

Pyrobest™ DNA Polymerase

Code No. R005A

Size: 125 units

Shipping at – 20°C

Store at – 20°C

Supplied Reagents :

10X *Pyrobest*™ Buffer II (Mg²⁺ plus) 500 µl
dNTP Mixture (2.5 mM each) 400 µl

Lot No.

Conc. : units / µl

Volume : µl

Expiration Date :

Storage Buffer : 50 mM Tris-HCl, pH8.2
0.1 mM EDTA
1 mM DTT
0.1% Tween 20
0.1% NP-40
50% Glycerol

Source :

Escherichia coli carrying a plasmid that encodes the *Pyrococcus* sp. DNA polymerase gene.

Unit definition :

One unit is the amount of enzyme that will incorporate 10 nmol of dNTP into acid-insoluble products in 30 minutes at 74°C with activated salmon sperm DNA as the template-primer.

Reaction mixture for unit definition:

20 mM Tris-HCl, pH8.3 at 37°C
10 mM KCl
6 mM (NH₄)₂SO₄
2 mM MgCl₂
0.1% Triton X-100
0.001% BSA
200 µM each dATP, dGTP, dCTP
100 µM [³H] TTP
0.4 mg/ml activated salmon sperm DNA

Purity :

Nicking, endonuclease and exonuclease activity were not detected after the incubation of 0.6 µg of supercoiled pBR322 DNA, 0.6 µg of λ DNA or 0.6 µg of λ-Hind III digest with 10 units of this enzyme for 1 hour at 74°C.

Applications:

For DNA amplification by Polymerase Chain Reaction (PCR).

PCR products :

As most of PCR products amplified with *Pyrobest*™ DNA Polymerase are blunt-ended, they can be applied to cloning into blunt-ended vectors. (If necessary, phosphorylate before cloning.)

PCR test :

1. Good performance of DNA amplification by PCR was confirmed by using *E. coli* genomic DNA as the template (amplified fragment : 8 kb).
2. Good performance of DNA amplification of a single copy gene by PCR was also confirmed by using human genome DNA as the template, and human p53-primers (amplified fragment : approx 3 kb).

General reaction mixture for PCR (total 50 µl)

Template DNA < 500 ng
Pyrobest™ DNA Polymerase (5 units/µl) 0.25 µl
10X *Pyrobest*™ Buffer II 5 µl
dNTP Mixture (2.5 mM each) 4 µl
Primer 1 0.2 µM - 2 µM (final conc.)
Primer 2 0.2 µM - 2 µM (final conc.)
Sterilized distilled water up to 50 µl

PCR condition (an example) : When amplifying 1 kb DNA fragment

98°C 10 sec. } 30 cycles or 98°C 10 sec. } 30 cycles
68°C 1 min. } or 55°C 30 sec. }
72°C 1 min. }

(Note) Denaturation conditions vary depending on the thermal cycler and tubes used for PCR. The recommendation is for 1 - 10 sec. at 98°C, or 10 - 30 sec. at 94°C.

10X *Pyrobest*™ Buffer II (Mg²⁺ plus) : Mg²⁺ Concentration (10X) : 10 mM

dNTP Mixture : dNTP Mixture is ready for use in PCR without dilution.

Concentration : 2.5 mM of each dNTP
Form : Dissolved in water (sodium salts), pH7 - 9
Purity : ≥ 98% for each dNTP

Preparation of reaction mixture : Notes to consider

All reagents should be placed on ice after thawed. Prepare the reaction mixture on ice to minimize non-specific amplification which is caused by misannealing of primers. Add the reagents into a reaction tube in the order listed as below*. After adding the all reagents, mix gently by pipetting.

Preparation order (an example)

1. Sterilized distilled water
2. 10X *Pyrobest*™ Buffer II
3. dNTP Mixture
4. *Pyrobest*™ DNA Polymerase
5. Template DNA
6. Primer 1
7. Primer 2

Start thermal cycling as soon as the reaction mixture is prepared.

* : This preparation order should be strictly followed. *Pyrobest*™ DNA Polymerase must be added after adding dNTP Mixture into a tube. In case there is no dNTP Mixture in a tube, primers may be digested by the 3' to 5' exonuclease activity of *Pyrobest*™ DNA Polymerase.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

[P1] PCR Notice

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,079,352, 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155 and claims outside the US corresponding to US Patent No. 4,889,818. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim (such as the patented 5' Nuclease Process claims in US Patents Nos. 5,210,015 and 5,487,972), no right to perform any patented method, and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from TAKARA BIO INC. If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 543 7247 or from our website at www.takara-bio.com.

