

製品コード R091A

研究用

Takara

**Tks Gflex™ DNA
Polymerase Low DNA**

説明書

v201907Da

Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA は、タカラバイオ独自の精製技術および DNA 不活化技術により、試薬に含まれる宿主大腸菌由来の DNA や環境から混入した DNA など PCR での鋳型となりうる DNA を極限まで抑制した、プレミックスタイプの PCR 酵素です。PCR 増幅の成功率が極めて高い Tks Gflex DNA Polymerase をベースに改良を加えることにより、ごく微量の鋳型から、バックグラウンドのほとんどない特異的な高感度増幅が可能となりました。また、本製品は常温下での 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。増幅困難な環境からのメタゲノムの増幅、1 cell からの PCR、PCR バイアスのないライブラリー増幅など、難易度が高く高精度な解析が求められる PCR に最適です。

本製品は酵素、反応バッファーおよび dNTP を含む 2 × プレミックス溶液をチューブに分注後、ふたを開けることなく溶液内に残存する微量の混入 DNA を不活化する処理を行っています。チューブの開閉や PCR 反応液の調製は、クリーンな環境で実施することをお勧めします。

I. 内容 (100 回分、20 μl 反応系)

Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA (2 ×) *	200 μl × 5
dH ₂ O for Low DNA	200 μl × 5

* : Mg²⁺濃度は 2 mM (2 ×)、dNTP 濃度 (2 ×) は各 400 μM です。
薄いピンク色を呈していますが、品質に影響はありません。

II. 保存

− 20°C

III. プロトコール

- 一般的な PCR 反応液組成 (total 20 μ l)
酵素などの各試薬は、氷上に置いて使用してください。

試薬	使用量	最終濃度
Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA (2 \times)	10 μ l	1 \times *1
Template	< 200 ng	
Primer 1	4 ~ 6 pmol	0.2 ~ 0.3 μ M *2
Primer 2	4 ~ 6 pmol	0.2 ~ 0.3 μ M *2
dH ₂ O for Low DNA	up to 20 μ l	

* 1 : Mg²⁺ 1 mM、dNTP 各 200 μ M

* 2 : 10 kb 以上の長鎖を増幅する場合、最終濃度 0.2 μ M で反応を行ってください。
縮重プライマーを使用する場合は、最終濃度 0.6 μ M 以上で反応を行ってください。

- PCR 条件

3 step PCR を推奨します。

94°C	1 min.*1	} 30 ~ 35 cycles*3
↓		
98°C	10 sec.	
55 ~ 60°C *2	15 sec.	
68°C	60 sec./kb	

- * 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 : 極めて特異性の高いバッファー系を採用しているため、アニーリング温度を 60°C より高く設定すると反応不良となる可能性があります。標準的な反応条件で特異的な増幅が可能です。
- * 3 : 少量のテンプレートをを用いて反応する場合はサイクル数を増やしてください。

増幅産物が得られない場合や、スメ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

精製された DNA や cDNA の推奨鋳型量は次のとおりです。

ヒトゲノム DNA	1 copy (約 4 pg) ~ 200 ng
大腸菌ゲノム DNA	1 copy (約 5 fg) ~ 100 ng
プラスミド DNA *	1 copy ~ 10 ng
cDNA	逆転写反応時の total RNA 10 pg ~ 300 ng 相当

- * : 少量のプラスミド (1 copy) から増幅を行う場合は、プラスミドを直鎖状にしたものを鋳型に使用してください。
バイサルファイト処理した DNA などウラシルを含む鋳型は使用できません。

V. 至適パラメーターの設定

Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA 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

本酵素は偏った GC 含量や配列のプライマーにおいても高い成功率を示しますが、フォワードプライマーとリバースプライマーの Tm 値 (Tm 値は下記の Tm 近似計算式*で計算) は同程度になるように設計してください。可能な場合はプライマー設計ソフトを利用して、最適な配列を選択するようにしてください。

* : Tm 値 = [(G、C の数) × 4] + [(A、T の数) × 2] + 35 - 2 × (総塩基数)

【増幅鎖長が ≤ 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、Tm 値 (上記計算式で計算) が 55°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】

Tm 値が 65°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 含量が高くなるように設計してください。

【GC rich なターゲットの場合】

Tm 値が 60°C を超えるプライマーを推奨します。

なお、Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA 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。

【In-Fusion® プライマーの場合】

増幅産物のクローニングに In-Fusion 法を利用する場合は、In-Fusion プライマーを設計して増幅を行ってください。使用するベクターの 5' 末端配列に相補的な 15 塩基をプライマーの 5' 末端に付加し、プライマーの 3' 側にはターゲット DNA 増幅のための特異的な配列を設計します。ターゲット増幅のための特異的な配列部分の Tm 値 (上記計算式で計算) が 55°C を超えるように設計することで PCR の成功率が向上します。

In-Fusion プライマーについては、タカラバイオウェブカタログの In-Fusion HD Cloning Kit のページをご参照ください。

http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.asp?unitid=U100006645

(2) dNTP と Mg²⁺

Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA には反応に最適量の Mg²⁺ 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。

