



Code No. KME-101

保存温度 -20℃

マルチプレックス PCR・バイサルファイト処理 DNA 用高正確性 PCR 酵素

KOD -Multi & Epi-[®]

KOD -Multi & Epi-[®]は、遺伝子改変型 KOD DNA polymerase (UKOD) を用いて開発された高正確性 PCR 用酵素です。この改変により、今まで困難だったウラシルを多く含む鋳型やイノシンを含むプライマーなどを用いることができるようになりました。更に、伸長アクセラレーター等の添加により、伸長性が向上することで配列や増幅サイズなどによる増幅バイアスを受けにくくなりました。

よって、KOD -Multi & Epi-[®]は、マルチプレックス PCR やバイサルファイト処理後の DNA の増幅（エピジェネティクス解析）、メタゲノム解析など様々な用途に用いることが可能です。また、本酵素は Taq polymerase の約 11 倍の正確性を示すため、得られた増幅産物はクローニングを介した従来のシーケンス解析や次世代シーケンスなどに幅広く用いることが可能です。

本酵素には、Polymerase 活性と 3'→5'Exonuclease 活性を抑える 2 種類のモノクローナル抗体が混合されており、簡便に特異性の高い Hot start PCR を行うことができます。

特長

● 均一な増幅 (低バイアス)

1 kb 以下の短鎖のターゲットから 10 kb 前後の長鎖のターゲットまでの幅広い範囲で特異的かつ均一なマルチプレックス PCR を行うことができます。GC の偏りによる増幅への影響を最小限に抑えており、ゲノムやトランスクリプトームの様々な領域を均一に増幅することが可能です。

この特性を活かし、次世代シーケンサー解析に使用する増幅産物の調製にも使用することができます。

● ウラシルを多く含む DNA からの増幅

バイサルファイト処理後のウラシルを多く含む DNA から高い効率で増幅を行うことができます。最大で約 1.5 kb の増幅を確認しています。

● イノシンやウラシルを含むプライマーに対応

従来の高正確性 PCR 酵素では、イノシンやウラシルを含むプライマーを用いる解析が困難でしたが、KOD -Multi & Epi-[®]はそれらのプライマーを用いて解析することができます。

● 高正確性

Taq polymerase の約 11 倍の正確性 (KOD FX Neo と同等) を示し、増幅産物を様々な用途に用いることができます。

● クールドサンプルに対応

クールドサンプルの影響を受けにくく、血液検体を用いたマルチプレックス PCR の他、動植物のライセートからのジェノタイピングや土壌、食品サンプルなどからの増幅などにも用いることが可能です。

● 高効率

伸長アクセラレーターを添加することで PCR 効率が向上し、シングルプレックス PCR では伸長時間を最短で 15 sec./ kb まで短縮することが可能です。

※クールドサンプルやバイサルファイト処理を行った DNA サンプルを用いる場合や長鎖のマルチプレックス PCR を行う場合は、効率を優先するため 30~60 sec./ kb を推奨する場合があります。

目次

1. 内容物	③
2. 安全上の注意	③
3. プライマーの準備	③
(1) シングルプレックス PCR のプライマーの設計について	③
(2) マルチプレックス PCR のプライマーの設計について	③
(3) バイサルファイト PCR プライマーの設計について	④
4. テンプレートについて	④
5. PCR プロトコール	⑤
(1) シングルプレックス PCR 反応条件	⑤
(2) マルチプレックス PCR 反応条件	⑦
(3) バイサルファイト処理 DNA を用いる PCR 反応条件	⑩
6. PCR をうまく行うために	⑫
7. PCR 産物の次世代シーケンサー (NGS) への対応について	⑫
8. PCR 産物のクローニングについて	⑫
9. 実施例について	⑫
10. トラブルシューティング	⑬
(1) シングルプレックス PCR	⑬
(2) マルチプレックス PCR	⑭
(3) バイサルファイト処理 DNA を用いる PCR	⑮
11. 関連商品	⑯

1. 内容物

	KME-101
KOD -Multi & Epi- [®] (1.0 U/μl)	200 μl × 1 本
2 × PCR Buffer for KOD -Multi & Epi- ^{®*1}	1.7 ml × 3 本

*1 2 × PCR Buffer for KOD -Multi & Epi-[®]には dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) および Mg²⁺ (終濃度 2.0 mM) が含まれています。

