトゲノム DNA を鋳型として約 6 kb、 $\lambda$  DNA を鋳型として約 12 kb を増幅可能)。また 3' → 5' exonuclease 活性により合成の間違いを校正するため high fidelity PCR に最適です。fidelity の面からだけでなく反応性の面からも *Pyrobest* は優れた PCR 用酵素です。

なお、10 × *Pyrobest* Buffer II を用いることで、従来のバッファー (10 × *Pyrobest* Buffer) よりさらに反応性が向上しました。

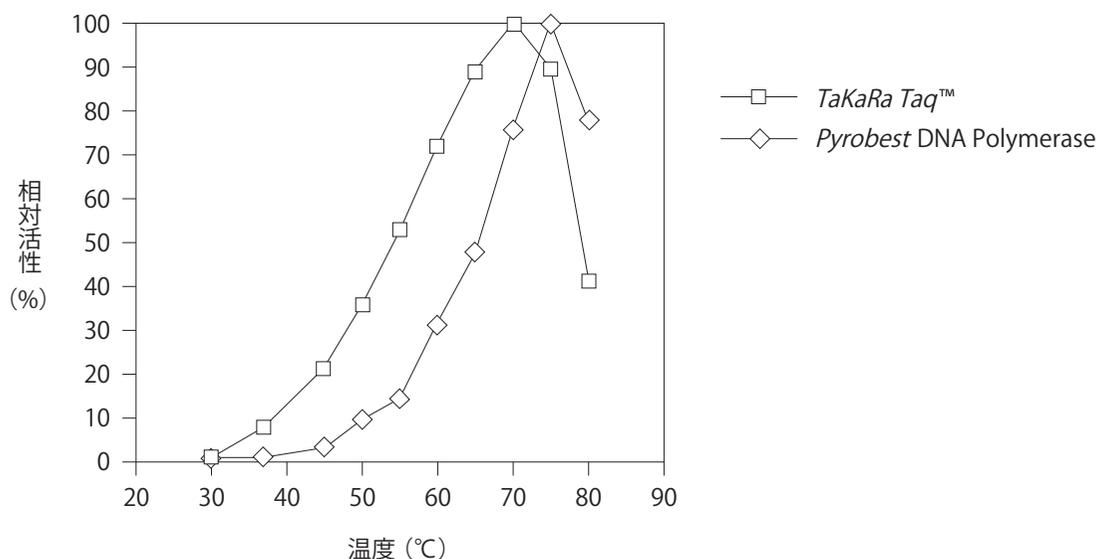
内容	<i>Pyrobest</i> DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	125 U (25 $\mu$ l)
	10 × <i>Pyrobest</i> Buffer II (Mg <sup>2+</sup> plus, 10 mM)	500 $\mu$ l
	dNTP Mixture (2.5 mM each)	400 $\mu$ l

※ 酵素の形状：50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.2)、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、0.1% Tween 20、0.1% NP-40、50% Glycerol

保存 — 20°C

## [ *Pyrobest* の特徴 ]

- ◎ 耐熱性 95°C で 1 時間 incubation 後 90% 以上の残存活性があります。
- ◎ Auto hot start *Pyrobest* の反応至適温度は *Taq* DNA ポリメラーゼに比べ高く、約 75°C です。また 40°C ~ 50°C での活性は、*Taq* DNA ポリメラーゼが 15 ~ 30% (至適温度での活性との比) であるのに対して *Pyrobest* では 2 ~ 9% の活性を示すだけです。すなわち *Pyrobest* を使用した場合、プライマーのミスプライミングによる primer-extension のリスクが少なくなります。



以上の理由から *Pyrobest* の場合、*Taq* DNA ポリメラーゼを使用した場合に行われる、いわゆる Hot Start 法を行わなくても、特異的な増幅反応が期待できます。

## [ 至適パラメーターの設定 ]

*Pyrobest* の性能を最大限に引き出し PCR を成功させるために、至適パラメーターの設定が必要です。

### PCR 反応液の各コンポーネントについて

#### ◎ 酵素量

通常 1.25 U / 50  $\mu$ l PCR をお勧めします。ただし増幅サイズ、鋳型の純度および量により若干増減した方が良い場合があります。

#### ◎ 鋳型 DNA 量

鋳型 DNA の推奨使用量は次の通りです。

ヒトゲノム DNA の場合	50 ~ 500 ng / 50 $\mu$ l PCR
$\lambda$ DNA の場合	100 pg ~ 10 ng / 50 $\mu$ l PCR
プラスミドの場合	10 pg ~ 100 pg / 50 $\mu$ l PCR

ただし、純度により至適鋳型量が増減する場合があります。  
より正確に目的の領域を増幅したい場合、鋳型 DNA を十分量使用し、PCR サイクル数を減らすようにします。