Pyrobest® DNA Polymerase

Code No. R005A
Size: 125 units

Shipping at - 20°C
Store at - 20°C

添付試薬：10 × Pyrobest® Buffer II (Mg²⁺ plus) 500 μl
dNTP Mixture (各 2.5 mM) 400 μl

Lot No. (英文面をご覧ください。)
濃度： (英文面をご覧ください。)
容量： (英文面をご覧ください。)
品質保証期限： (英文面をご覧ください。)

●形状 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.2)
0.1 mM EDTA
1 mM DTT
0.1% Tween 20
0.1% NP-40
50% Glycerol

●起源

Escherichia coli carrying a plasmid that encodes the *Pyrococcus* sp. DNA polymerase gene.

●活性の定義

活性化サケ精子 DNA を鋳型/プライマーとして用い、下記の活性測定用反応液中にて 74°C において、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 U とする。

●活性測定用反応液組成

20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.3, 37°C)
10 mM KCl
6 mM (NH₄)₂SO₄
2 mM MgCl₂
0.1% Triton X-100
0.001% BSA
各 200 μM dATP, dGTP, dCTP
100 μM [³H] TTP
0.4 mg/ml 活性化サケ精子 DNA

●純度

- 10 U の本酵素と 0.6 μg の λ-Hind III 分解物を 74°C、1 時間反応させても DNA の電気泳動パターンに変化は起こらない。
- 10 U の本酵素と 0.6 μg の supercoiled pBR322 DNA を 74°C、1 時間反応させても DNA の電気泳動パターンに変化は起こらない。
- 10 U の本酵素と 0.6 μg の λDNA を 74°C、1 時間反応させても DNA の電気泳動パターンに変化は起こらない。

●用途

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による DNA 増幅

●PCR 産物について

Pyrobest® DNA Polymerase を用いて増幅した PCR 産物の多くは平滑末端である。したがって、その PCR 産物をそのまま (必要に応じてリン酸化して) 平滑末端のベクターにクローニングすることが可能である。

●PCR 検定

- 大腸菌ゲノム DNA を鋳型とした PCR 反応 (増幅産物 8 kb) において良好な増幅が見られることを確認している。
- ヒトゲノム DNA を鋳型とした single copy gene の PCR 反応 (増幅産物約 3 kb) において良好な増幅が見られることを確認している。

●一般的な PCR 反応液組成 (total 50 μl)

Template DNA < 500 ng
Pyrobest® DNA Polymerase (5 units/μl) 0.25 μl
10 × Pyrobest® Buffer II 5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each) 4 μl
Primer 1 0.2 μM ~ 2 μM (final conc.)
Primer 2 0.2 μM ~ 2 μM (final conc.)
滅菌蒸留水 up to 50 μl

●PCR 条件 (例) 1 kb DNA を増幅する時

98°C 10 sec. } 30 cycles or 98°C 10 sec.
68°C 1 min. } 30 cycles or 55°C 30 sec.
72°C 1 min. } 30 cycles

注) 変性条件は、使用機種とチューブの種類に合わせて設定する。設定の目安は、98°C 1 ~ 10 sec.、あるいは 94°C 10 ~ 30 sec.。

10 × Pyrobest® Buffer II (Mg²⁺ plus)

・ Mg²⁺ 濃度 (10 ×) 10 mM

dNTP Mixture

dATP、dCTP、dTTP、dGTP の等モル混合物で、希釈せずにそのまま PCR 反応に用いることができる。

- ・濃度 各 2.5 mM
- ・形状 水溶液 (ナトリウム塩)、pH7 ~ 9
- ・純度 各 98% 以上

《反応液の調製》

各試薬は融解後、氷上に置きます。PCR 反応液の調製も出来るかぎり氷上で行います。これによりプライマーのミスアニーリングが原因の非特異的増幅を抑えることが出来ます。各試薬を PCR tube に下記の順番で加えていき、最後に軽くピペティングにより攪拌します。

試薬を加える順番 (例)

1. 滅菌蒸留水
2. 10 × Pyrobest® Buffer II
3. dNTP Mixture
4. Pyrobest® DNA Polymerase
5. Template DNA
6. Primer 1
7. Primer 2

反応液調製後は、なるべく早く反応をスタートしてください。

注) 酵素は dNTP Mixture を添加した後に加えてください。dNTP が存在しない場合、酵素の 3' → 5' exonuclease 活性によりプライマーが分解される恐れがあります。

●注意

本製品は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。