

製品コード R060A

研究用

---

**Takara**

**Tks Gflex™ DNA  
Polymerase**

---

説明書

v201906Da

---

Tks Gflex DNA Polymerase は、*Thermococcus* 属古細菌由来の DNA polymerase をベースに、反応阻害の要因となる酵素の鋳型 DNA に対する非特異的結合を抑制した改良型 PCR 酵素であり、 $\alpha$  型特有の高い正確性に加えて優れた伸長性を有しています。さらに、タカラバイオ独自の強力な伸長因子と新規開発したプライミング特異性の向上物質（特許出願中）を反応系に加えたことにより、幅広い核酸濃度のサンプルに対して、高速で極めて特異的な増幅を実現しました。その結果、一般的な PCR 酵素では増幅が困難な GC rich、AT rich などの難増幅配列や長鎖のターゲットに対する PCR 増幅の成功率が著しく向上しています。また、反応バッファーに PCR 阻害物質を吸収する成分および増幅を増強する成分を加えたことにより、クールドサンプルからも高効率の PCR が可能です。

なお、本酵素は常温下での 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 PCR に対応しています。

## I. 内容 (50 $\mu$ l 反応、200 回)

Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 U/ $\mu$ l) *1	250 U (200 $\mu$ l)
2 $\times$ Gflex PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> , dNTP plus) *2	1 ml $\times$ 5

### \* 1 : 【酵素の形状】

50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.2 at 4°C)  
100 mM NaCl  
0.1 mM EDTA  
1 mM DTT  
0.1% Tween20  
0.1% NP-40  
50% Glycerol

### 【活性の定義】

活性化サケ精子 DNA を鋳型/プライマーとして用い、74°Cにおいて 30 分間に 10 nmol の全ヌクレオチドを酸不溶性沈殿物に取り込む活性を 1 U とする。

\* 2 : Mg<sup>2+</sup>濃度は 2 mM (2  $\times$ )、dNTP 濃度 (2  $\times$ ) は各 400  $\mu$ M です。

## II. 保存

− 20°C

### III. プロトコール

#### ● 反応液組成

試薬	使用量	最終濃度
2 × Gflex PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> , dNTP plus)	25 μl	1 × *1
primer 1	10 ~ 15 pmol	0.2 ~ 0.3 μM *2
primer 2	10 ~ 15 pmol	0.2 ~ 0.3 μM *2
Template	< 500 ng	
Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 U/μl)	1 μl	1.25 U/50 μl
滅菌精製水	up to 50 μl	

注： 酵素などの各試薬は、氷上に置いて使用してください。

\* 1： Mg<sup>2+</sup> 1 mM、dNTP 各 200 μM

\* 2： 10 kb 以上の長鎖を増幅する場合、final conc. 0.2 μM で反応を行ってください。

#### ● PCR 条件

##### 【3 step PCR】

94°C	1 min. *1	
↓		
98°C	10 sec.	} 30 cycles
55 or 60°C *2	15 sec.	
68°C *3	30 sec./kb *4	

または

##### 【2 step PCR】

94°C	1 min. *1	
↓		
98°C	10 sec.	} 30 cycles
68°C	30 sec./kb *4	

\* 1： 増幅領域が GC rich の場合や長鎖ターゲットの増幅を行う場合には、94°C 1分 で初期変性を行うことを推奨します。

\* 2： プライマーの Tm 値 (下記の式※で計算) が 55°C を超える場合はアニーリング温度を 60°C に、Tm 値が 55°C 以下の場合はアニーリング温度を 55°C に設定してください。

$$\text{※ Tm 値 (°C)} = [(A, T \text{ の数}) \times 2] + [(G, C \text{ の数}) \times 4] - 5$$

\* 3： 3 step PCR の場合も、伸長温度は 68°C に設定してください。

\* 4： クルードサンプルから増幅する場合は伸長時間を 1 min./kb に設定してください。

#### ◆ PCR 条件の選択

- ・ 増幅鎖長が 10 kb 以下の場合、まず 3 step PCR をお試しください。
- ・ GC rich 領域の増幅や 10 kb を超える長鎖の増幅には、2 step PCR を推奨します。
- ・ 増幅産物が得られない場合や、スミアや非特異的増幅が見られる場合は、6 ページの VII. トラブルシューティングをご確認ください。