VI. 増幅産物の電気泳動、クローニング、シーケンスについて

(1) 増幅産物の電気泳動

Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA 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 Low DNA 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 TA クローニングすることはできません。任意のベクターの任意の位置にディレクショナルに挿入できる In-Fusion クローニングをお勧めします (In-Fusion プライマーについては 4 ページを参照)。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も可能です。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 Low DNA 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。

(4) ダイレクトシーケンスを行う場合

Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA が 3' → 5' exonuclease 活性を有するため、増幅産物のダイレクトシーケンスを行う場合は、フェノール/クロロホルム処理、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up などタンパク質除去操作を行うことをお勧めします。

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.) 以上の濃度で検討する
	伸長時間	延長する
	サイクル数	増やす
	鋳型の純度、量	適量の鋳型を使用する 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	Primer 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℃ずつ上げてみる
		2℃ずつ下げてみる
	プライマー濃度	0.2 μM (final conc.) で検討する
	サイクル数	減らす
鋳型の純度	DNA の精製度を上げる	
鋳型なしで増幅する	Primer への汚染*	オリゴを再合成する
		HPLC 精製を行う
	作業環境	クリーンな環境で操作する

*：合成 Primer に環境由来 DNA が混入している可能性があります。

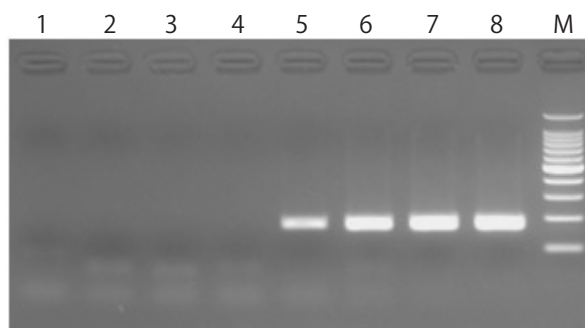
VIII. Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA の特長と実施例

A. 大腸菌ゲノムコンタミネーションの検定

宿主大腸菌由来の DNA や環境由来の DNA による PCR 酵素へのコンタミネーションは、偽陽性や、No template control での増幅などを引き起こすことがあります。Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA は 2 × プレミックスおよび dH₂O をタカラバイオ独自の DNA 不活化技術を用いて処理することで、PCR の鋳型となりうる混入 DNA を極限まで抑制しています。

本製品と環境微生物 16S rDNA の不変領域に設計された primer を用いて 40 cycle の PCR 反応を行いました。(増幅鎖長 173 bp)

鋳型 DNA を添加しないサンプルにおいて増幅は確認されず、大腸菌ゲノム DNA 1 cell 相当分 (約 5 fg) 以上のテンプレートを用いた反応において良好な増幅を確認することができました。本製品を用いることで、しばしば PCR での解析を混乱させる要因となる混入 DNA 由来の増幅を抑制し、目的のサンプル由来の増幅のみを正確に検出することが可能です。



レーン 1 ~ 4 : No template

5 : 大腸菌ゲノム 1 cell 相当分

6 : 大腸菌ゲノム 10 cell 相当分

7 : 大腸菌ゲノム 100 cell 相当分

8 : 大腸菌ゲノム 1,000 cell 相当分

M : 100 bp DNA Ladder

PCR 条件 :

98°C 10 sec.

55°C 15 sec.

68°C 10 sec.

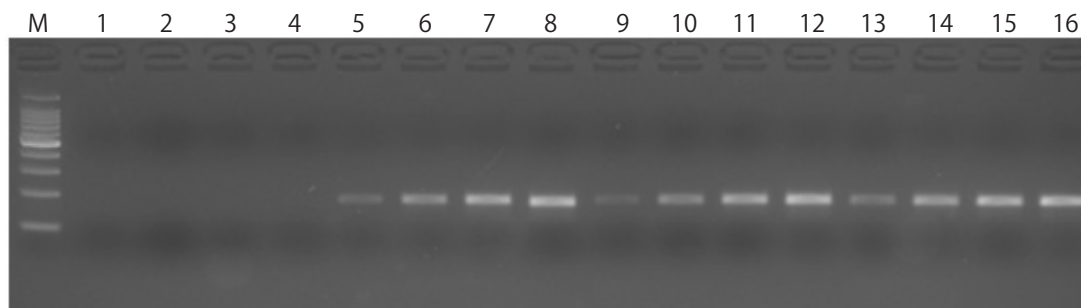
40 cycles

B. 高感度検出

Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA は反応バッファーにタカラバイオ独自の感度向上成分を加えたことにより、ごく微量の鋳型からでも高感度に増幅することが可能です。

18S rDNA の不変領域に設計された primer を用いて 40 cycle の PCR 反応を行いました。(増幅鎖長 179 bp)

鋳型としてヒト、マウス、サケの各ゲノム DNA 1 cell 相当分を添加した場合においてもそれぞれ良好な増幅結果が得られ、一般的な PCR 酵素では増幅困難な場合が多い 1 cell PCR にも対応可能であることが確認できました。



