

**Taq DNA polymerase Economy (-dNTPs), with Enhancer for High GC template and Robust buffer**

02-013, 200 U (5 U/μl)

本製品は、*Thermus aquaticus* DNA polymerase (Taq DNA polymerase) 遺伝子を大腸菌で大量に発現させ、高度に精製したものである。天然の Taq DNA polymerase と同じく分子量 94 kDa で耐熱性 DNA ポリメラーゼ活性をもつ。本酵素を弊社独自の強力 (Robust)バッファーと GC Enhancer を組み合わせて使用することにより High GC template での PCR 反応を行うことができます。

- PCR 反応に適した酵素で多様なプライマーを用いての DNA の増幅が可能

用途

- ・ ハイスループット PCR
- ・ コロニーPCR
- ・ dUTP、dTTP、蛍光標識ヌクレオチドの取り込み
- ・ プライマーエクステンション
- ・ 平滑末端の 3'末端に A を 1 塩基付加 (TA ベクターへのクローニング可)

製品の性質

活性の定義：活性化サケ精子 DNA を鋳型/プライマーとして 74℃、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 unit とする。

純度：SDS-PAGE (CBB 染色) で 95%以上が Taq DNA polymerase タンパク質。

エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼのコンタミネーションが検出されないことを確認している。

PCR 検定：λ DNA を鋳型とした PCR 反応において良好な増幅がみられることを確認している (図 1)。

濃度：5 unit/μl

性状：20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% glycerol, 0.5% Tween20, 0.5% Igepal CA-630

保存：-20℃

添付：1. 10 x Robust buffer (Taq)

2. 5x GC Enhancer

(Robust buffer 使用上のご注意)

新しく添付しております 10 x Robust buffer Buffer (Taq)は Taq DNA polymerase の活性を最大限に引き出すように作成されておりますので伸長時間を長くとりすぎますと目的のプロダクト以外に上下にスミアーな泳動物が出現する場合があります。

次ページの実験例を参考に目的のプロダクトの大きさに合わせた伸長時間を設定してご使用ください。

(続く)

一般的なPCR反応液組成 (total 50μl)	
Taq DNA polymerase (5 unit/μl)	* 0.25 μl
10x Robust buffer (Taq)	5 μl
5x GC Enhancer	5~10μl
2.5mM (each) dNTPs	4μl
Template	<500 ng
Primer 1	0.2~1.0 μM (final conc.)
Primer 2	0.2~1.0 μM (final conc.)
滅菌蒸留水	
*過剰に使用すると反応の不具合を生じることがあります	

プロトコール：例

λ DNA増幅例 PCR条件

2kb, 4kb

94 ° C 1min  
95 ° C 5sec  
65 ° C 20sec } 25cycles

6kb

94 ° C 1min  
95 ° C 5sec  
65 ° C 1min } 25 cycles

8kb

94 ° C 1min  
95 ° C 5sec  
65 ° C 1min 20sec } 25 cycles

10kb, 12kb

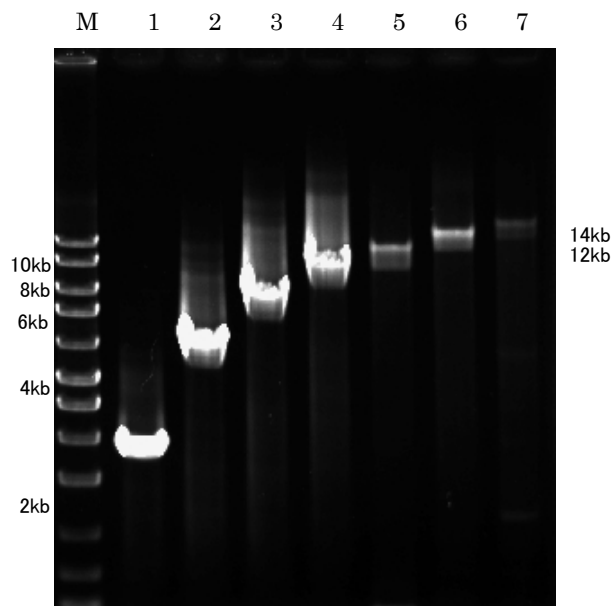
94 ° C 1min  
98 ° C 5sec  
68 ° C 3min  
72 ° C 3min } 30 cycles

14kb

94 ° C 1min  
98 ° C 5sec  
68 ° C 4min  
72 ° C 4min } 30 cycles

(図1)

M	marker
Lane	
1	2kb
2	4kb
3	6kb
4	8kb
5	10kb
6	12kb
7	14kb



実験例では2 step PCR を行っておりますが3 step PCR もだいたい同じ伸長時間を目安にしてください。

8 k b ぐらいまでの伸長時間は1 k b あたり約5 ~ 1 0 秒、8 k b 以上の伸長には1 k b あたり約1 5 秒を設定しています。

また目的のプロダクトの生成のない場合は少し伸長時間を伸ばして PCR を行ってください。

実験例に示したように新規 Buffer による酵素反応は非常に速いですので2 -step PCR を行うことをおすすめします。2 -step PCR を行なうことにより従来のP C Rより大幅に時間短縮して結果の確認ができます。

関連製品：# [02-001](#) Taq DNA Polymerase (+dNTPs) # [02-021](#) Pfu DNA Polymerase(+dNTPs)

(続く)

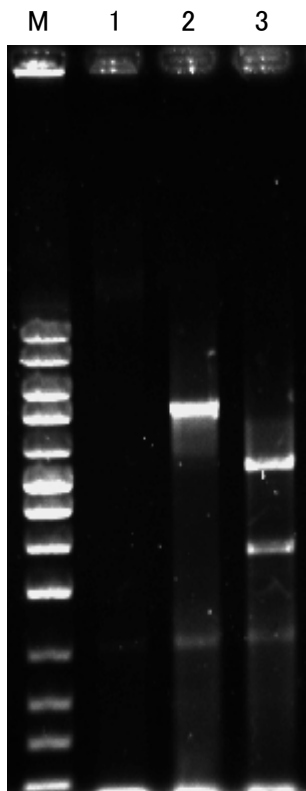
GC Enhancer を用いた P C R 例 (*Bordetella pertussis* (ToHAMA I) genomic DNA (GCcontent 67%) を用いた adenylate cyclaseA gene の増幅) (Fig.3)

PCR 条件

98 ° C 2min  
 98 ° C 5sec  
 68 ° C 1min } 14 cycles  
 98 ° C 5sec } \* decrease 0.5 ° C / cycle  
 68 ° C \* 1min } 16 cycles  
 72 ° C 3min

Fig.3 High GC template での GC Enhancer の有効性

(*Bordetella pertussis*; 67% GC) の the adenylate cyclase gene(6 kb) の増幅



M Marker

1 GC Enhancer 非添加

2 GC Enhancer 添加

3 PCR 産物(lane2)の NcoI 消化物

adenylate cyclase A 遺伝子には NcoI 消化部位が一箇所あり、その消化物である 2 本の断片はフィジカルマップから 予想されるものと一致した。

GC Enhancer は主に DNA のメルティングポイントを下げたり、酵素と DNA の相互作用を安定化させる化合物の混合物で構成されています。

5 x と表記されておりますがこれは効果を示す使用濃度の上限を示しており、まず 1 0 x で使用してみてください。効果が見られない場合 5 x まで濃度を増すことができます。それぞれの Template DNA に有効な濃度でご使用ください。