

高効率・高成功率PCR酵素 KOD FX Neo

難配列・Long PCR・
クルードサンプルにお薦め



NEW

■期間：2010年10月20日～2011年3月31日(ご注文分)

伸長性、及びクルードサンプルからの増幅効率が格段にアップしました。

KOD DNA polymerase*は、優れた伸長性を有し、また比較的クルード成分の阻害に強いといった特長を持っています。「KOD FX」は、この酵素の特性を利用して開発された高成功率PCR酵素であり、難配列やクルードサンプルからの増幅などにおいてご好評いただいております。

しかし、従来のPCR酵素は、20～30サイクル以降、増幅が持続しなくなる「プラトー現象」が生じるため、PCR機能が完全には発揮できていないと考えられていました。KOD FX Neoは「KOD FX」の技術に、弊社で新たに開発した「伸長エンハンサー」などの技術を応用することで、「プラトー現象」を抑え、長鎖ターゲット・難配列ターゲットの増幅やクルードサンプルからの増幅の効率をさらに向上させることに成功しました。

* M. Takagi et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63** : 4504-4510 (1997)

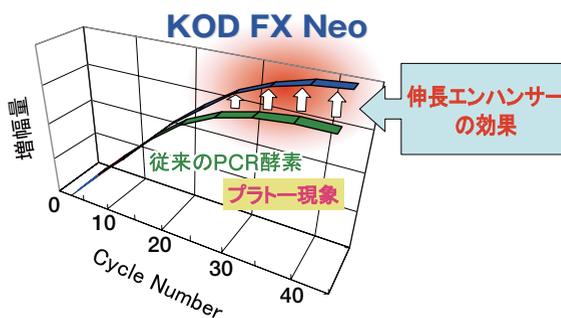


図1. 伸長エンハンサーの効果

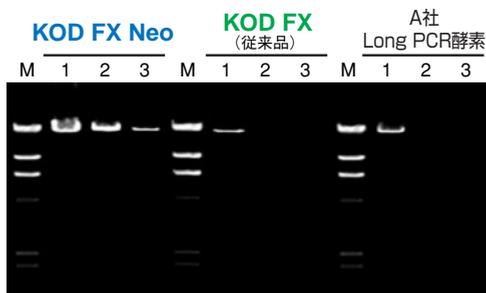


特長1 伸長性アップ

- ・ゲノムDNAを鋳型として最大40kbの増幅が可能
- ・30sec./kbの高速サイクルを実現(クルードサンプルでは1min./kbをお薦めしております)
- ・高GCターゲットなどの難配列の増幅に最適

実施例1 ヒトゲノムDNAを用いた増幅長の比較

従来困難であった、40kbの遺伝子の増幅が可能でした。また、従来品に比べ約半分の時間で増幅が完了しました。



〈伸長時間〉 30sec./ kb 60sec./ kb ≤30sec./ kb

M: λ Hind III Marker
1: tPA 24kb
2: HBg 32kb
3: HBg 40kb

Template: ヒトゲノムDNA 200ng/50 μ l

【サイクル条件】

KOD FX Neo

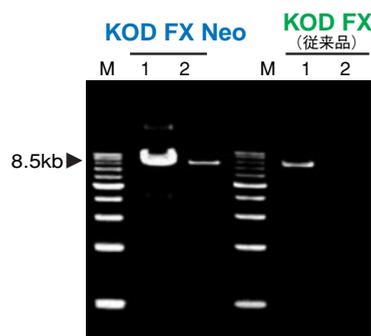
94 $^{\circ}$ C, 2min.
98 $^{\circ}$ C, 10sec. \leftarrow 5 cycles
74 $^{\circ}$ C, 30sec./kb \leftarrow 5 cycles
98 $^{\circ}$ C, 10sec. \leftarrow 5 cycles
72 $^{\circ}$ C, 30sec./kb \leftarrow 5 cycles
98 $^{\circ}$ C, 10sec. \leftarrow 5 cycles
70 $^{\circ}$ C, 30sec./kb \leftarrow 5 cycles
98 $^{\circ}$ C, 10sec. \leftarrow 20 cycles
68 $^{\circ}$ C, 30sec./kb \leftarrow 20 cycles
68 $^{\circ}$ C, 7min.
4 $^{\circ}$ C, Hold

