





# KOD FXの特性

「KOD FX」は、様々な優れた特性を有するPCR酵素「KOD DNA Polymerase」をベースに開発された高性能PCR試薬です。本酵素は、優れた「増幅成功率」、「増幅効率」、「伸長性」を示し、幅広いPCRにおいて確実にPCR産物を得ることができます。KOD -Plus-シリーズがKOD DNA polymeraseの高い正確性に着目して開発されたのに対し、本酵素は「増幅成功率」、「増幅効率」、「伸長性」を重視して開発された酵素であるといえます。

特に、KOD FXのその優れた「増幅成功率」は、クールドなサンプルを直接鋳型に用いる場合においても発揮されることを確認しています。すなわち、従来、サンプルからDNAを一旦精製してから行っていたようなPCR実験も、「KOD FX」を用いることによって、煩雑なDNAの精製が不要になったり、簡単なサンプルの前処理のみでPCR実験が可能になります。

本実施例集が、今まで確認実験に費やされてきた試薬コスト、そしてなによりも先生方の貴重な時間を節約するためのヒントになれば幸いです。



**KOD FX** ●クールドサンプルからのPCR増幅!! ●難配列ターゲットの増幅!!

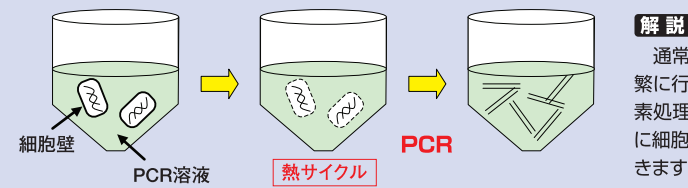
↑ 増幅成功率、増幅効率、伸長性を重視  
**KOD DNA polymerase**  
↓ 正確性を重視 (Taqの約80倍)

**KOD -Plus-シリーズ** ●高正確性PCR (クローニング用)

\*KOD FX、KOD -Plus-シリーズともに抗体を用いるホットスタート法を採用しています。

## 1 細胞壁をもつ微生物からの直接PCR

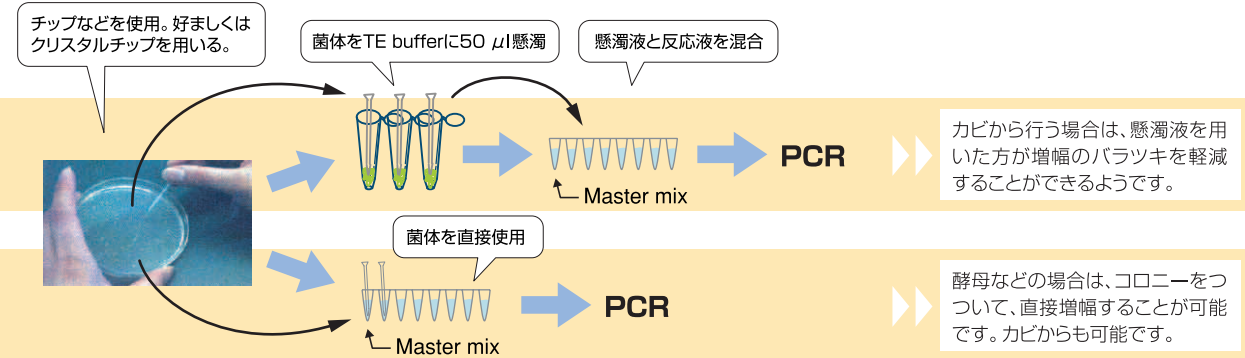
酵母 カビ 真菌 プラントン など



解説

通常、大腸菌などのグラム陰性菌からの直接PCRはプラスミドのインサート確認などで頻繁に行われますが、酵母やカビなどをサンプルとする場合、細胞壁が存在するため、通常酵素処理が行われます。KOD FXは、バッファーに特別な技術を使用しており、熱サイクル中に細胞壁を効率良く破壊するため、多くの微生物を直接サンプルとしてPCRを行うことができます。

### プロトコール 微生物からの直接PCR



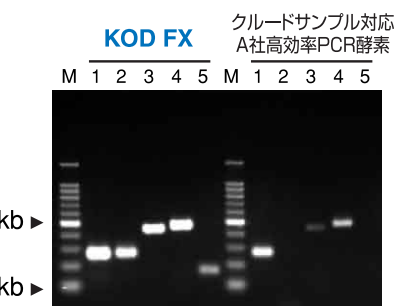
#### 【PCR組成 (懸濁液を使用する場合)】

滅菌蒸留水	9 <math>\mu\text{l}</math>
2x PCR Buffer for KOD FX	25
2mM dNTPs	10 (0.4mM)
10 pmol/ $\mu\text{l}$ Forward Primer	1.5
10 pmol/ $\mu\text{l}$ Reverse Primer	1.5
KOD FX (1U/ $\mu\text{l}$ )	1
菌などの懸濁液*	5
Total	50 $\mu\text{l}$

#### 【サイクル】

94°C	2 min.
98°C	10 sec.
50°C	30 sec.
68°C	1 min.