#### ◎ プライマー

*Pyrobest* の場合 (3'  $\rightarrow$  5' exonuclease 活性によりプライマーの degradation が起こる可能性があるため) 比較的高い濃度でプライマーを使用する方が良い結果が期待できます。

また、3' 端に S を持つプライマー (S - Oligo) は degradation を受けにくいという報告があり、実際 S - Oligo primer により反応性が向上する場合があります。

至適濃度	0.2 ~ 2 $\mu$ M
プライマーサイズ	25 ~ 30 mer
(3' $\rightarrow$ 5' exonuclease 活性の影響により、長めのプライマーが有利)	

※ 注 : *Pyrobest* の場合、イノシンを含むプライマーの使用は避けてください。  
degenerated primer は使用可能です。

#### ◎ dNTP と $Mg^{2+}$

dNTP にはキレート作用があり、dNTP 濃度を高くすると実効  $Mg^{2+}$  濃度が下がります。

<i>Pyrobest</i> の場合	— $Mg^{2+}$	1 mM (final conc.)
	— dNTPs	200 $\mu$ M each (final conc.)

を推奨しています。

一般に過剰の  $Mg^{2+}$  で非特異的な反応が起こりやすくなり、逆に  $Mg^{2+}$  濃度が不十分な時は反応性が低下します。

EDTA などのキレート剤が存在していると実効  $Mg^{2+}$  が下がります。通常 PCR 溶液中では、 $Mg^{2+}$  濃度は dNTP 濃度 (4 種類の total 濃度) より高く設定します。

また、dNTP 濃度が低いと 3'  $\rightarrow$  5' exonuclease 活性が見かけ上強くなるので注意が必要です。

各 dNTP の濃度は揃えてください。各 dNTP の濃度に差がある場合、取り込みエラーが起こりやすくなります。

※ 注 : *Pyrobest* の場合、dTTP のかわりに dUTP を使用すると反応性が低下します。

---

## サイクリング条件について

### ◎ 初期変性

ゲノム DNA を鋳型とする場合でも、通常 94°C 1 min. の初期変性で十分です。

### ◎ 2 step PCR or 3 step PCR

基本的には 2 step PCR (シャトル PCR) を推奨します。プライマーの T<sub>m</sub> 値が低く、2 step PCR の反応性が悪い場合には、3 step PCR を試してください。

< 2 step PCR の場合 >	98°C	1 ~ 10 sec.	} 25 ~ 30 cycles
	68°C	1 min./kb	

< 3 step PCR の場合 >	98°C	1 ~ 10 sec.	} 25 ~ 30 cycles
	55°C	30 sec. ~ 1 min.	
	72°C	1 min./kb	

### ◎ 変性

酵素の失活、鋳型 DNA のダメージを抑えるため、なるべく変性時間は短くします。変性の条件は使用機種とチューブの種類にあわせて設定してください。設定の目安としては、98°C の場合は 1 ~ 10 sec.、94°C の場合は 10 ~ 30 sec. です。

### ◎ アニーリング／伸長反応 (2 step PCR)、伸長反応 (3 step PCR)

*Pyrobest* の反応速度 (約 25 bases/sec.) および 3' → 5' exonuclease 活性による PCR 産物の分解を考慮して、伸長反応の時間は通常、1 ~ 2 min. / 1 kb (68 ~ 72°C において) に設定します。

ほとんどの場合、1 min. / 1 kb の伸長時間で十分です。不必要に長い伸長時間は避けてください。

### ◎ アニーリング (3 step PCR)

アニーリング温度はなるべくプライマー T<sub>m</sub> 値に近い温度を設定します。(プライマー T<sub>m</sub> 値) - 5°C が目安です。

Touch Down PCR も有効です。これはサイクル毎にアニーリング温度を下げていく方法です。アニーリング温度が高いときには、効率が悪いが特異的な増幅が起こります。次に増幅されたものがアニーリング温度が低くなった時に効率よく増幅されます。この方法により非特異的な増幅を抑え、特異的な反応を効率よく行うことができます。

### ◎ サイクル数

High fidelity を得るためにはサイクル数を減らすことが重要です。この際、十分量の鋳型 DNA を用いてください。

### ◎ サイクル後の伸長反応

*Taq* 系酵素を使用した場合によく用いられる、PCR サイクル後の最終の伸長ステップ (例: 72°C 10 min.) は特に必要ありません。かえってスミアの原因になる場合があります。

## [ 反応液の調製 ]

各試薬は融解後氷上に置きます。PCR 反応液の調製も出来る限り氷上で行います。これによりプライマーのミスアニーリングが原因の非特異的増幅を抑えることができます。各試薬を PCR tube に順番に加えていき、最後に軽くピペッティングにより攪拌します。

