# タカラバイオ

# Tks Gflex™ DNA Polymeraseアプリケーションガイド

(2017年1月版)

# 一目次一

Tks Gflex™ DNA Polymerase 製品情報と技術情報 p.2
 増幅困難要素が複数存在する条件下でのPCR p.3

GCリッチ・ATリッチターゲット × 長鎖・短鎖増幅 クルードサンプル × マルチプレックスPCR クルードサンプル × 長鎖・短鎖増幅

**3.** クルードサンプルからのPCR実施例 p.4 - 6

**4. ユーザー様実施例** p.7

マウステール抽出液からの増幅 イネ0s12g37570遺伝子のクローニング マウスES細胞由来クルードサンプルからのPCR

**5. 使用文献情報** p.8

**6. 関連製品情報** p.8



## こんな時はTks Gflex™の出番です。

- ☑ クローニング等の正確性を求められる場面だが、GCリッチ・ATリッチや長鎖合成など難増幅条件があり 高正確性PCR酵素で増幅できない、または非特異増幅が多くターゲットの増幅量が不十分。
- ☑ 阻害物質耐性酵素を使用したが完全長の増幅産物が得られない、または非特異増幅が多い。

製 品 名	増幅効率	正確性	特異性	クルード耐性	増幅鎖長 (ヒトゲノム)	PCR産物 末端形状
Tks Gflex™ DNA Polymerase	****	***	****	***	~30 kb	平滑末端
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase	***	****	***	*	~6 kb	平滑末端
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase	****	***	****	***	~30 kb	平滑末端
MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3	****	*	***	****	~ 2 kb	A突出

## Tks Gflex™ DNA Polymerase 製品情報と技術情報

### ■ 製品情報

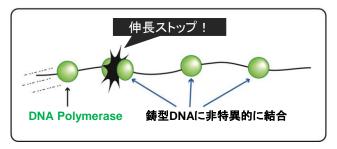
製 品 名	容 量	製品コード	価格(税別)
The Cflex IM DNA Delumerees	250 U (50 µl 反応系×200回)	R060A	¥36,000
Tks Gflex™ DNA Polymerase	1,000 U (50 µl 反応系×800回)	R060B(A×4)	¥115,000

### ■ 技術情報

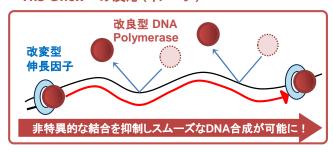
### 改良α型ポリメラーゼの採用、改変型伸長因子の添加により反応性が向上

α型ポリメラーゼに改良を加えることで、鋳型DNAに対する酵素自身の非特異的かつ過剰な結合を抑制しました。 さらに改変型伸長因子を添加することにより、スムーズで連続的なDNA合成が可能となり、高い反応性を実現しています。 伸長性が増し、十分な長さの増幅産物が安定的に得られます(図1)。

#### 従来のα型酵素の反応(イメージ)



#### Tks Gflex™の反応(イメージ)



### 独自のバックグラウンド低下因子の添加により反応特異性が大幅アップ(図2)

特異的なプライミングを向上させる「バックグラウンド低下因子」により、非特異的増幅が大幅に軽減しました。

#### 高い伸長性を実現 反応特異性が大幅アップ 伸長因子 M 1 なし [32P]ラベルしたプライマーを鋳型と 1: バックグラウンド低下因子なし kb アニールし、70℃でプライマー伸長 2: バックグラウンド低下因子あり 活性を測定。 M: 1 kb DNA Ladder 8.5 改変型伸長因子の有無で、伸長活 3.7 性を比較した。 **ターゲット**: TGFβ1 2.2 比較結果 **増幅サイズ**: 987 bp 改変型伸長因子の添加で 標準的なPCR条件で比較した。 1.4 増幅産物のほとんどが 長鎖側にシフト 0.7 ▶ 長鎖合成性能がUP 図1. 改変型伸長因子の効果 図2. バックグラウンド低下因子の効果

