

高正確性・高速 PCR 酵素

Go-to DNA Polymerase

マニュアル（第 1 版）

Code No. 313-08661 (50 回用)

Code No. 319-08663 (200 回用)

I 製品説明

本品は、*Pyrococcus* sp.由来の α 型 DNA ポリメラーゼと改変型伸長エンハンサーを混合した PCR 酵素です。

ポリメラーゼ反応において誤って取り込まれたヌクレオチドを取り除くことができる 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性を有しているため正確性が高く、クローニングなどエラーを極力抑えて PCR を行いたい場合に最適です。さらに改変型伸長エンハンサーを添加することによって、 α 型 DNA ポリメラーゼの欠点である反応時間の長さや増幅効率の低さを改善しています。

本品は、高正確性を保持したまま優れた伸長性を兼ね備えた“信頼性の高い (Go-to)” PCR 酵素です。

<特長>

- 改変型伸長エンハンサーを添加しているため、伸長速度が速く、DNA 増幅効率が良い。
- 校正活性を有し、正確性が高い。
- PCR 産物は平滑末端である。

II 製品内容と保存温度

内容品	125 U (50 回用)	500 U (200 回用)	保存
Go-to DNA Polymerase (2.5 U/μl)	50 μl × 1 本	200 μl × 1 本	-20°C
10 × Go-to Buffer	1 ml × 1 本	1 ml × 1 本	-20°C
dNTPs Mixture (2.5 mM each)	800 μl × 1 本	800 μl × 1 本	-20°C

【包装単位】 50 μl の反応系で使用した場合の回数です。(1 回あたり 2.5 U 使用)

【活性定義】 1 unit は、activated calf thymus DNA をプライマー／鋳型として、74°C、30 分間に 10 nmol のデオキシヌクレオチドを酸不溶性沈殿物に取り込む酵素活性とする。

III 使用上の注意

- ・ 本品は、試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
- ・ 試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱わないで下さい。
- ・ 製品安全データシート (SDS) につきましては、ニッポンジーンのウェブページ (<http://www.nippongene.com/siyaku/list.html>) にてご覧になれます。

IV 使用例

ご使用になる PCR 機器やプライマー配列、鋳型 DNA などにより PCR 反応の至適条件は異なります。本プロトコールはあくまで参考データとしてご使用下さい。

PCR 反応

使用前に各試薬を氷上に置いて完全に融解し、十分に攪拌します。

使用時は、氷上で操作して下さい。

<PCR 反応液調整>

Go-to DNA Polymerase (2.5 U/μl)	1 μl	
10 × Go-to Buffer	5 μl	(終濃度 1 ×)
dNTPs Mixture (2.5 mM each)	4 μl	(終濃度 200 μM each)
Forward Primer (10 μM)	1 μl	(終濃度 0.2 μM)
Reverse Primer (10 μM)	1 μl	(終濃度 0.2 μM)
鋳型 DNA	< 200 ng ^{※1}	
ddWater	X μl	
Total	50 μl	

- ※1 鋳型 DNA の純度は PCR に大きな影響を及ぼします。
50 µl 反応系での推奨鋳型 DNA 量は以下の通りです。
- ・ラムダ DNA : 5 ng
 - ・プラスミド DNA : 5 ng
 - ・ゲノム DNA : 50 ng
 - ・cDNA : 50 ng (RNA 相当量)

<3 ステップ基本 PCR サイクル> ※2

Pre Denature	95°C	2 分間	× 1 サイクル
↓			
Denature	95°C	20 秒間	
Annealing	55°C	20 秒間	× 30-45 サイクル ※3
Extension	72°C	15 秒間/kb ※4	
↓			
Final Extension	72°C	3 分間	× 1 サイクル

- ※2 スメアやエキストラバンドが確認される場合は、以下の 2 ステップ PCR サイクルをお試し下さい。

[95°C 2 分間] × 1 サイクル
↓
[98°C 10 秒間、68°C 30 秒間/kb] × 30-45 サイクル

- ※3 サイクル数は、増幅量に応じて設定して下さい。
※4 増幅が困難な場合は、伸長時間を 30 秒間/kb でお試し下さい。

増幅産物のクローニング

Go-to DNA Polymerase での増幅産物の末端は平滑になっています。

<平滑末端クローニング>

あらかじめリン酸化したプライマーを使用するか、増幅産物をリン酸化した後に平滑末端のベクターにクローニングします。

<TA クローニング>

増幅産物の 3' 末端に dA を付加してから T ベクターにクローニングします。増幅産物を精製して本酵素を取り除いてから dA 付加反応を行って下さい。

<PCR 産物の制限酵素処理>

増幅産物を精製して本酵素を取り除いてから制限酵素処理を行います。本酵素の 3'→5' エクソヌクレアーゼ活性が残っていると、制限酵素処理中に突出末端が削られてしまうことがあります。

V トラブルシューティング

トラブル	検討する条件	検討内容
増幅産物が確認できない。または少ない。	サイクル条件	<ul style="list-style-type: none"> ・伸長時間を 30 秒間/kb に延ばす。 ・サイクル数を増やす。 ・アニーリング温度を下げる。 ・GC rich なターゲットの場合は、Pre Denature および Denature を 98°Cで行う。
	鋳型 DNA 量、純度	<ul style="list-style-type: none"> ・鋳型 DNA 量を増やしてみる、または減らしてみる。 ・鋳型 DNA を再調製する。再精製する。 ・鋳型 DNA 溶液中に含まれる RNA を除去する。
	プライマー量、デザイン	<ul style="list-style-type: none"> ・プライマー濃度を上げてみる(0.5 μM 程度)。 ・プライマー配列を再設計する。再調製する。
	DMSO の添加	<ul style="list-style-type: none"> ・GC rich をターゲットとする場合は、DMSO を～10% の割合で添加する。
スメアやエキストラバンドがみられる。	サイクル条件	<ul style="list-style-type: none"> ・3 ステップ PCR サイクルの場合は、アニーリング温度を上げる。 ・サイクル数を減らす。 ・2 ステップ PCR サイクルで行う。
	鋳型 DNA 量	<ul style="list-style-type: none"> ・鋳型 DNA 量を減らしてみる。
	プライマー量、デザイン	<ul style="list-style-type: none"> ・プライマー濃度を減らしてみる、または上げてみる。 ・プライマー配列を再設計する。再調製する。

VI 備考

本製品は、国立研究開発法人産業技術総合研究所よりライセンスを受けて製造、販売しています。

マニュアル記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。

お問い合わせ先
<p align="center">株式会社ニッポンジーン 研究試薬部 学術営業課</p> <p>TEL 076 - 451 - 6548 URL http://www.nippongene.com/siyaku/</p> <p>お問い合わせは、お電話もしくはWEB フォームより承っております。</p>