## IV. 鋳型について

(1) 精製された DNA や cDNA の推奨鋳型量は次のとおりです。

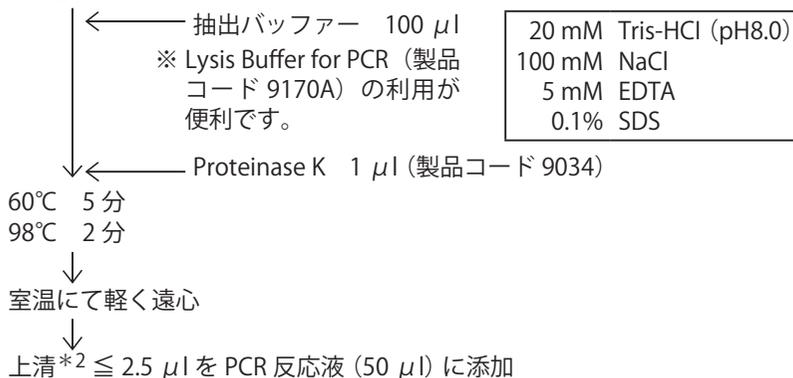
		(長鎖増幅の場合)
ヒトゲノム DNA	5 ~ 500 ng	(100 ~ 500 ng)
大腸菌ゲノム DNA	100 pg ~ 200 ng	(10 ~ 200 ng)
プラスミド DNA	10 pg ~ 10 ng	(1 ~ 10 ng)
cDNA	25 ~ 750 ng	(250 ~ 750 ng)

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) 生体試料などの抽出液を用いて PCR を行う場合は、以下の方法で抽出液を調製してください。

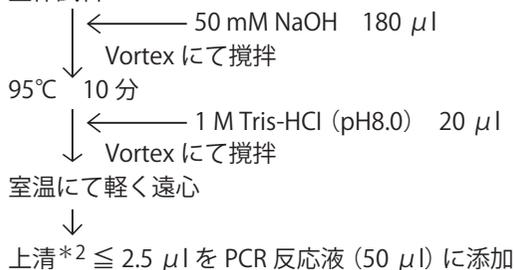
### 【Proteinase K 抽出法】

生体試料\*1



### 【アルカリ熱抽出法】

生体試料\*1



\*1：持ち込む試料の目安量

- ・マウス尾  $\leq$  2 mm
- ・マウス耳  $\leq$  5 mm<sup>2</sup>
- ・マウス臓器  $\leq$  30 mm<sup>3</sup>
- ・植物の葉  $\leq$  5mm<sup>2</sup>

\*2：保存する場合は、上清を別のチューブに移して -20°C 以下で保存してください。PCR に使用する前には室温に戻し、沈殿物がないことを確認してください。

---

## V. 至適パラメーターの設定

Tks Gflex DNA Polymerase の性能を最大限に引き出し、より良い 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) プライマー設計

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 など) を利用して、最適な配列を選択するようにしてください。

#### 【増幅鎖長が $\leq 10$ kb の場合】

基本的には 20 ~ 25 mer のプライマーでも良い結果が得られますが、 $T_m$  値 (III. プロトコール中の式で計算) が  $55^\circ\text{C}$  を超えるように、もしくはプライマー長が 25 mer 以上となるよう設計することで PCR の成功率がさらに向上します。

#### 【増幅鎖長が $> 10$ kb の場合】

$T_m$  値が  $65^\circ\text{C}$  以上で 25 ~ 35 mer のプライマーを設計することを推奨します。また、プライマーの 3' 端側の GC 含量が高くないように設計してください。

#### 【GC rich なターゲットの場合】

$T_m$  値が  $60^\circ\text{C}$  を超えるプライマーを推奨します。

なお、Tks Gflex DNA Polymerase 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。

### (2) dNTP と $\text{Mg}^{2+}$

2 × Gflex PCR Buffer には反応に最適量の  $\text{Mg}^{2+}$  と dNTP が含まれており、より簡便に反応液を調製することができます。

dNTP にはキレート作用があり、dNTP 濃度を高くすると実効  $\text{Mg}^{2+}$  濃度が下がります。また、Tks Gflex DNA Polymerase の場合、dTTP の代わりに dUTP を使用することはできません。

## VI. 増幅産物の電気泳動、クローニングについて

### (1) 増幅産物の電気泳動

Tks Gflex 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) 増幅産物の末端形状

Tks Gflex 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 Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/50/250) など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、Tks Gflex 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。