2. 安全上の注意

本製品は、研究用試薬です。診断および臨床検査用試薬として使用しないでください。また、本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。関係する実験において、人体に有害な試薬を扱う場合も予想されます。各試薬に添付されている注意書き、機器・器具に添付されている取扱説明書の指示を順守し、必要に応じて適切な保護具をご使用いただきますようお願いいたします。

3. プライマーの準備

(1) シングルプレックス PCR のプライマーの設計について

- ・ プライマーは可能な限り、22~35mer 程度 (Tm 値^{*1} > 60°C) のものをご使用ください。
- ・ GC 含量を 45~60% で設計してください。また、GC の偏りを確認してください。GC が 3' 端領域に偏っているものでは、スミア、エキストラバンドが出やすくなります (5' 側の半分は 60~70%, 3' 側の半分は 40~50% の GC 含量で作製するのが理想です)。
- ・ 3' 末端を G か C で設計することでプライミング効率を高めることができます。ただし、前述したように 3' 端領域に GC が偏りすぎるとスミア、エキストラバンドが出やすくなるので注意してください。
- ・ 分子内二次構造や、プライマーダイマーの形成が起こらないように注意して設計してください。
- ・ 長鎖ターゲットを増幅する場合は、25~35mer 程度で Tm 値が 65°C 以上のプライマーをご使用ください。25mer 以上 (Tm 値 ≥ 65°C) のプライマーを用いることで成功率が向上することがあります。
- ・ 従来の高正確性 PCR 酵素では使用できなかったイノシン^{*2} やウラシル^{*3} を含むプライマーを使用することができます。メタゲノム解析などの用途に使用いただけます。

*1 プライマーの Tm 値の計算には、最近接塩基対法 (Nearest Neighbor method) をお使いください。本取扱説明書記載のプライマーの Tm 値は、Na⁺ 濃度を 50 mM、プライマー濃度を 0.5 μM として計算した値を利用しております。

弊社では、最近接塩基対法 (Nearest Neighbor method) に基づく Tm 計算プログラムを公開しています。弊社のライフサイエンス事業部のウェブページ (<http://www.toyobo.co.jp/bio/>) の本製品のワンポイントアドバイスのリンクからダウンロードしてご利用いただけます。

*2 最近接塩基対法 (Nearest Neighbor method) を用いてイノシンを含むプライマーの Tm 値を計算することはできません。ミスマッチを含むプライマーと同様に、イノシンを除いた配列で大まかな Tm 値を求め、その値を参考に最適条件を検討してください。

*3 ウラシルを含むプライマーの Tm 値を計算する場合、ウラシル (U) をチミン (T) として計算してください。

(2) マルチプレックス PCR のプライマーの設計について

- ・ プライマー設計は上記 (1) の設計に基づいて設計してください。
- ・ マルチプレックス PCR で使用する前に、シングルプレックス PCR にて特異性と増幅効率をお確かめくだ

- さい（その際、マルチプレックス PCR のサイクルで検討することをお勧めします）。
- ・可能な限り、各プライマーペアの Tm 値の差が大きにならないように設計を行ってください。
 - ・プライマーペア間で相補的な配列を形成しないように設計してください。

(3) バイサルファイト PCR プライマーの設計について

バイサルファイト変換後ではメチル化されていないシトシンがウラシルに変換されているため、プライマー設計が設計ソフトなしでは困難な場合があります。そのため、バイサルファイト処理後の配列に対するプライマー設計は上記（1）の設計に基づいて、専用の設計ツールを利用することを推奨します。フリーのオンラインツールとしては MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) などを推奨します。

4. テンプレートについて

以下のようなテンプレートを使用することができます。一般的なテンプレート量は表を参照してください（PCR反応液50μlの場合）。

		一般的なテンプレート量	
Genomic DNA	真核生物由来DNA	5~200 ng	50 ng
	原核生物由来DNA	0.1~100 ng	10 ng
Plasmid DNA		10 pg~50 ng	1 ng
cDNA		~200 ng (RNA相当量)	50 ng (RNA相当量)
バイサルファイト処理したDNA ^{*1}		~200 ng	50 ng
クルードサンプル（血液、各種ライセート等） ^{*2}			

