取 扱 説 明 書

phi29 DNAポリメラーゼ セット
phi29 DNA polymerase set

1. はじめに

phi29 DNA ポリメラーゼは *Bacillus subtilis* ファージ phi29 由来の DNA ポリメラーゼです[1]。本酵素は、①30 ℃付近で活性を示す、②強い鎖置換活性を持ち、伸長方向にある 2 本鎖DNAをほどきながらDNA 合成を進めることができる[2]、③3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を持ち[3]、DNA 複製のエラー率が極めて低い[4]、④一度の合成反応で長い DNA(>70 kb)を合成できる[2]、といった特徴を有します。本製品は、農研機構　食品総合研究所と共同で開発した独自の精製技術により、宿主大腸菌ゲノム等の DNA 合成反応の鋳型となりうる DNA の混入を極限まで抑えています[5]。

2. 製品形態

製品名	phi29 DNA ポリメラーゼセット (phi29 DNA polymerase set)
製品番号	10195-96
製品構成	phi29 DNA ポリメラーゼ　25 μL×4 本 10×Reaction buffer　100 μL×4 本 取扱説明書　1 部
保管温度	−25 ～ −20 ℃ (phi29 DNA ポリメラーゼ凍結不可)

3. 試薬組成

- phi29 DNA ポリメラーゼ
  33 mM Tris-HCl (pH 7.5)、 100 mM 塩化カリウム、
  0.1 mM EDTA、 1 mM DTT、 1 mM THP、
  0.5 % Tween20、 0.5 % NP-40、 50 % グリセロール、
  0.05 mg/mL phi29 DNA ポリメラーゼ
- 10×Reaction buffer
  350 mM Tris-HCl (pH 7.6)、500 mM 塩化カリウム、
  140 mM 塩化マグネシウム、300 mM 硫酸アンモニウム

4. アプリケーション

- Rolling circle amplification; RCA[6]
- Multiple displacement amplification; MDA[7]
- Multiply-primed RCA with modified RNA primer[8]
- Cell-free cloning[8]

5. 製品規格

- ヌクレアーゼ混入:
  エンドヌクレアーゼおよび RNase 活性非検出
- 酵素活性: 酵素 0.1 μg 当たりの DNA 合成量
  9,000 ng/hr ± 25%
- DNA 混入: 精製水を試料とした場合に DNA 非検出

6. 酵素活性測定の反応条件

1×Reaction buffer、 50 μg/mL M13 ssDNA、
10 μM M13 primer※、 1 mM dNTPs、 5 mM DTT、
1 U/mL Pyrophosphatase、
5 μg/mL phi29 DNA ポリメラーゼ
(反応温度 30 ℃)
※M13 primer: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' (17mer)

7. DNA 混入試験の反応条件

1) 以下の試薬を調製

試料	2.0 μL
10×Reaction buffer	1.0 μL
100 μM 6R5S primer※	2.0 μL
精製水	5.0 μL
total	10.0 μL

※6R5S primer: rN*rN*rN*rN*rN*rN (6mer)[8]
(rN は RNA の mix 塩基、*はホスホロチオエート化を示す)

2) 95 ℃で 1 分間加熱後、30 ℃まで 0.1 ℃/秒で冷却

3) 以下の試薬を調製し、2)に添加

10×Reaction buffer	1.0 μL
25 mM dNTPs	0.8 μL
100 mM DTT	1.0 μL
Pyrophosphatase (200 U/mL)	0.1 μL
精製水	5.1 μL
phi29 DNA ポリメラーゼ (0.05 mg/mL)	2.0 μL
Total	10.0 μL

4) 30 ℃で 16 時間反応後、65 ℃で 10 分間加熱して phi29 DNA ポリメラーゼを不活化

5) 上記反応液を精製水で 10 倍希釈し、5 μL をアガロースゲル電気泳動後、臭化エチジウムで検出

8. 本製品の使用例

従来品および本製品の phi29 DNA ポリメラーゼを用いて、pUC18 DNA または精製水(Non-template)を試料として DNA 混入試験の反応条件で増幅反応を行った。反応後、10 倍希釈した反応液を制限酵素(*Bam* HⅠと *Eco* RⅠ)で処理した後、アガロースゲル電気泳動で増幅産物のサイズを確認した(下図参照)。pUC18 DNA に由来する増幅産物は制限酵素処理により約 2.7 kbp のバンドとして検出される。