## VII. トラブルシューティング

現象	問題点	対策
増幅しない 増幅効率が悪い	プライマーの Tm 値	V-(1) を参考にプライマー設計する
	アニーリングの温度	2℃ ずつ下げてみる
	プライマーの濃度	0.3 μM (final conc.) で検討する
	伸長時間	1 min./kb に伸ばす
	サイクル数	35 ~ 40 サイクルに設定する
	鋳型の純度、量	適量の鋳型を使用する クルードサンプルの使用量を減らす DNA の精製度を上げる
エキストラバンドがでる スメアする	PCR 条件	3 step PCR の場合、2 step PCR を試す
	プライマーの Tm 値	V-(1) を参考にプライマー設計する
	アニーリングの温度	63℃ まで 2℃ ずつ上げてみる プライマーの Tm 値が 50℃ 以下の場合、50℃ ~ 55℃ で試す
	酵素量	標準使用量の半量まで減らす
	プライマー濃度	0.2 μM (final conc.) で行う
	サイクル数	25 ~ 30 サイクルに設定する
	鋳型の純度	DNA の精製度を上げる

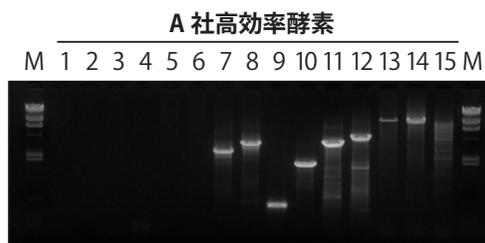
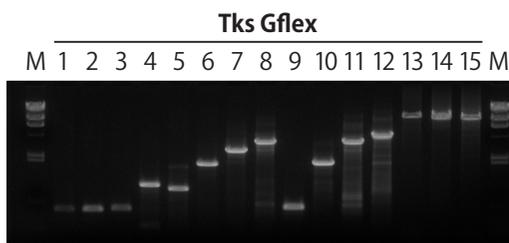
## VIII. Tks Gflex DNA Polymerase の特長と実施例

### A. 高い反応成功率

Tks Gflex DNA Polymerase は反応液中の酵素のプライミングの特異性を高める物質により、通常増幅が難しい AT rich や GC rich なターゲットに対しても高い成功率で PCR を行うことができます。特に 10 kb 程度までの鎖長のターゲットでは、20 ~ 25 bp 程度のプライマー、3 step PCR の一般的な条件で、簡単に特異性の高い PCR 増幅結果が得られます。また、GC 含量が高く増幅がより難しい配列や 10 kb を超える長鎖ターゲットには、2 step PCR の条件でさらに高い成功率が期待できます。

1) さまざまなサイズの GC 含量の異なるターゲットを推奨の 3 step PCR 条件で増幅しました。

2 step PCR では増幅が難しい 1 kb 未満のターゲットから従来 2 step PCR でないと特異的な増幅ができなかった GC rich や長鎖のターゲットに対しても、推奨の 3 step PCR 条件で特異的な増幅ができました。



Tks Gflex の PCR 条件:		
94°C	1 min.	
↓		
98°C	10 sec.	} 30 cycles
60°C	15 sec.	
68°C	30 sec./kb	

A 社推奨 2 step PCR 条件

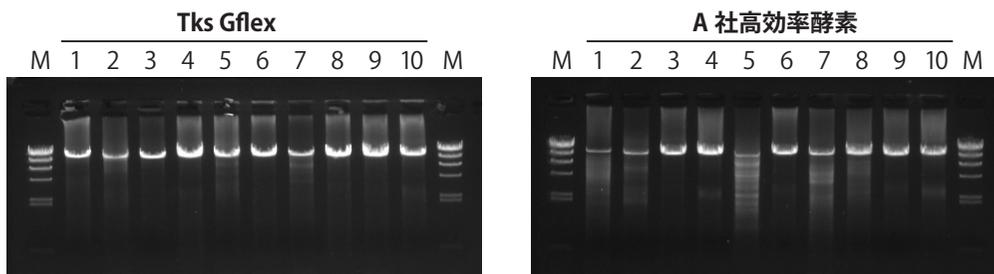
鋳型：ヒトゲノム DNA  
*T. thermophilus* ゲノム DNA  
*B. subtilis* ゲノム DNA