#### 【結果】



#### 【ターゲット】

ITS-1 (150~470bp)

#### 【プライマー配列】

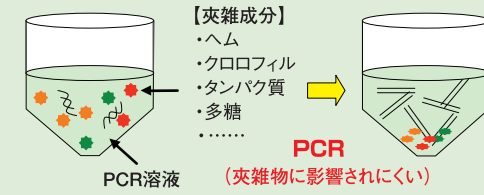
Primer F: 5'-GTAACAAGGT (T/C) TCCGT-3'  
Primer R: 5'-CGTTCTTCATCGATC-3'

M: 100 bp DNA Ladder  
1: *Aspergillus oryzae*  
2: *Aspergillus niger*  
3: *Saccharomyces cerevisiae*  
4: *Schizosaccharomyces pombe*  
5: *Pichia pastoris*

\*コロニーから直接行う場合はこの分だけ滅菌蒸留水を増やします。

## 2 クールドサンプル等からの増幅

ライセート マウステール 植物 ホルマリン固定組織 ショウジョウバエ 毛根 / 直接 血液 体液 濾紙血 哺乳類培養細胞 など



解説

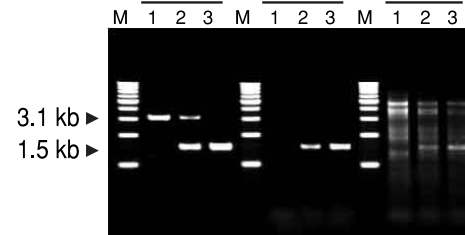
生体由来の、ヘムやクロロフィル、タンパク質成分、多種などはPCRを阻害することが知られています。KOD FXには、これらの成分の阻害を抑える成分が添加されており、マウステールや植物組織を簡単に処理したライセートなどを用いて、高効率なPCRを行うことができます。特に、トランスジェニックマウスや植物などのジェノタイピングに有用です。また、血液や哺乳類培養細胞などからも直接増幅可能です。

### プロトコール マウステール①

#### 【アルカリ溶解法 (高速プロトコール)】



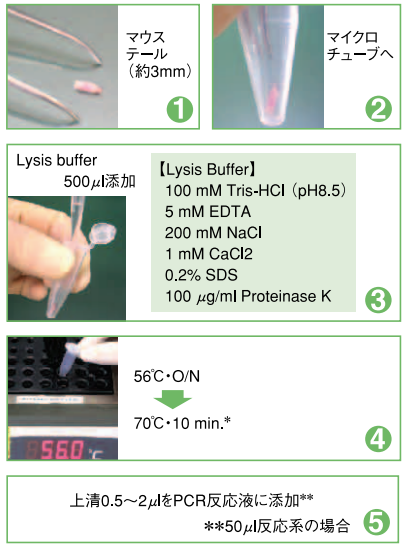
【結果】 クールドサンプル対応A社高効率PCR酵素  
**KOD FX** 2ステップサイクル 3ステップサイクル (推奨条件)



マウステールライセート (アルカリ溶解法) を用いた直接PCR

### プロトコール マウステール②

#### 【Proteinase K法】



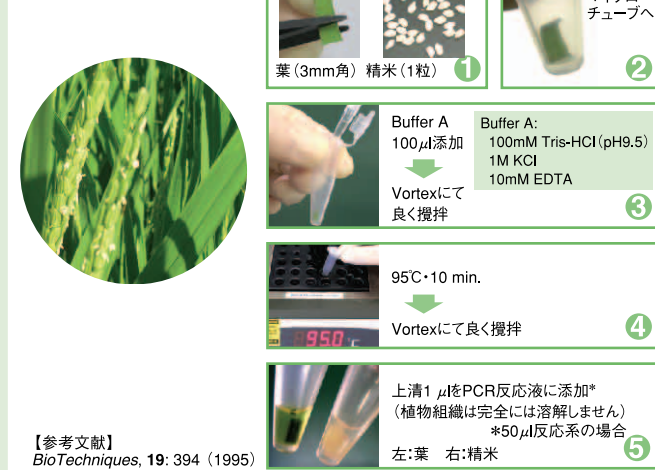
【結果】 クールドサンプル対応A社高効率PCR酵素  
**KOD FX** 2ステップサイクル 3ステップサイクル (推奨条件)