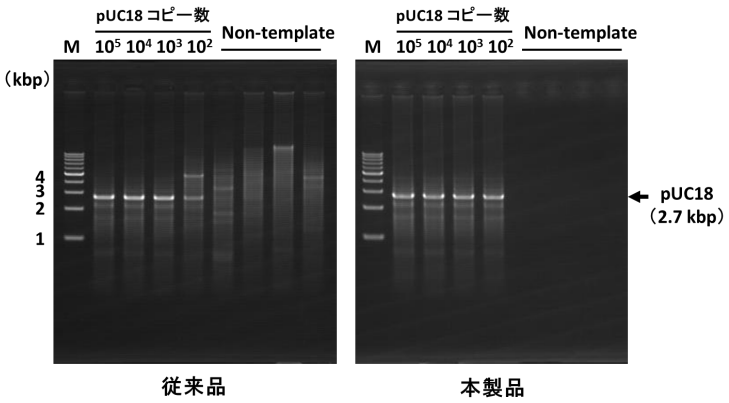

図. 増幅産物のアガロースゲル電気泳動

9. 使用上の注意事項

1) DNA で汚染されていないマイクロピペットをご使用下さい。本製品専用にマイクロピペットを準備することをお勧めします。
2) マイクロピペットの汚染やクロスコンタミを防止するため、フィルター付きチップをご使用下さい。
3) 器具のオートクレーブ滅菌は、DNA 汚染の原因となる場合があります。γ線滅菌されたチップや DNA-free のチューブ類をご使用下さい。
4) 本製品や本製品に使用する試薬類の調製は、ISO クラスⅠのクリーンベンチ内で作業することをお勧めします。
5) チップやチューブ、手袋等が帯電すると DNA が混入する原因となる場合がありますので、静電気除去装置を使用するなど静電気対策を講じることをお勧めします。
6) 酸化した DTT(ジチオスレイトール)を使用すると、酵素活性が低下する場合があります。調製した DTT は小分けして凍結保存し、融解後の再凍結は避けて下さい。
7) phi29 DNA ポリメラーゼを室温で放置すると酵素活性が低下する場合があります。本酵素を使用する際は氷上に置いて使用して下さい。
8) 本製品は指定の保管温度(-25～-20 ℃)で保管して下さい。特に、phi29 DNA ポリメラーゼは-30 ℃以下で凍結し酵素活性が低下する場合がありますので、-80 ℃ディープフリーザー等、指定の保管温度より低い温度での保管は避けて下さい。

10. その他の注意事項

1) 本製品は試験研究用としてご使用下さい。研究目的以外の用途には使用しないで下さい。
2) 本製品のアプリケーションによっては、ライセンスが必要となる場合があります。

11. 推奨機器・試薬例

・ISO クラスⅠイオナイザー付クリーンベンチ:
KOACH T 500-F 飛来物防止板イオナイザー付 (興研)
・DTT:ジチオスレイトール 分子生物学用
(関東化学, code:10752-63)
・Pyrophosphatase:Pyrophosphatase, inorganic
(Roche, code:10108987001)
・6R5S primer:HPLC 精製品

その他の試薬類、器具は、弊社までお問い合わせ下さい。

12. 参考文献

(1) Blanco, L. and Salas, M .(1984) *PNAS*., 81, 5325-5329
(2) Blanco, L. et al. (1989) *J. Biol. Chem*., 264, 8935-8940
(3) Garmendia, C. et al. (1992) *J. Biol. Chem*., 267, 2594-2599
(4) Esteban, JA. et al. (1993) *J. Biol. Chem*., 268, 2719-2726
(5) Takahashi H., et al. (2014) *PLOS ONE*, 9, e82624
(6) Lizardi, PM., et al. (1998) *Nat. Genet*., 19, 225-232
(7) Dean, FB., et al. (2002) *PNAS*., 99, 5261-5266
(8) Takahashi H., et al. (2009) *BioTechniques*, 47, 609-615