



Flexible KOD DNA polymerase KOD FX

KOD FXは、高正確性PCR酵素KOD DNA polymeraseをベースに開発された高性能PCR試薬です。高い「増幅成功率」、「増幅効率」、および「伸長性」を示すことから、'07/5月の発売以来、多くの先生方から、「他のPCR酵素では増えなかったターゲットが簡単に増えた!」との声を多く頂いております。

今回は、KOD FXを更に効果的かつ幅広くお使い頂くために、これまでに頂いたご質問に対して、実施例をお示ししながら解説致します。



Q1 KOD FXの最大の特長は何ですか？ また、KOD -Plus-とはどのように使い分けたらよいですか？

A1 以下に、弊社が販売しているPCR酵素の中でのKOD FXの位置付けに関する一覧表をお示します。表から、KOD FXの増幅成功率、増幅効率、及びGCリッチなサンプルの増幅において、KOD FXが格段に高い性能を示すことがお分かりいただけると思います。

表1. 東洋紡のPCR酵素におけるKOD FXの位置付け

		正確性	伸長性 (ロング性能)	増幅効率 (収量)	増幅成功率	GCリッチ サンプル	増幅末端	伸長時間 (/kb)	ホット スタート
高正確性PCRをしたい 高効率で汎用PCRをしたい	KOD FX	★★★★ (Taqの約11倍)	★★★★★	★★★★★	★★★★★	★★★★★	平滑末端	1min.	○
	KOD DNA Polymerase	★★★★★ (Taqの約50倍)	★★	★★	★★	★★★★	平滑末端	30sec.	—
	KOD -Plus-	★★★★★ (Taqの約80倍)	★★★★	★★★★	★★★★	★★★★	平滑末端	1min.	○
	KOD -Plus- Ver.2	★★★★★ (Taqの約80倍)	★★★★	★★★★	★★★★	★★★★	平滑末端	1min.	○
	Blend Taq®	★★ (Taqの約3倍)	★★★★★	★★★★★	★★★★★	★★★	A付加あり	1min.	—
	Blend Taq® -Plus-	★★ (Taqの約3倍)	★★★★★	★★★★★	★★★★★	★★★	A付加あり	1min.	○
	KOD Dash®	★★ (Taqの約3倍)	★★★★★	★★★★★	★★★★	★★★★	A付加あり	30sec.	—

実験1に示しましたように、KOD FXは、GCリッチなターゲットに対し抜群の増幅性能を示すことが特長です。

また、高い増幅成功率を示し、Long PCRのみでなく、普段のルーチンPCRにおいて確実にPCR産物を取得したい場合にも力を発揮します。

なお、伸長性に関しては、ヒトゲノムDNAを鋳型とした場合、KOD -Plus-の最大増幅鎖長が約12kbに対して、KOD FXでは、最大約24kbと、約2倍の鎖長を増幅できることを確認しています。

一方、正確性(Fidelity)の点においては、KOD -Plus-及びKOD -Plus- Ver.2の方がさらに高い正確性を示しますので、より正確性を必要とする用途には、KOD-Plus-もしくはKOD -Plus- Ver.2のご使用をお薦めします(⇒Q3参照)。

※KOD -Plus- Ver.2は、正確性はKOD -Plus-の性能を保ちつつ、さらに増幅成功率を高めたPCR酵素ですが、増幅成功率はKOD FXが勝ります(表1)。

◆実験1◆ GC richターゲットの増幅

ターゲット: ヒト IGF2R遺伝子[NM_000876] 8.9kb
(GC含量約90%の領域を含む遺伝子)

プライマー配列:

F primer: 5' -TCCCGCTCCGTCTCCACCTCCGC-3'

R primer: 5' -CAGGGCGGTTTGCTTCTCAGCAATAGA-3'

鋳型: ヒトcDNA (HeLa Total RNA50ng相当) / 50μl反応系

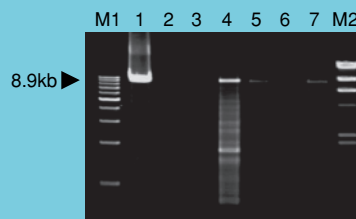
PCRサイクル: 94°C 2min.

98°C 10sec.

68°C 8min.

30 cycles

※他社酵素については、製品添付のプロトコールに従い30サイクルにて実施しました。



M1: 1kb DNA ラダー

1: KOD FX

2: A社汎用PCR酵素 (Taqベース)

3: B社Long PCR酵素 (Taqベース)

4: C社GCrich対応高正確性酵素

5: D社GCrich対応Long PCR酵素 I

6: E社GCrich対応Long PCR酵素 II

7: F社高効率Long PCR酵素

M2: λ/Hind III digest



Q2 細胞培養液などのクルードサンプルを直接鑄型として使用することはできますか？

A2 可能です。サンプル適応力の高いKOD FXは、夾雑物を含むサンプルに対しても高い増幅成功率を示します。実験2は、Jurkat細胞の細胞懸濁液を直接PCR反応液に添加して増幅を試みた例ですが、8.5kbまでの増幅が確認できました。また、ここではお示ししておりませんが、培養細胞以外のさまざまなクルードサンプルから、直接増幅可能であることを確かめています。クルードサンプルの場合、最大2μlを50μlのPCR反応系に添加して実施すると良い結果が得られます。