マウステールライセート (Proteinase K法) を用いた直接PCR

### プロトコール 植物 (トランスジェニック植物)

#### 【ワンステップ法】



【参考文献】 BioTechniques, 19: 394 (1995)

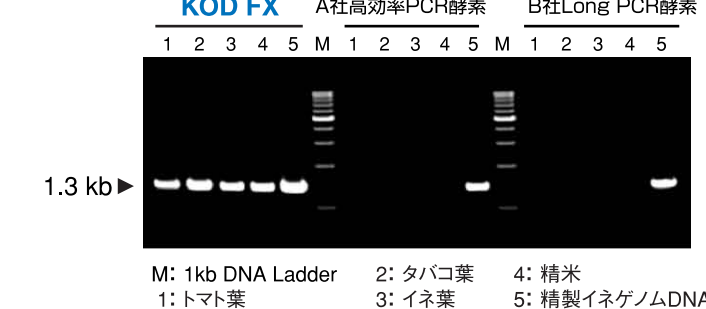
#### 【ターゲット】

rbcl (1.3kb)

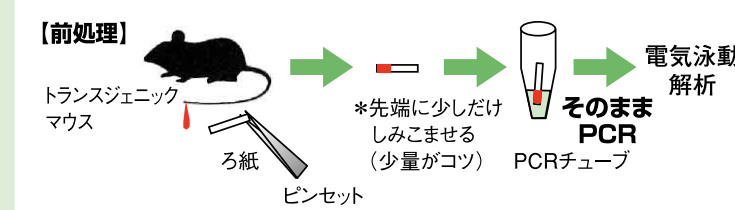
#### 【サイクル】

2ステップサイクル (30サイクル)

#### 【結果】



### プロトコール マウステール③



【データご提供】名古屋市立大学 医科学研究科 細胞分子生物 金澤智先生

#### 【先生からのコメント】

KOD FXは、短時間の反応時間で効率よくトランスジーンを検出した。また、positive control (Lane 4,9) およびnegative control (Lane 5,10) でも検出感度が良好で、false posiも出なかった。今後、トランスジェニックマウスの管理の際のトランスジーン検出に使用することにします。

#### 【基本反応条件】

滅菌蒸留水	X $\mu\text{l}$
2x PCR buffer for KOD FX	25 $\mu\text{l}$
2mM dNTPs	10 $\mu\text{l}$ (0.4mM)
10pmol / $\mu\text{l}$ Primer F	1.5 $\mu\text{l}$ (0.3 $\mu\text{M}$ )
10pmol / $\mu\text{l}$ Primer R	1.5 $\mu\text{l}$ (0.3 $\mu\text{M}$ )
KOD FX (1.0U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$ (1U)
Genomic DNA	~200ng
Plasmid DNA	~50ng
cDNA	~200ng (RNA相当)
クールドサンプル	0.5~2 $\mu\text{l}$ *
Total	50 $\mu\text{l}$

#### ！注意

\*この量は初めて実験する際の目安です。ワンステップ法の植物ライセートは~1  $\mu\text{l}$ 、血液は~4  $\mu\text{l}$ 、哺乳類培養細胞は~2x10<sup>4</sup>細胞が適量であることが分かっています。  
\*\*プライマーのTm値が73°C未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

#### 【2ステップサイクル】\*\*

94°C	2 min.
98°C	10 sec.
68°C	1 min./kb

#### 【ステップダウンサイクル】\*\*

94°C	2 min.
98°C	10 sec.
74°C	1 min./kb
98°C	10 sec.
72°C	1 min./kb
98°C	10 sec.
70°C	1 min./kb
98°C	10 sec.
68°C	1 min./kb
68°C	7 min.

