

Taq DNA ポリメラーゼ with Enhancer for high GC template and Robust Buffer (+dNTPs)

商品コード	02-003 200 U 02-003-5 200 Units x 5																
容量	200 U																
保存	-20°C																
濃度	5U/μl																
製品説明	本製品は、 <i>Thermus aquaticus</i> 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。																
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°C、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 2)。																
製品内容	Taq DNA polymerase (5U/μl): 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 50% glycerol, 0.5% Tween 20, 0.5% Igepal CA-630 (02-Taq 40μl) 10 x Robust Buffer (Taq): (02-Trb 1.0ml) 5 x GC Enhancer : (02-Enh 2.0ml) 2.5 mM (each) dNTPs (02-Dnt 640μl)																
用途	<p>■ 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</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ハイスループット PCR ・コロニーPCR ・dUTP、dITP、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 ベクターにクローニング可) <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px 0;"> <p>一般的なPCR反応液組成 (total 50μl)</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>Taq DNA polymerase (5 U/μl) (02-Taq)</td> <td style="text-align: right;">* 0.25 μl</td> </tr> <tr> <td>10x Robust Buffer (Taq) (02-Trb)</td> <td style="text-align: right;">5 μl</td> </tr> <tr> <td>5x GC Enhancer (02-Enh)</td> <td style="text-align: right;">10 μl</td> </tr> <tr> <td>2.5mM (each) dNTPs (02-Dnt)</td> <td style="text-align: right;">4 μl</td> </tr> <tr> <td>Template</td> <td style="text-align: right;"><500 ng</td> </tr> <tr> <td>Primer 1</td> <td style="text-align: right;">0.2~1.0 μM (final conc.)</td> </tr> <tr> <td>Primer 2</td> <td style="text-align: right;">0.2~1.0 μM (final conc.)</td> </tr> <tr> <td>滅菌蒸留水</td> <td style="text-align: right;">up to 50 μl</td> </tr> </table> <p>* 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</p> </div> <p>■ Robust buffer 使用上のご注意</p> <p>新しく添付しております 10 x Robust buffer (Taq)(02-Trb)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メアーな泳動物が出現する場合があります。</p> <p>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。</p>	Taq DNA polymerase (5 U/μl) (02-Taq)	* 0.25 μl	10x Robust Buffer (Taq) (02-Trb)	5 μl	5x GC Enhancer (02-Enh)	10 μl	2.5mM (each) dNTPs (02-Dnt)	4 μl	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	up to 50 μl
Taq DNA polymerase (5 U/μl) (02-Taq)	* 0.25 μl																
10x Robust Buffer (Taq) (02-Trb)	5 μl																
5x GC Enhancer (02-Enh)	10 μl																
2.5mM (each) dNTPs (02-Dnt)	4 μl																
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	up to 50 μl																
関連商品	02-001 Taq DNA Polymerase with Standard Buffer (+dNTPs) 02-013 Taq DNA Polymerase with Enhancer for high GC template and Robust Buffer (-dNTPs)																
Please note: All products are FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES. NOT FOR MILITARY USE.																	

画像: 02-003 Taq DNA ポリメラーゼ with Enhancer for high GC template and Robust Buffer (+dNTPs)

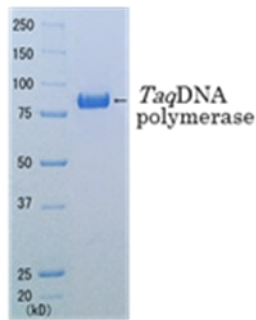


Fig.1 SDS-PAGE of *Taq* DNA polymerase

プロトコール例

λ DNA 増幅例 PCR 条件

2 kb, 4 kb

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

6 kb

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

8 kb

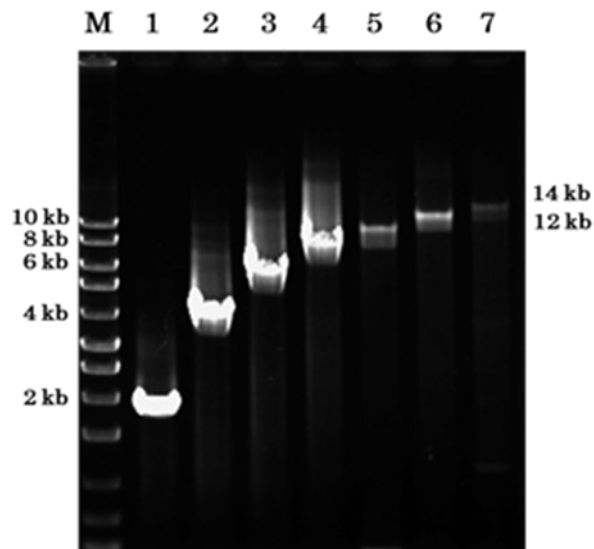
94 °C 1 min
95 °C 5 sec } 25 cycles
65 °C 1 min 20 sec

10 kb, 12 kb

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

14 kb

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



M: marker,
lane 1: 2 kb, lane 2: 4 kb, lane 3: 6 kb,
lane 4: 8 kb, lane 5: 10 kb, lane 6: 12 kb,
lane 7: 14 kb.

Fig. 2 PCR products obtained by using Robust buffer (agarose gel electrophoresis)

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。

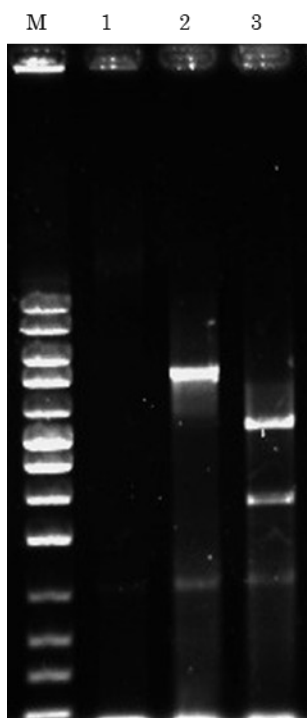
実験例に示したように新規 Buffer による酵素反応は非常に速いですので 2 -step PCR を行うことをおすすめします。2 -

step PCR を行なうことにより従来の PCR より大幅に時間短縮して結果の確認ができます。

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

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



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 10 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。

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