◆実験2◆ 培養細胞を鑄型とした直接PCR

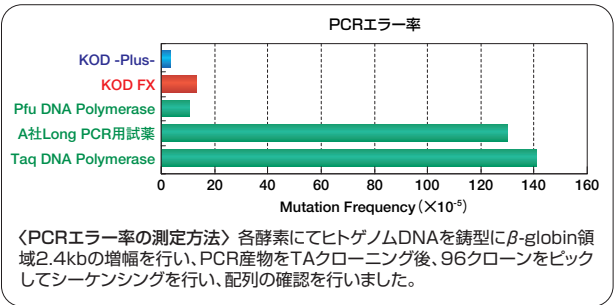
ターゲット:ヒトβ-globin 領域1.3kb、3.6kb、8.5kb
 プライマー配列:
 1.3kb F primer: 5'-TTAGGCCTTAGCGGGCTTAGAC-3'
 1.3kb R primer: 5'-CCAGGATTTTTGATGGGACACG-3'
 3.6kb F primer: 5'-GGTGTTCCTTGATGTAGCAC-3'
 3.6kb R primer: 5'-ACATGTATTTGCATGGAAAACAAC-3'
 8.5kb F primer: 5'-TGATAGGCACTGACTCTGTCCCTTGGGCTGTTT-3'
 8.5kb R primer: 5'-ACATGATTAGCAAAGGGCCTAGCTTGGACTCAGA-3'

鑄型:Jurkat細胞 2×10⁴cells/50μl反応系 (RPMI/10%FCSIに懸濁した1×10⁴/μlの細胞を2μl使用)
 PCRサイクル:94°C 2min.
 98°C 10sec. ◀ 30 cycles
 68°C 3min./kb

1, 2: ヒトβ-globin 1.3kb
 3, 4: ヒトβ-globin 3.6kb
 5, 6: ヒトβ-globin 8.5kb
 M: λ/Hind III digest

Q3 PCR増幅時の正確性はどのくらいですか？また、クローニング目的に使用できますか？

A3 KOD FXのPCRエラーによるミス塩基の取り込み頻度(エラー率)は、実際にシーケンシングにて解析した結果、144,535塩基中、わずか19塩基でした。この正確性は、Taqや他社Long PCR用酵素の約10倍優れている値です(右図)。従って、クローニング目的にも十分使用することが可能です。



実験3は、実際に、真核細胞における最も長いmRNAの一つであるヒトジストロフィン(DMD)遺伝子をクローニングすべく、遺伝子の全長13.5kbのPCR増幅を試みた例です。ここでのPCR産物をplasmidにクローニングし、配列の確認を行ったところ、5クローン中の1クローンでPCRエラーのないクローンを取得することができました。

また、KOD FXを用いて増幅したPCR産物は、KOD -Plusなどと同様に末端が平滑化されていることに注意する必要があります。そのままではTAクローニングすることはできません。専用のTAクローニングキット「TArget Clone™ -Plus-」を用いることによりKOD FXのPCR産物を直接TAクローニングすることが可能です。

◆実験3◆ ヒトジストロフィン(DMD)遺伝子13.5kbの増幅

ターゲット:ヒトジストロフィン(DMD)遺伝子[NM_004006.1] 13.5kb
 プライマー配列:
 F primer:5'-GTCGGCCCTTGTGGCCCTACTGGAGCAATAAAGTTTGAAGAACCTTTACCAGG-3'
 R primer:5'-GACGGCCCTATGTGGCCACAACACGAAATAATGTCCAAATTAATTATGC-3'
 (下線部はplasmidへのクローニングの際に使用したSfi Iサイト)

鑄型:ヒトcDNA (Human Adult Skeletal Muscle total RNA 50ng相当) / 50μl反応系
 PCRサイクル:94°C 2min.
 98°C 10sec. ◀ 30 or 35 or 40 cycles
 68°C 14min.

M1 1 2 3 M2

13.5kb ▶

M1: 1kb DNA ラダー
 1: 30サイクル
 2: 35サイクル
 3: 40サイクル
 M2: λ/Hind III digest

以上、ここでご紹介したように、KOD FXはとにかく高い増幅成功率を示しますので、PCR増幅で問題を抱えられている方はもちろん、PCRに安心感を得たい方は、是非一度お試しください。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD FX KOD FX (1U/μl) 2×PCR Buffer for KOD FX 2mM dNTPs	200U×1本 [200回用*]	-20°C	KFX-101	¥35,000
	(200U×1本)×5 [1,000回用*]	-20°C	KFX-101X5	¥140,000
高効率TAクローニングキット TArget Clone™ -Plus-	10回用	-20°C	TAK-201	¥16,000

*50μl反応を行った時の反応回数を表示しています。
 ※KOD FXで増幅されたDNA断片は平滑化されているため、通常のTAクローニングはできません。TArget Clone™ -Plus-をお使いください。