レーン 1～4: No template

5: ヒトゲノム DNA	1 cell 相当分
6: ヒトゲノム DNA	10 cell 相当分
7: ヒトゲノム DNA	100 cell 相当分
8: ヒトゲノム DNA	1,000 cell 相当分
9: マウスゲノム DNA	1 cell 相当分
10: マウスゲノム DNA	10 cell 相当分
11: マウスゲノム DNA	100 cell 相当分
12: マウスゲノム DNA	1,000 cell 相当分
13: サケゲノム DNA	1 cell 相当分
14: サケゲノム DNA	10 cell 相当分
15: サケゲノム DNA	100 cell 相当分
16: サケゲノム DNA	1,000 cell 相当分
M: 100 bp DNA Ladder	

PCR 条件:

98°C	10 sec.	} 40 cycles
55°C	15 sec.	
68°C	10 sec.	

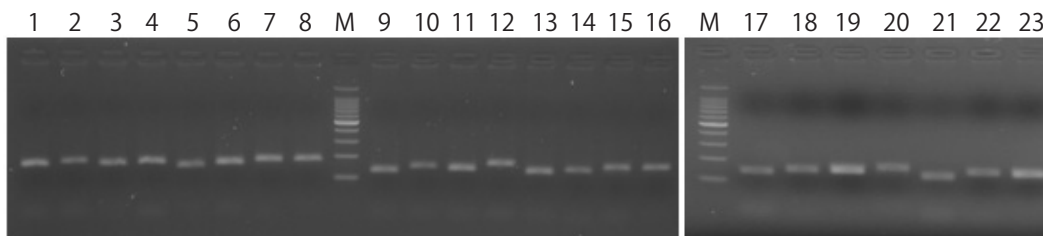
C. 高い反応成功率

Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA は、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。さらに、特異性を重視したバッファー系の採用により、さまざまなターゲットに対して一定の PCR 条件で対応することが可能です。

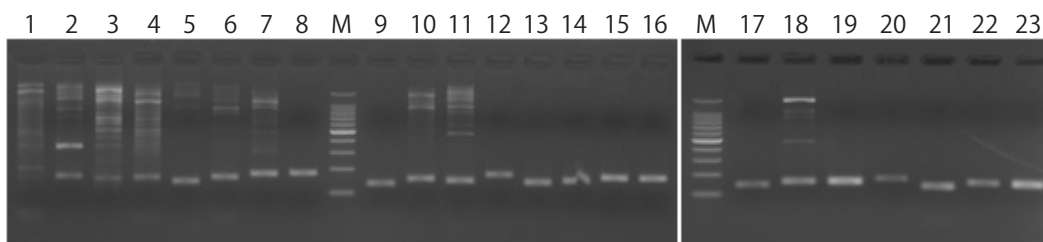
GC 含量の異なる 23 種のターゲットを推奨の 3 step PCR 条件で増幅しました。

Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA ではすべてのターゲットで特異的な増幅産物が得られ、他社酵素よりも特異性の高い良好な結果となりました。

【Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA】



【K 社 高効率酵素】



【L 社 Low DNA 酵素】



鋳型：ヒトゲノム DNA 2 ng/20 μ l 反応系

PCR 条件：各酵素の推奨条件

Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA の PCR 条件：

98°C	10 sec.	}	30 cycles
55°C	15 sec.		
68°C	10 sec.		

レーン	GC 含量	鎖長	レーン	GC 含量	鎖長	レーン	GC 含量	鎖長
1:	81.3%	144 bp	9:	61.8%	131 bp	17:	38.4%	146 bp
2:	77.7%	157 bp	10:	57.6%	151 bp	18:	39.4%	160 bp
3:	80.6%	144 bp	11:	63.7%	143 bp	19:	38.1%	160 bp
4:	69.5%	154 bp	12:	52.9%	170 bp	20:	33.0%	176 bp
5:	70.1%	137 bp	13:	50.0%	138 bp	21:	29.8%	141 bp
6:	70.3%	155 bp	14:	50.0%	146 bp	22:	32.1%	162 bp
7:	65.9%	170 bp	15:	47.0%	164 bp	23:	29.4%	160 bp
8:	58.2%	177 bp	16:	40.0%	165 bp	M:		100 bp DNA Ladder

IX. 関連製品

TaKaRa Taq[™] HS Low DNA (製品コード R090A)
Tks Gflex[™] DNA Polymerase (製品コード R060A/B)
PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase (製品コード R050A/B)
PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)
PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (製品コード R010A/B)
PrimeSTAR[®] HS (Premix) (製品コード R040A)
MightyAmp[™] DNA Polymerase Ver.3 (製品コード R076A/B)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[®] *Touch* (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient (製品コード TP600)
In-Fusion[®] HD Cloning Kit (製品コード 639648 ほか)
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、In-Fusion は Takara Bio USA, Inc. の登録商標です。Tks Gflex、*TaKaRa Taq*、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