## 増幅困難要素が複数存在する条件下でのPCR

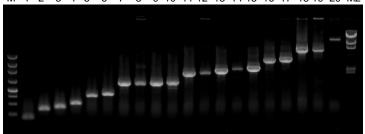
## ■ 様々な鎖長・GC含量のターゲットを増幅

長鎖・短鎖

GCリッチ・ATリッチ

ヒト心臓由来のtotal RNAから得られたcDNAを鋳型として、鎖長やGC含量の異なる20種類のORF全長(下表)のPCRを行いました。 20種類すべてのターゲットORFを標準条件で増幅できました。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M2



M: 250 bp DNA Ladder M2: λ-Hind III digest

※アニーリング温度の設定方法は Tks Gflex DNA Polymerase O 取扱説明書をご参照ください。

PCR条件			
94°C		1 min	
$\downarrow$			
98°C		10 sec	
55°C or	60°C	15 sec	35 cycles
68°C	30	sec/kb _	

#### ● ターゲット遺伝子一覧

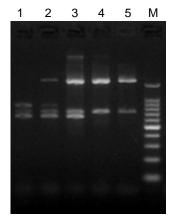
レーン No.	遺伝子 名	鎖長 (bp)	GC (%)	レーン No.	遺伝子 名	鎖長 (bp)	GC (%)
1	PLN	159	39.6	11	KCNQ1	2,031	64.2
2	NKX2-5	339	68.4	12	DTNA	2,232	49.5
3	FABP3	402	50.0	13	JUP	2,238	62.2
4	MYL2	501	50.4	14	CEP85L	2,418	42.0
5	CMA1	744	52.2	15	PKP2	2,514	53.3
6	CITED2	813	63.8	16	KCNH2	3,480	65.9
7	GATA4	1,329	68.8	17	JAG1	3,657	54.0
8	MEF2C	1,392	49.4	18	МҮН6	5,820	57.6
9	CD36	1,419	39.5	19	SCN5A	6,048	57.3
10	ADRB1	1,434	71.8	20	RYR2	14,904	46.2

### ■ 米抽出液からの増幅

クルードサンプル

マルチプレックス

#### 米品種判別のためのマルチプレックスPCR



鋳型量;1 µl/20 µl 反応液

1: コシヒカリ 2: ひとめぼれ

3: ヒノヒカリ 4: あきたこまち

5: キヌヒカリ

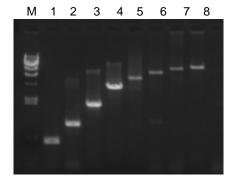
M: 100 bp DNA Ladder

#### PCR条件 94°C 1 min 98°C 10 sec 60°C 15 sec 30 cycles 68°C 1 min

## ■ ヒト培養細胞HeLa懸濁液からの増幅

クルードサンプル

長鎖・短鎖



サンプル: HeLa培養細胞懸濁液 (5 µl/50 µl反応系)

1: 0.5 kb 1 kb 3: 2 kb

4: 4 kb 5: 6 kb 8.5 kb 6: 12 kb 7:

8:

15 kb M: λ-Hind III digest

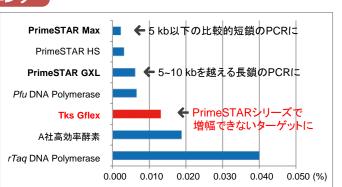


## コラム1. Tks Gflex™ DNA Polymeraseでクローニング

クローニングを行う際のPCRには、高正確性PCR酵素である PrimeSTARシリーズの使用がおススメです。しかし、ターゲット によってはPrimeSTARで増幅が上手くいかないことも・・・。 そんな時にはぜひ Tks Gflex DNA Polymerase をお試しくだ さい。長鎖・短鎖、GCリッチ・ATリッチといった増幅が難しいター ゲットに対しても特異的な増幅を成功させることができます。

#### 正確性の測定実験(右図)

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。



Tks Gflexは高正確性のα型ポリメラーゼをベースに改良を行ったた め、正確性を維持しながら、同時に高い反応効率を実現しています。

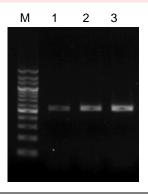
## クルードサンプルからのPCR実施例 — 動物組織 —

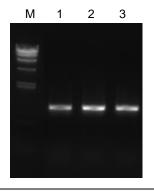
Tks Gflex™ならLysis Bufferで簡易抽出しただけのクルードサンプルからも、高感度かつ特異的な増幅が可能です。 ハイスループットな実験系にもおススメです。