KOD FX

94 $^{\circ}$ C, 2min.
98 $^{\circ}$ C, 10sec. \leftarrow 5 cycles
74 $^{\circ}$ C, 60sec./kb \leftarrow 5 cycles
98 $^{\circ}$ C, 10sec. \leftarrow 5 cycles
72 $^{\circ}$ C, 60sec./kb \leftarrow 5 cycles
98 $^{\circ}$ C, 10sec. \leftarrow 5 cycles
70 $^{\circ}$ C, 60sec./kb \leftarrow 5 cycles
98 $^{\circ}$ C, 10sec. \leftarrow 20 cycles
68 $^{\circ}$ C, 60sec./kb \leftarrow 20 cycles
68 $^{\circ}$ C, 7min.
4 $^{\circ}$ C, Hold

実施例2 検出感度の比較

ヒトゲノムDNAを鋳型として検出感度の比較を行いました。その結果、KOD FX Neoは、従来品に比べ約一桁感度の向上を認めました。



〈伸長時間〉 30sec./ kb 60sec./ kb

M: 1kb DNAラダー
1: 0.1ng
2: 0.01ng

Template: ヒトゲノムDNA
Target: Human β -globin 8.5kb

【サイクル条件】

KOD FX Neo

94 $^{\circ}$ C, 2min.
98 $^{\circ}$ C, 10sec. \leftarrow 40 cycles
68 $^{\circ}$ C, 4.5min. \leftarrow 40 cycles
4 $^{\circ}$ C, Hold

KOD FX

94 $^{\circ}$ C, 2min.
98 $^{\circ}$ C, 10sec. \leftarrow 40 cycles
68 $^{\circ}$ C, 9min. \leftarrow 40 cycles
4 $^{\circ}$ C, Hold

特長2 クールドサンプルからの増幅性能アップ

- ・植物ライセートやマウステールなどからの増幅効率を向上
- ・土壌成分や食品成分などのPCR阻害効果を低減

- ・従来品同様、グラム陽性菌や酵母、カビなどからの直接PCRが可能

実施例3 植物のライセートを用いた増幅

ワンステップ法で調製したタバコの葉のライセートをサンプルとして検討を行いました。今回は、今までの検討で、35サイクルの条件ではあまり増幅の良くなかった2.2kb及び4.6kbのターゲットを増幅しました。その結果、KOD FX Neoを用いることで、明瞭な増幅を確認することができました。

M: 1kb DNAラダー
1: KOD FX (従来品)
2: KOD FX Neo

Template: タバコ葉ライセート(ワンステップ法)
1μl
Target: rbcmt1

【サイクル条件】
94°C, 2min.
98°C, 10sec. ◀ 35 cycles
68°C, 1min./kb
4°C, Hold

●前処理法(ワンステップ法)

- ① 葉(3mm角) 精米(1粒)
- ② マイクロチューブへ
- ③ Buffer A 100μl添加し、Vortexにて良く攪拌
Buffer A: 100mM Tris-HCl (pH9.5)
1M KCl
10mM EDTA
- ④ 95°C・10 min.
Vortexにて良く攪拌
- ⑤ 上清1 μlをPCR反応液に添加(植物組織は完全には溶解しません)
左:葉 右:精米

【参考文献】
Bio Techniques, **19** : 394 (1995)

▶ p.7 User's Noteもご参照ください

実施例4 マウステールライセートを用いた増幅の比較

アルカリ溶解法を用いて調製したマウステールライセートをサンプルとして、3種類のマウス遺伝子の増幅を行いました。その結果、KOD FXとKOD FX Neoでのみ全ターゲットについて良好な増幅が認められました。また、増幅効率はKOD FX Neoの方が良好でした。

M: 100 bp DNA ラダー, 1 kb DNA ラダー
1: Mouse TATA box binding protein (TBP) 0.5 kb
2: Mouse transferrin receptor (Tfr) 1.5 kb
3: Mouse membrane glycoprotein (Thy-1) 2.6 kb