試薬を加える順番 (例)	1) 滅菌精製水
	2) 10 × <i>Pyrobest</i> Buffer II
	3) dNTP Mixture
	4) <i>Pyrobest</i> DNA Polymerase
	5) 鋳型 DNA
	6) Primer 1
	7) Primer 2

反応液調製後はなるべく早く反応をスタートしてください。

※ 注 : *Pyrobest* は dNTP Mixture を添加した後に加えてください。dNTP が存在しない場合、*Pyrobest* の 3' → 5'exonuclease 活性によりプライマーが分解される恐れがあります。

## [ High Fidelity ]

Cline の方法、Kunkel らの方法等に従い、*Pyrobest* の Fidelity を *TaKaRa Taq*、*Pfu* DNA Polymerase と比較しました。

その結果、*Pyrobest* は *Taq* の 10 倍程度、*Pfu* と同程度の High Fidelity をもっていることがわかりました。

## [ PCR 増幅産物の末端形状 ]

耐熱性 DNA ポリメラーゼは通常 TdT 活性を持ち、PCR 増幅断片の 3' 末端に nucleotide overhang (特に A) を付けます。しかし *Pyrobest* の場合 TdT 活性が非常に弱く、*Pyrobest* による PCR 増幅産物の大部分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して) 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。

## [ 逆転写酵素活性 ]

検出限界以下です。

## [ 一般的な PCR 反応組成 ]

試薬	使用量
Template DNA	< 500 ng
<i>Pyrobest</i> DNA Polymerase (5 units/μl)	0.25 μl
10 × <i>Pyrobest</i> Buffer II	5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μl
Primer 1	0.2 ~ 2 μM (final conc.)
Primer 2	0.2 ~ 2 μM (final conc.)
滅菌精製水	up to 50 μl
Total	50 μl

[トラブルシューティング]

現象	原因	対策
全く増幅しない 増幅効率が悪い	伸長時間が短い	2 min./kb に設定する
	アニーリングまたは アニーリング/伸長温度が高い	2°C ずつ下げて反応をしてみる あるいは touch down PCR を行う
	アニーリングまたは アニーリング/伸長時間が短い	1 ~ 2 min. に設定する
	反応液を調製する際の試薬添加の順番	<i>Pyrobest</i> は dNTP Mixture を添加した後に加える
	増幅断片の GC 含量が高い あるいは二次構造が強すぎる	変性温度を上げる 変性時間を長くする 98°C 1 ~ 10 sec. または 94°C 10 ~ 30 sec.
	プライマーが適当でない	純度を上げる GC 含量を 50% 前後にする サイズをなるべく長くする (25 ~ 30 mer) プライマー同士の 3' 端が相補的にならないようにする 3' 端 S-Oligo primer を使用する
	プライマー濃度が低い	0.2 ~ 2 $\mu$ M (final conc.) で検討する
	変性条件が不適當	98°C 1 ~ 10 sec. または 94°C 10 ~ 30 sec.
	酵素量が少ない	0.625 U ~ 1.25 U / 50 $\mu$ l PCR ただし増幅サイズ・鋳型の純度および量により 若干増減した方が良い場合がある
	鋳型 DNA の純度が悪い	DNA を精製しなおす
	鋳型 DNA の量が少ない	適量の鋳型 DNA を使用する ヒトゲノム DNA ~ 500 ng / 50 $\mu$ l PCR $\lambda$ DNA ~ 10 ng / 50 $\mu$ l PCR プラスミド ~ 100 pg / 50 $\mu$ l PCR
	サイクル数が少ない	~ 40 cycles に設定する

現象	原因	対策
エキストラバンドが出る	アニーリングまたはアニーリング/伸長温度が低い	2℃ずつ上げてみる touch down PCR を行ってみる
	鋳型 DNA が多い	適量の鋳型 DNA を使用する ヒトゲノム DNA ~ 500 ng / 50 µl PCR λ DNA ~ 10 ng / 50 µl PCR プラスミド ~ 100 pg / 50 µl PCR
	サイクル数が多い	25 ~ 30 cycles に設定する
	プライマー量が多い	0.2 ~ 2 µM (final conc.) で検討する
	プライマーサイズが長い	~ 30 mer に設定する
スメアーする	酵素量が多い	0.625 U ~ 1.25 U / 50 µl PCR ただし増幅サイズ・鋳型の純度および量により若干増減した方が良い場合がある
	伸長時間が長い	1 min./kb (68℃~ 72℃) に設定する
	サイクル数が多い	25 ~ 30 cycles に設定する
	鋳型 DNA が多い	適量の鋳型 DNA を使用する ヒトゲノム DNA ~ 500 ng / 50 µl PCR λ DNA ~ 10 ng / 50 µl PCR プラスミド ~ 100 pg / 50 µl PCR

#### [ 注意 ]

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断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。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- *Pyrobest*、*TaKaRa Taq* はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**テクニカルサポートライン**

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

**タカラバイオ株式会社**