(→ 7ページに相同組換えES細胞のハイスループットスクリーニング実施例を掲載しています; ユーザー様実施例 3)

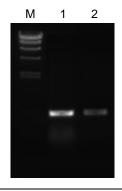
## ■ マウス組織由来抽出液からの増幅

### クルードサンプル





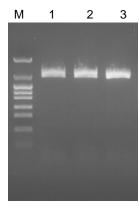


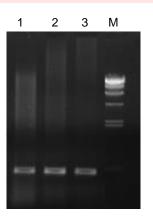


サンプル	マウス尾抽出液	マウス脳抽出液	マウス肺抽出液	マウス肝臓抽出液
ターゲット	Rever2 (1.1 kb)	Rever2 (1.1 kb)	Hbb-b1 (542 bp)	Hbb-b1 (542 bp)
鋳型量 (ライセート量 /50 µl反応液)	1 : 0.8 μl 2 : 2.0 μl 3 : 5.0 μl M : 200 bp DNA Ladder	1 : 2.5 μl 2 : 1.0 μl 3 : 0.4 μl M : λ- <i>Hin</i> d III digest	1: 2.0 μl 2: 0.4 μl M:λ- <i>Hin</i> d III digest	1: 2.0 μl 2: 0.4 μl M:λ- <i>Hin</i> d III digest
PCR条件	94°C 1 min   98°C 10 sec  60°C 15 sec  68°C 1 min  30 cycles	94°C 1 min   98°C 10 sec  60°C 15 sec  68°C 1 min  30 cycles	94°C 1 min  98°C 10 sec 60°C 15 sec 68°C 30 sec  30 cycles	94°C 1 min  98°C 10 sec 60°C 15 sec 68°C 30 sec  30 cycles

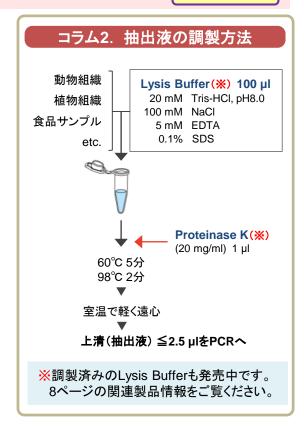
## ■ その他動物組織由来抽出液からの増幅

クルードサンプル





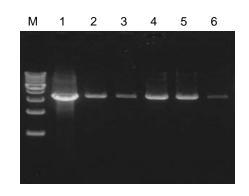
サンプル	ショウジョウバエ翅抽出液	ゼブラフィッシュ尾抽出液
ターゲット	Hsf (1,959 bp)	<i>ba1</i> (466 bp)
鋳型量 (ライセート量 /50 µl反応液)	1: 0.8 µl 2: 2.0 µl 3: 5.0 µl M: pHY Marker	1: 2.5 μl 2: 1.0 μl 3: 0.4 μl M: λ- <i>Hin</i> d III digest
PCR条件	94°C 1 min  ↓  98°C 10 sec 60°C 15 sec 68°C 2 min  35 cycles	94°C 1 min ↓ 98°C 10 sec 60°C 15 sec 68°C 30 sec 30 cycles

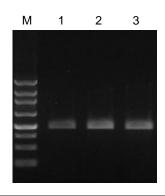


## クルードサンプルからのPCR実施例 — 植物組織 —

## ■ 植物組織由来抽出液からの増幅

クルードサンプル

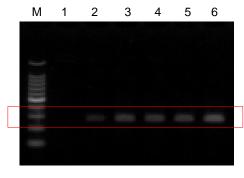


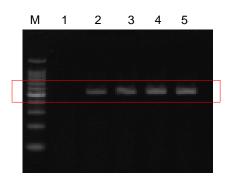


サンプル	温州みかん各部抽出液		トマト葉抽出液	
ターゲット	<i>Psy1</i> (約3.5 kb)		cox1 (1 kb)	
鋳型量 (ライセート量 /25 µl反応液)	1: 葉からの精製DNA 2: 葉(φ2 mm)ライセート 3: 果皮(φ2 mm)ライセート 4: 枝(1.2 mm)ライセート	5:果実(φ2 mm)ライセート 6:うす皮(φ2 mm)ライセート M:1 kb DNA Ladder 各1.25 μl使用	1 : 0.4 µl 2 : 1.0 µl 3 : 2.5 µl M : 250 bp DNA Ladder	
PCR条件	94°C 1 min  98°C 10 sec 60°C 15 sec 68°C 1 min/kb  30 cycles		94°C 1 min  98°C 10 sec 60°C 15 sec 68°C 1 min  30 cycles	