- ・テンプレートの長さや純度は PCR の結果に大きく影響します。テンプレートの量に余裕のある場合は、事前に電気泳動解析を行い、品質を確認することをお勧めします。本酵素は RNA が多量に混入した場合、PCR 反応が阻害を受ける場合があります。
- ・逆転写反応液をテンプレートとして用いる場合、逆転写反応液中の過剰の RNA が PCR 反応を阻害することがあります。PCR 反応液 50 μl に対する逆転写反応液の添加量は、RNA 量として 200 ng 以下でお試ください。

*1 様々なバイサルファイト処理試薬が販売されていますが、変換効率やDNAに及ぼす断片化の影響が異なるようです。シーケンス解析において変換効率が低い場合、人工的にメチル化されたDNAをポジティブコントロールとしてバイサルファイト処理に使用し、バイサルファイト試薬の変換効率をお確かめください。

*2 KOD FX、KOD FX Neo と同じサンプルを使用することができます。サンプル調製および添加量については KOD FX Neo の取扱説明書 (http://lifescience.toyobo.co.jp/user_data/pdf/products/KFX-201.pdf) をご参照ください。

5. PCR プロトコール

(1) シングルプレックス PCR 反応条件

ヒトゲノム DNA をテンプレートとして約 40 kb までターゲットを増幅することができます。

a. PCR 反応液の調製

反応液を調製する前に各試薬を十分攪拌してご使用ください。凍結している試薬は完全に融解してください。

Components	Volume	Final Concentration
Autoclaved, distilled water	X μ l	
2 \times PCR Buffer for KOD -Multi & Epi- ^{*1}	25 μ l	1 \times
Primer	Y μ l	0.3 μ M each ^{*2}
テンプレート	Z μ l	Genomic DNA ~200 ng/50 μ l Plasmid DNA ~50 ng/50 μ l cDNA ~200 ng/50 μ l 生体試料・粗抽出液 ~5 μ l/50 μ l
KOD -Multi & Epi- [®] (1.0 U/ μ l)	1 μ l	1.0 U/50 μ l
Total	50 μ l	

・全ての液を添加した後、反応液をボルテックス等で十分攪拌してサーマルサイクラーにセットしてください。

*1 2 \times PCR Buffer for KOD -Multi & Epi-[®]にはdNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) およびMg²⁺ (終濃度2.0 mM) が含まれています。

オプション

*2 非特異増幅あるいはスメアが生じる場合、プライマー濃度を0.1 μ M (終濃度) まで段階的に減らして検討してください。
縮重プライマーを使用する場合、縮重度が高くなるとプライマー1種類あたりのモル数が少なくなります。縮重度の割合に合わせて濃度を最大3.0 μ M (終濃度) まで上げることにより感度を向上させることができます。

b. PCR サイクル条件

PCR のサイクル条件は、プライマーの Tm 値によって異なります。プライマーの Tm 値が 65°C 以下の場合、3 ステップサイクルをお試しください。プライマーの Tm 値が 65°C を超える場合、2 ステップサイクルをお試しください。

オプション

非特異増幅あるいはスメアが認められた場合は、Tm 値が 65°C 以下でも 2 ステップをお試しください。

3 ステップサイクル [プライマーの Tm 値が 65°C 以下の場合]

Pre-denature :	94°C, 2 min.	} 30 cycles ^{*2}
Denature :	98°C, 10 sec.	
Annealing :	Tm°C ^{*1} , 10 sec.	
Extension :	68°C, 時間は表1を参照	

2ステップサイクル [プライマーの Tm 値が 65°Cを超える場合]

Pre-denature : 94°C, 2 min.
 Denature : 98°C, 10 sec.
 Extension : 68°C, 時間は表1を参照

← 30 cycles*2

表1 伸長時間の目安

	精製DNA (Genomic DNA・Plasmid DNA・cDNA)		クールドサンプル (生体試料・粗抽出液)
	GCクラスター*3を含まない ターゲット	GCクラスター*3を含む ターゲット	
Extension	15 sec./ kb*4	30 sec./ kb	60 sec./ kb

*3 GCクラスターはGC含量70%以上の領域が400 bp以上ある領域を意味します。

*4 2ステップサイクルではプライマーのアニーリングを十分に行うために、ターゲット鎖長にかかわらず伸長時間を30 sec.以上に設定してください。

また、縮重プライマーを用いる場合は、アニーリングを十分に行うためにアニーリング時間を30 sec.に設定した方が良好な結果が得られることがあります。

オプション

*1 増幅が弱い場合は Tm~Tm-5°Cまでの間で検討してください。

*2 通常は30 cyclesで十分な増幅が得られます。増幅量が少ない場合は40 cyclesまで増やすことができます。

・ターゲットのコピー数が少ないと予想される場合や10 kbを超えるターゲットの場合、伸長時間を60 sec./ kbに延長することで増幅量が増加することがあります。