Template: マウステールライセート(アルカリ溶解法) 0.5μl

【サイクル条件】
94°C, 2min.
98°C, 10sec. ◀ 30 cycles
68°C, 1min./kb
4°C, Hold

	A社 クールドサンプル 対応PCR酵素1			A社 クールドサンプル 対応PCR酵素2		
KOD FX Neo	+	+	+	+	+	+
KOD FX (従来品)	-	-	-	-	-	-

96ウェルPCRプレートを用いるマウステール処理法(アルカリ溶解法)

マウステール(3mm程度)を96穴プレートに入れる
 ↓ ←50mM NaOH 180μlを加え、蓋をしてVortexにて良く攪拌する
 ↓ スピンダウン(軽く振って液を下に落とす程度でも問題ありません)
 ↓ 95°C, 10min.インキュベーター(サーマルサイクラーを使用)
 ↓ ←1M Tris-HCl (pH 8.0) 20μlを加え、蓋をしてVortexにて良く攪拌する
 ↓ スピンダウン(軽く振って液を下に落とす程度でも問題ありません)
 上清(テンプレート)⇒0.5~2μlをPCR反応液50μlに添加

※マウステール切片は、液に浸るようにカットしてください。 ※熱アルカリにご注意ください。
 ※処理後、マウステールは完全には溶解しません。マウステールの表面が溶ける程度です。
 ※本方法は、1.5mlマイクロチューブなどを用いても可能です。

実施例5 ジャム(食品)添加実験

加工食品の一例として、ジャムの懸濁液をPCR反応液に添加してPCRの阻害の検討を行いました。果物には、多糖をはじめとするPCRを阻害する物質が含まれています。その結果、KOD FX Neoが最も阻害に強いことが明らかとなりました。

M: 1kb DNA ラダー
1: ジャム上清0μl
2: ジャム上清2μl
3: ジャム上清4μl
4: ジャム上清6μl

Template: 10ng ヒトゲノムDNA
Target: Human β-globin 1.3kb

【サイクル条件】
94°C, 2min.
98°C, 10sec. ◀ 30 cycles
68°C, 1.5min.
4°C, Hold

添加PCR阻害物質:
イチゴジャム0.3gに100μlのTEバッファーを添加し遠心上清を添加

実施例6 フミン酸添加実験

フミン酸(humic acid)は、植物などの成分が腐植土や土壌などにおいて微生物などによって形成されるアルカリに可溶で、酸で沈殿する赤褐色ないし黒褐色を呈する、有機物であり、PCRを阻害することが知られています。ここでは、例としてヒトゲノムDNAにフミン酸を混合し、PCRの阻害に関する評価を行いました。その結果、KOD FX Neoが最もフミン酸の阻害に強い傾向があることが分かりました。

M: 1kb DNAラダー
1: フミン酸添加量* 0μl
2: フミン酸添加量* 2μl
3: フミン酸添加量* 4μl

Template: 10ngヒトゲノムDNA
Target: Human β-globin 3.6kb

【サイクル条件】
94°C, 2min.
98°C, 10sec. ◀ 30 cycles
68°C, 4min.
4°C, Hold

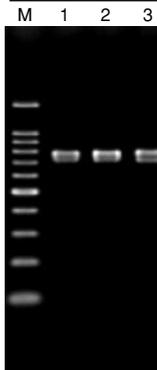
*フミン酸: OD280=1の溶液を使用

実施例7 コンポスト(堆肥)を用いたメタゲノム解析

コンポスト(堆肥)から、様々な方法を用いて粗抽出したDNA溶液(処理上清)をサンプルとして、原核生物共通プライマーを用いてrDNAの増幅を行いました。その結果、アルカリ溶解法とワンステップ法で調製したサンプルを用いた検討において、一般的に広く行われているCTAB法と同程度の増幅を確認することができました(右図)。続いて、KOD FX NeoのPCRプロダクトは末端が平滑化されているため、専用のTAクローニング試薬「TArget Clone™ -Plus-」を用いてクローニングし、シーケンス解析を行いました。その結果、解析した各96クローンにおいて、良好なシーケンス解析を行うことができました。また解析結果より、それぞれの粗抽出法によって得られた配列は、ほぼ同様の傾向を示しました(アルカリ溶解法やワンステップ法は大変簡便な方法ですが、はじめて使用される場合は、検出される菌の傾向等について、従来の方法と比較などの事前検討をお薦めします)。