100 ng/50 μl : レーン 1 ~ 3、5 ~ 8、13 ~ 15  
 10 ng/50 μl : レーン 9 ~ 12  
 100 ng/50 μl : レーン 4

レーン 1	: <i>GABRA3</i>	450 bp	GC (48.4%)
2	: <i>TINP1</i>	463 bp	GC (35.9%)
3	: <i>AMPD1</i>	480 bp	GC (44.8%)
4	: <i>AprE</i>	1,045 bp	GC (46.6%)
5	: A region of chromosome 22g11	965 bp	GC (35.4%)
6	: A region of chromosome 22g11	2,025 bp	GC (36.1%)
7	: A region of chromosome 22g11	3,035 bp	GC (37.6%)
8	: A region of chromosome 22g11	4,014 bp	GC (39.9%)
9	: A region of <i>T. th</i> genomic DNA	514 bp	GC (72.2%)
10	: A region of <i>T. th</i> genomic DNA	2,029 bp	GC (73.5%)
11	: A region of <i>T. th</i> genomic DNA	4,021 bp	GC (73.0%)
12	: A region of <i>T. th</i> genomic DNA	4,988 bp	GC (72.8%)
13	: <i>HBB</i>	12,098 bp	GC (39.9%)
14	: <i>IRS1</i>	10,448 bp	GC (50.4%)
15	: <i>TFRC71</i>	10,580 bp	GC (44.7%)
M	: λ- <i>Hind</i> III digest		

(弊社比較データ)

- 2) ヒトゲノム DNA を鋳型として、各種ターゲットの遺伝子領域をカバーする約 10 kb の領域を、各酵素の推奨条件で増幅してその増幅の成功率を比較しました。Tks Gflex DNA Polymerase では 10 種中すべてのターゲットで目的の増幅産物が得られ、他社酵素よりも特異性の高い良好な結果となりました。



鋳型：ヒトゲノム DNA 100 ng / 50  $\mu$ l 反応系

ターゲット：

レーン 1 : <i>HBB</i>	6 : <i>EGFR</i>
2 : <i>TGFB1</i>	7 : <i>FGFR</i>
3 : <i>TP53</i>	8 : <i>IRS1</i>
4 : <i>BCL2</i>	9 : <i>AMPD</i>
5 : <i>TFRC</i>	10 : <i>DMD</i>
	M : $\lambda$ - <i>Hind</i> III digest

反応液組成および PCR 条件：各酵素の推奨条件

Tks GflexのPCR条件：		
94°C	1 min.	
	↓	
98°C	10 sec.	} 30 cycles
68°C	5 min.	

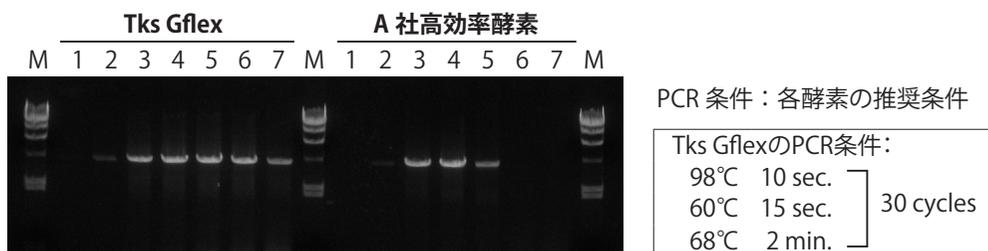
(弊社比較データ)

## B. 感度と鋳型許容量

校正活性を有する  $\alpha$  型の PCR 酵素は反応液中の核酸量に影響を受けやすく、cDNA を鋳型とする増幅などが比較的苦手です。しかし、Tks Gflex DNA Polymerase は酵素の改良と独自の伸長因子により鋳型量に対する許容範囲が広くなり、cDNA を鋳型とする反応も効率よく行うことができます。

さまざまな量の HL60 細胞由来 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 を各酵素の推奨条件で増幅し、感度および鋳型量に対する許容性を比較しました。

Tks Gflex DNA Polymerase では、鋳型 cDNA の非常に広い濃度範囲で良好な増幅が見られ、感度、鋳型量許容性とも優れていることがわかりました。



鋳型：HL60 total RNA 由来 cDNA (total RNA 相当量) / 50  $\mu$ l 反応系

レーン

1 : 2.5 ng	5 : 750 ng
2 : 25 ng	6 : 1 $\mu$ g
3 : 250 ng	7 : 1.5 $\mu$ g
4 : 500 ng	M : $\lambda$ - <i>Hind</i> III digest