(例) Tm値とターゲット鎖長を考慮したサイクル条件設定の仕方

プライマーTm値 ≤ 65°C : 3ステップサイクル

ターゲット鎖長 : 500 bp

94°C, 2 min.
 98°C, 10 sec. ← 30 cycles
 60°C, 10 sec. ←
 68°C, 8 sec. ←
 4°C, hold

ターゲット鎖長 : 1 kb

94°C, 2 min.
 98°C, 10 sec. ← 30 cycles
 60°C, 10 sec. ←
 68°C, 15 sec. ←
 4°C, hold

ターゲット鎖長 : 5 kb

94°C, 2 min.
 98°C, 10 sec. ← 30 cycles
 60°C, 10 sec. ←
 68°C, 75 sec. ←
 4°C, hold

プライマーTm値 > 65°C : 2ステップサイクル

ターゲット鎖長 : 500 bp

94°C, 2 min.
 98°C, 10 sec. ← 30 cycles
 68°C, 30 sec. ←
 4°C, hold

ターゲット鎖長 : 1 kb

94°C, 2 min.
 98°C, 10 sec. ← 30 cycles
 68°C, 30 sec. ←
 4°C, hold

ターゲット鎖長 : 5 kb

94°C, 2 min.
 98°C, 10 sec. ← 30 cycles
 68°C, 75 sec. ←
 4°C, hold

(2) マルチプレックス PCR 反応条件

ヒトゲノム DNA をテンプレートとして約 10 kb までの複数のターゲットを安定に増幅することができます。

a. PCR 反応液の調製

反応液を調製する前に各試薬を十分攪拌してご使用ください。凍結している試薬は完全に融解してください。

Components	Volume	Final Concentration
Autoclaved, distilled water	X μ l	
2 \times PCR Buffer for KOD -Multi & Epi- ^{®*1}	25 μ l	1 \times
Primer	Y μ l	0.3 μ M each ^{*2}
テンプレート	Z μ l	<ul style="list-style-type: none"> Genomic DNA ~200 ng/50 μl Plasmid DNA ~50 ng/50 μl cDNA ~200 ng/50 μl 生体試料・粗抽出液 ~5 μl/50 μl
KOD -Multi & Epi- [®] (1.0 U/ μ l)	1 μ l	1.0 U/50 μ l
Total	50 μ l	

・全ての液を添加した後、反応液をボルテックス等で十分攪拌してサーマルサイクラーにセットしてください。

*1 2 \times PCR Buffer for KOD -Multi & Epi-[®]にはdNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) およびMg²⁺ (終濃度2.0 mM) が含まれています。

オプション

*2 非特異増幅あるいはスミアが生じる場合、プライマー濃度を0.1 μ M (終濃度) まで段階的に減らして検討してください。

他のターゲットと比較し増幅効率の低いターゲットに対してプライマー濃度を高めることで均一性が改善されることがあります。また、増幅効率の高いターゲットに対してプライマー濃度を下げることで均一性が改善されることがあります。

また、市販のマルチターゲット用プライマーセットを用いる場合は取扱説明書に従ってください。

b. PCR サイクル条件

マルチプレックス PCR のサイクル条件は、プライマーの Tm 値によって異なります。プライマーの Tm 値が 65 $^{\circ}$ C 以下の場合、3 ステップサイクルをお試しください。プライマーの Tm 値が 65 $^{\circ}$ C を超える場合、2 ステップサイクルをお試しください。

3 ステップサイクル [プライマーの Tm 値が 65 $^{\circ}$ C 以下の場合]

Pre-denature :	94 $^{\circ}$ C, 2 min.	
Denature :	98 $^{\circ}$ C, 10 sec.	} 25 cycles ^{*2}
Annealing :	Tm $^{\circ}$ C ^{*1} , 30 sec.	
Extension :	68 $^{\circ}$ C, 時間は表2を参照	

2 ステップサイクル [プライマーの Tm 値が 65°C を超える場合]

Pre-denature : 94°C, 2 min.
 Denature : 98°C, 10 sec.
 Extension : 68°C, 時間は表2を参照