また、アルカリ溶解法によって調製した上清を用いて、様々な増幅試薬を用いて、3種類の共通プライマーを用いてrDNAの増幅を行った結果、KOD FX Neoが最も良好な結果を示すことが分かりました(下図)。

KOD FX Neo

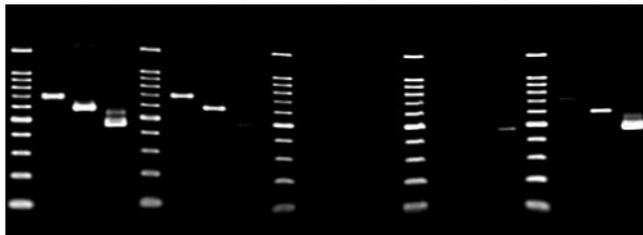


M: 100bp DNA ラダー
1: アルカリ溶解法
2: ワンステップ法
3: CTAB法(従来法)

【ターゲット】 16s rDNA
【プライマー】
Fwd GTTTGATCCTGGCTCA
Rev TACCAGGGTATCTAATCC
【サイクル条件】
94°C, 2min.
98°C, 10sec. ←
55°C, 30sec. ←
68°C, 1min./kb ←
4°C, Hold
24~26 cycles

1 アルカリ溶解法×24 cycles
2 ワンステップ法×24 cycles
3 CTAB法×26 cycles

KOD FX Neo KOD FX



M: 100bp DNAラダー
1: 原核生物由来rDNA (700 bp)
2: *Bacillus* sp. 由来rDNA (600 bp)
3: High G/C グラム陽性菌由来rDNA (550 bp)

【ターゲット】 16s rDNA
【プライマー】
1: Fwd ATTAGATACCTDGTAGTCC
Rev TACCTTGTTACGACTT
2: Fwd AGGGTCATTGGAAACTGGG
Rev CGTGTGTAGCCCAGGTCATA
3: Fwd GGCCTTCGGGTTGTAAACC
Rev CTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGC

【サイクル条件】
94°C, 2min.
98°C, 10sec. ←
X°C, 30sec. ←
68°C, 30sec. ←
4°C, Hold
Y cycles

1 X: 50°C Y: 23 cycles
2 X: 60°C Y: 33 cycles
3 X: 65°C Y: 33 cycles

アルカリ溶解法

土壌100mg
↓ ←50mM NaOH 180μl
↓ Vortexにて良く攪拌
↓ 95°C, 10min.インキュベート
↓ ←1M Tris-HCl (pH8.0) 20μl
↓ Vortexにて良く攪拌
↓ 遠心12,000rpm, 5min.
上清
↓
滅菌水で10倍に希釈し、1μlをPCR反応液50μlに添加

ワンステップ法

土壌100 mg
↓ ←Buffer A* 100μl
↓ Vortexにて良く攪拌
↓ 95°C, 10 min.インキュベート
↓ 遠心12,000rpm, 5min.
上清
↓
滅菌水で10倍に希釈し、1μlをPCR反応液50μlに添加
*Buffer A: 100mM Tris-HCl (pH9.5)
1M KCl
10mM EDTA

CTAB法

下記論文に従って実施しました。

J. Zhou *et al.*, DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 316-322 (1996)



品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格	キャンペーン価格
高効率・高成功率PCR酵素 KOD FX Neo KOD FX Neo (1.0U/μl) 2×PCR Buffer for KOD FX Neo 2mM dNTP	200U×1本 [200回用]*	-20°C	KFX-201	¥35,000	¥21,000
	(200U×1本)×5 [1,000回用]*	-20°C	KFX-201X5	¥140,000	対象外

*50μl反応を行ったときの反応回数で表示しています。

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
高効率TAクローニングキット (KOD用) TArget Clone™ -Plus-	10回用	-20°C	TAK-201	¥16,000

KOD FX Neoによって増幅されたDNAの末端は平滑化されていますので、末端を制限酵素処理するか、平滑末端クローニングの手法を用いてクローニングを行う必要があります。また専用のTAクローニングキット「TArget Clone™ -Plus- (Code No. TAK-201)」を用いることで増幅産物に直接Aを付加し、そのまま容易にTAクローニングを行うことができます。