#### 【3ステップサイクル】

94°C	2 min.
98°C	10 sec.
68°C	1 min./kb

## FAQコーナー

**Q1** プライマー設計などに関して何かコツはありますか？

**A1** クールドサンプルからのPCRには2ステップもしくはステップダウンPCRが特に有効な場合があります。その場合、プライマーのTm値は72°C以上に設定してください。10kbを超える長いターゲットの増幅には、通常より長め(27mer以上)にプライマーを設計して特異性を上げると共に、アニーリング(及び伸長反応)を比較的高い温度に設定することでより良い結果を得ることができます。特に、ステップダウンサイクルでの増幅が有効です。また、脱塩グレードなどの精製度の低いプライマーを用いるとスミアや非特異増幅の原因となることがある

ため、カートリッジ精製、もしくはHPLC精製グレードのプライマーのご使用をお薦めします。

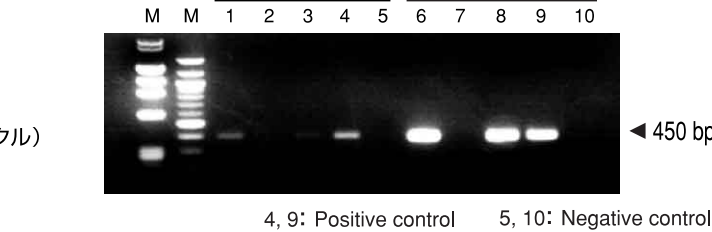
**Q2** マルチプレックスPCRに応用したいのですが、コツはありますか？

**A2** プライマーを等モルで添加した場合、どちらかの増幅産物が増幅しすぎてしまうことがあります。その場合、添加するプライマー量の比を検討してください。一般的には、増幅の悪かった方のターゲットのプライマー量を1.5倍程度に増やし、サイクル数を若干少なくする方向で検討することで良好な結果が得られることがあります。

#### 【ターゲット】

CIITA 450bp

#### 【結果】



#### 【サイクル】

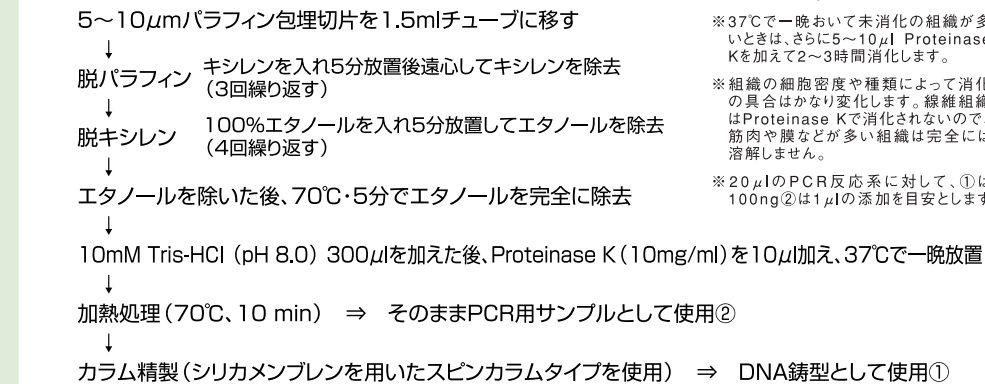
3ステップサイクル (30サイクル)

### プロトコール ホルマリン固定組織

#### 【サンプル】

ホルマリン固定パラフィン包埋材料 (ヒト)  
(今回使用した切片は厚さ約10  $\mu\text{m}$  で、大きさは1 cm x 2 cm程度)

#### 【前処理】

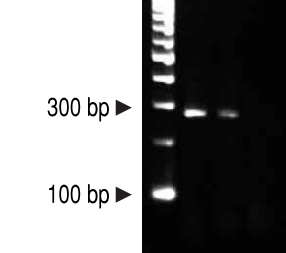


#### 【サイクル】

94°C	15 min*
98°C	10 sec
57°C	30 sec
68°C	30 sec

\*ホルマリン固定組織から得られたDNAの増幅では、最初の变性ステップを7~15分程度に設定することで良好な結果を得ることができます。

#### 【結果】



#### 【ターゲット】

$\beta$ -globin (268bp)

【データご提供】福岡大学 医学部 病理学講座 石黒晶子先生、竹下盛重先生、福重智子先生

#### 【先生からのコメント】

他社のポリメラーゼを用いた場合、精製DNAを用いても増幅できない検体が多かった。一方、KOD FXを用いることで精製DNA及び、Proteinase K処理後のパラフィン包埋材料のライセートから高効率にPCR産物を得ることができた。小さな組織の場合、精製するとDNAがより少なくなるので、精製しないでPCRに使えるのが良い。