## ■ 植物組織由来抽出液からの増幅:GMO遺伝子の検出

クルードサンプル





サンプル	トウモロコシ抽出液		大豆抽出液			
ターゲット	m-epsps (除草剤i	m-epsps (除草剤耐性遺伝子)		EPSPS (除草剤耐性遺伝子)		
鋳型量	1.25 μl∕25 μl反応	ぶ液	1.25 µl∕25 µl万	<b>支応液</b>		
GMO作物 混入率	1: 0 % 2: 0.25 % 3: 0.50 % 4: 0.75 %	5 : 1 % 6 : 4 % M : 100 bp DNA Ladder	1 : 0 % 2 : 0.25 % 3 : 0.50 %	4: 0.75 % 5: 1 % M: 100 bp DNA Ladder		
PCR条件	94°C 1 min ↓ 98°C 10 sec 60°C 15 sec 68°C 1 min	cycles	94°C 1 min ↓ 98°C 10 sec 60°C 15 sec 68°C 1 min	30 cycles		

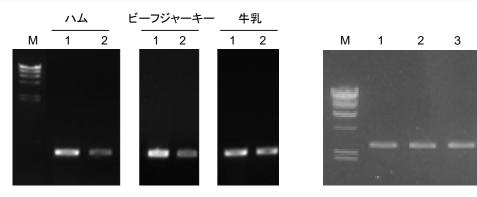
## 米抽出液 からの マルチプレックスPCR の実施例を3ページに掲載しています。

## クルードサンプルからのPCR実施例 — その他 —

Tks Gflex™なら、強力なPCR阻害物質を含む食品サンプルも、Lvsis Bufferで調製した簡易抽出液から増幅が可能です。

### ■ 様々なクルードサンプルからの増幅

クルードサンプル



サンプル	食品抽出液 酵母懸濁液(Saccharomyces cerevis		
ターゲット	ミトコンドリアDNA (478 bp)	RAT1 (2,901 bp)	
鋳型量 (ライセート量 /50 pl反応液)	1 : 2.0 μl 2 : 0.4 μl M : λ- <i>Hin</i> d III digest	1~3: 50 μl反応系をN=3で作成、コロニーPCRを実施した M:λ- <i>Hin</i> d III digest	
PCR条件	94°C 1 min  \$\square\$ 98°C 10 sec   60°C 15 sec   68°C 30 sec    30 cycles	94°C 1 min  98°C 10 sec 60°C 15 sec 68°C 1 min/kb  30 cycles	

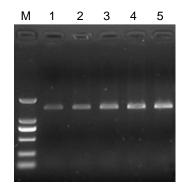
## コラム3. Tks Gflex™ DNA PolymeraseでNGSライブラリーを調製

#### 増幅バイアスのないライブラリー調製が可能

一般的にNGSライブラリー用フラグメント作製の ためのPCRでは、バイアスを低減しキメラ体の 生成を防ぐため、サイクル数を減らすことが推奨 されています。

土壌中の細菌から抽出したDNAを鋳型として、 Tks Gflexを用いてPCRを行った結果、15サイク ルという少ないサイクル数でも十分な増幅産物 が得られました。

サイクル数の少ないPCRにより、増幅バイアス を低減可能です。



土壌中細菌由来の精製DNA サンプル :

増幅鎖長 : 1,492 bp

鋳型量 1: 25 ng 4: 100 ng 2: 50 ng 5: 125 ng (DNA量/

25 µl反応系) 3: 75 ng

M: DL2,000 DNA Marker

94°C 2 min PCR条件:

94°C 30 sec

55°C 30 sec

15 cycles

72°C 90 sec J

72°C 5 min

大腸菌ゲノムライブラリーを各種PCR酵素で増幅後、GA IIx(イルミナ社)にてシーケンス解析を実施しました。PCR増幅を行わな いライブラリーと比較したところ、Tks GflexはGC含量にかかわらず最も均一な増幅を示しました。