ターゲット：Human *TFR* 4 kb

(弊社比較データ)

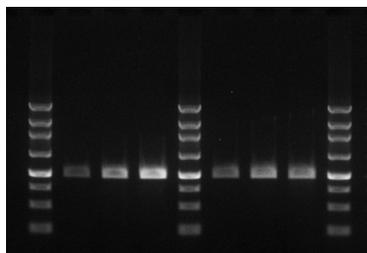


2) トマト葉からの DNA 抽出および PCR 増幅

直径 2 mm のパンチでカットしたトマト葉から IV- (2) に記載のアルカリ熱抽出法と Proteinase K 抽出法にしたがって DNA を抽出しました。遠心後の上清の一部を 25  $\mu$ l PCR 反応系に添加して、クールドサンプルに推奨する 1 min./kb の伸長時間設定でトマト *cox1* 遺伝子の PCR 増幅 (約 1 kb) を行い、良好な増幅を確認しました。

アルカリ熱抽出液 ProK 抽出液

M 1 2 3 M 1 2 3 M



ターゲット : *cox1*  
増幅サイズ : 1,018 bp

鋳型量 (抽出液量 / 25  $\mu$ l 反応液)

レーン 1 : 0.4  $\mu$ l

2 : 1.0  $\mu$ l

3 : 2.5  $\mu$ l / 25  $\mu$ l

M : 250 bp DNA Ladder

PCR条件:

94 $^{\circ}$ C 1 min.

↓

98 $^{\circ}$ C 10 sec.

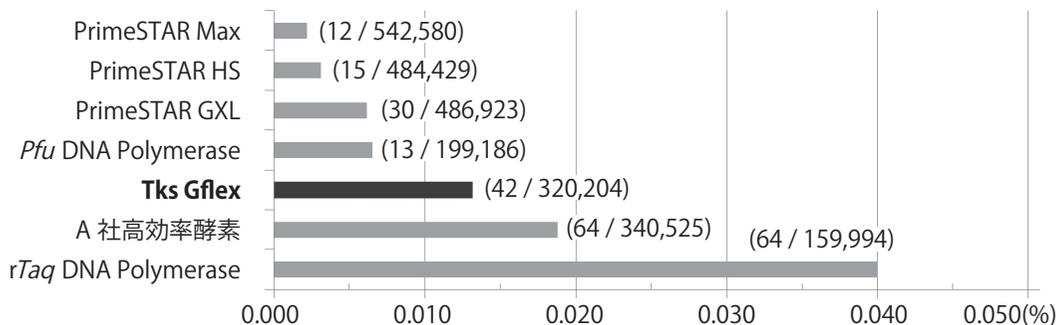
60 $^{\circ}$ C 15 sec.

68 $^{\circ}$ C 1 min.

30 cycles

### E. 正確性

GC rich で変異が入りやすい *Thermus thermophilus* HB8 ゲノム DNA を鋳型として、任意に選択した 10 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シーケンシングにより塩基配列を確認しました。解析した総塩基数に対するエラー塩基数から mutant frequency を求めたところ、Tks Gflex DNA Polymerase では、解析した総塩基数 320,204 に対しエラーは 42 塩基 (0.0131%) でした。



<i>rTaq</i> DNA Polymerase	0.0400% (64 / 159,994)
A 社高効率酵素	0.0188% (64 / 340,525)
<b>Tks Gflex</b>	0.0131% (42 / 320,204)
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	0.0065% (13 / 199,186)
PrimeSTAR GXL	0.0062% (30 / 486,923)
PrimeSTAR HS	0.0031% (15 / 484,429)
PrimeSTAR Max	0.0022% (12 / 542,580)

(弊社比較データ)

## IX. 関連製品

Tks Gflex™ DNA Polymerase Low DNA (製品コード R091A)  
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (製品コード R050A/B)  
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (製品コード R045A)  
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (製品コード R010A/B)  
PrimeSTAR® HS (Premix) (製品コード R040A)  
MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.2 (製品コード R071A/B)  
Lysis Buffer for PCR (製品コード 9170A)  
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)  
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Gradient* (製品コード TP600)  
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)  
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)

## X. 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。
- PrimeSTAR、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。Tks Gflex、MightyAmp 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**