X軸: GC%

Y軸:normarized depth (PCR free)

対象生物: E. coli

★イルミナ社MiSeq向け16S rRNA細菌叢解析用PCR増幅キット(製品コード R161A)にもTks Gflexを使用しています。 (→8ページ関連製品)

### HeLa細胞懸濁液 からのPCR実施例を4ページに掲載しています。

## Tks Gflex™ DNA Polymeraseユーザー様実施例

## ■ ユーザー様実施例 -1. マウステール粗抽出液からの遺伝子増幅

M 1 2 M

1: A社高反応性PCR酵素 2: Tks Gflex DNA Polymerase

M: λ/Sty Iマーカー

サンプル : マウステール粗抽出液

ターゲット : 非公開 増幅サイズ : 約2 kb GC含量 : GCリッチ

PCR条件 : 98℃ 10 sec

60°C 15 sec 30 cycles 68°C 50 sec

#### データご提供:

東京大学医科学研究所 炎症免疫学分野 佐藤 慎太郎先生

現在のご所属は、大阪大学微生物病研究所・BIKEN 次世代ワクチン協働研究所・粘膜ワクチンプロジェクト です。ご所属を変わられた後もTks Gflexをご愛用い ただいております。

## クルードサンプル

GCリッチ・ATリッチ

#### 実験結果・ご感想

普段はA社高反応性酵素を使用しているが、今回のターゲットはGC含量が多くうまく増幅しなかった。

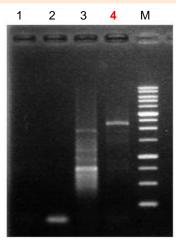
Tks Gflexを試したところ、良好に増幅した。

#### **▼** Point! **▼**

今回の実施例では「クルードサンプル」 「GCリッチ」の二つの困難増幅要素が存在する条件下で、Tks Gflexのみが増幅に成功しました。

## ■ ユーザー様実施例 -2. イネOs12g37570遺伝子のクローニング

GCリッチ・ATリッチ



1: A社酵素 2: B社酵素 3: C社酵素

4: Tks Gflex DNA Polymerase

M: 他社 1Kb DNA Ladder

サンプル : イネ(日本晴)葉由来cDNA

ターゲット : Os12g37570 増幅サイズ : 2,277 bp

GC含量: 50.5%(局所的にGCが連続)

PCR条件 : 94℃ 1 min

98°C 10 sec 68°C 2.5 min 30 cycles

↓ 68°C 5 min

※各酵素の推奨反応組成にfinal 5%となるようDMSOを添加して反応させた。

#### データご提供:

神戸大学大学院農学研究科 細胞機能制御学研究室

松岡 大介先生、高岡 翔平先生、南森 隆司先生

#### 実験結果・ご感想

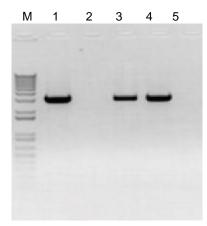
Os12g37570遺伝子のクローニングを行った際になかなか全長遺伝子がクローニングできず困っていたところ、 貴社のTks Gflex DNA polymeraseのおかげでクローニングができました。 ありがとうございます。

#### **▼** Point! **▼**

ターゲット全体のGC含量が高くない場合でも、局所的にGCリッチな配列を含んでいると、完全長の合成が難しい場合があります。

Tks Gflexは様々な増幅困難要素を持つターゲットに対して高い増幅効率が期待できます。

## ■ ユーザー様実施例 -3. マウスES細胞のクルードサンプルを使った相同組換えのスクリーニング法



M: 他社 wide range DNA Ladder 1~5: クローンA~E (他のクローン体の結果は割愛)

サンプル : マウスES細胞粗抽出液

ターゲット : 非公開 増幅サイズ : 3,053 bp GC含量 : 48%

PCR条件 : 94℃ 1 min

98°C 10 sec 60°C 15 sec

60°C 15 sec 30 cycles 68°C 180 sec

#### データご提供:

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞治療分野 水野 直彬先生、山口 智之先生

## クルードサンプル

ハイスループット

#### 実験結果・ご感想

103クローン中10クローンで相同組換 えES細胞株が得られたことをLysis BufferとTks Gflexを用いたクルード PCRで確認できた。

### ▼ Point! ▼

組換え株のPCRスクリーニングのようなハイスループットな実験系では、個々の反応条件を最適化することは非常に手間がかかり困難です。 Tks Gflex は同一の反応条件でPCR

Tks Gflex は同一の反応条件でPCF を行っても安定した結果が得られる、 「最適化不要」なPCR酵素です。

## 使用文献情報 · 関連製品情報

### ■ 使用文献情報

### □ PTB-Associated Splicing Factor (PSF) cDNAのクローニングに使用

Tsukahara T, Haniu H, and Matsuda Y.

PTB-Associated Splicing Factor (PSF) is a PPARγ-Binding Protein and Growth Regulator of Colon Cancer Cells. *PLoS One*. 2013; **8**: e58749.

#### □ TCRβ鎖の再構成解析の増幅に使用

Iguchi T, Aoki K, Ikawa T, Taoka M, Taya C, Yoshitani H, Toma-Hirano M, Koiwai O, Isobe T, Kawamoto H, Masai H, and Miyatake S.

BTB-ZF Protein Znf131 Regulates Cell Growth of Developing and Mature T Cells. *J Immunol.* 2015 Aug 1; **195**(3): 982-993.

#### □ 糞便からの精製DNAを用いて16S rRNA細菌叢解析のためのNGS用ライブラリーを調製する際に使用

Murakami S, Goto Y, Ito K, Hayasaka S, Kurihara S, Soga T, Tomita M, and Fukuda S.

The Consumption of Bicarbonate-Rich Mineral Water Improves Glycemic Control.

Evid Based Complement Alternat Med. 2015; 2015: 824395

# □ ショウジョウバエ腸からの精製DNAを用いて16S rRNA細菌叢解析のためのNGS用ライブラリーを調製する際に使用 Sekihara S, Shibata T, Hyakkendani M, and Kawabata SI.

RNA Interference Directed against the Transglutaminase Gene Triggers Dysbiosis of Gut Microbiota in *Drosophila*. *J Biol Chem*, 2016; **291**(48): 25077-25087

### □ 藻類の粗抽出液からPCRを行い、ゲノム編集株のスクリーニングに使用

Nomura T, Sakurai T, Osakabe Y, Osakabe K, and Sakakibara H.

Efficient and Heritable Targeted Mutagenesis in Mosses Using the CRISPR/Cas9 System.

Plant Cell Physiol. 2016; 57(12): 2600-2610. doi: 10.1093/pcp/pcw173

※弊社ウェブカタログのTks Gflex 製品ページで上記以外の使用文献もご紹介しています。
⇒http://catalog.takara-bio.co.jp/com/ref\_info.php?unitid=U100006994

取扱店

## ■ 関連製品情報

製 品 名	概 要	容量	製品コード	価格(税別)
Tks Gflex™ DNA Polymerase Low DNA	独自の精製技術とDNA不活化技術で、宿主大腸菌由来DNAや環境から混入したDNAなどPCR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。 増幅困難な環境からのメタゲノムの増幅、1 cellからのPCRなどに最適	100回 (20 µl反応系)	R091A	¥28,000
Lysis Buffer for PCR	マウス尾などの動物組織や植物組織、加工食品等から簡便にクルードライセートを調製する試薬。 Tks Gflex用鋳型ライセート調製に最適	20 ml	9170A	¥19,000
Proteinase K	高い活性を有するSerine protease	5 ml	9034	¥26,000
16S (V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS	糞便・環境サンプルからイルミナ社 MiSeqで16S rRNA細菌叢解析を行うためのPCR増幅キット。 V3-V4領域を対象とし、PCR酵素にTks Gflexを採用	50回	R161A	¥112,000

- ・本パンフレットで紹介した製品はすべて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。
- ・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。
- ・本パンフレットに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。
- ・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。
- ・本パンフレット記載の価格は2024年1月15日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2024年1月修正N

## タカラバイオ株式会社

東日本支店・西日本支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282 関西支店・営業第2部 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995 テクニカルサポートライン TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website https://www.takara-bio.co.jp

Facebook https://www.facebook.com/takarabio.jp