} 25 cycles*2

*1 使用するプライマーのうち最も Tm 値が低いプライマーを基準としてアニーリング温度を設定してください。

オプション

- *1 非特異増幅あるいはスミアが認められた場合は、基準とした Tm ~ Tm + 5°C の範囲で検討してください。増幅が確認できないターゲットがある場合は、基準とした Tm ~ Tm - 5°C の範囲で検討してください。
- *2 通常は 25 cycles で十分な増幅が得られます。増幅量が少ない場合は 40 cycles まで増やすことができます。

表2 伸長時間の目安

ターゲット数	短鎖ターゲット(≤1 kb)		長鎖ターゲット(1 kb~10 kb)	
	10未満	10以上	10未満	10以上
Extension 3ステップサイクル	15~30 sec.	30~60 sec.	30 sec./ kb 最も長いターゲットを 基準	30~60 sec./ kb 最も長いターゲットを 基準
Extension 2ステップサイクル	30 sec	30~60 sec.	30 sec./ kb 最も長いターゲットを 基準	30~60 sec./ kb 最も長いターゲットを 基準

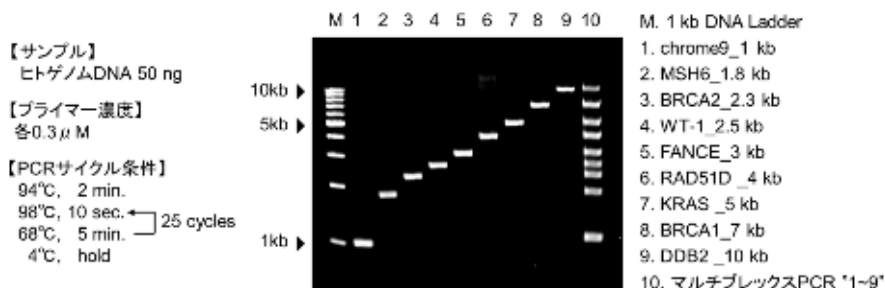
- ・ 2ステップサイクルではプライマーのアニーリングを十分に行うために、ターゲット鎖長にかかわらず伸長時間を 30 sec. 以上に設定してください。
- ・ クールドサンプルから増幅する場合、すべての場合において 60 sec./ kb で設定してください。

オプション

クールドサンプルから増幅する場合、ターゲット数が増えると効率が落ちることがあります。その場合、精製した DNA をご使用ください。

c. 実施例 1

下記に記載しますプライマーペアを使用し、1 kb から 10 kb までのターゲット長のシングルプレックス PCR およびマルチプレックス PCR を行いました。その結果、マルチプレックス PCR はシングルプレックス PCR と同等の効率で特異的かつ均一な増幅を示しました。



プライマー	配列	bp	Tm(°C)	GC(%)	増幅サイズ
Chromosome9_1 kb_F primer	GAATTCCATATCTTTGCCAAACACTTGGTG	30	72.1	40.0	1 kb
Chromosome9_1 kb_R primer	CCATGGGAAATGTGTTGAAGAAAACAAAGTG	31	73.5	38.7	
MSH6_1.8 kb_F primer	CAGAAGAGGAAGAAGAGATGGAGGT	25	65.9	48.0	1.8 kb
MSH6_1.8 kb_R primer	GGAGGTAAGAAGAGACAGGCAAAGT	25	65.7	48.0	
BRCA2_2.3 kb_F primer	CAGGTCTTAACCTAGCAGAGGAGGT	25	65.7	52.0	2.3 kb
BRCA2_2.3 kb_R primer	GGTTGGTCTGCCTGTAGTAATCAAG	25	65.5	48.0	
WT-1_2.5 kb_F primer	GAGGTCGAGCCACTCTTTATTACG	24	65.7	50.0	2.5 kb
WT-1_2.5 kb_R primer	TCTGACTCCCTTCGTCTAGTCTCTG	25	66.0	52.0	
FANCE_3 kb_F primer	CAGTCTTCGTTAGATATCCTGAGC	25	64.9	48.0	3 kb
FANCE_3 kb_R primer	CTTCTGCCTAGATCTCCAGAGGATT	25	65.8	48.0	
RAD51D_4 kb_F primer	ACAGTGAGACGTGAGACCCCTATCTC	25	65.7	52.0	4 kb
RAD51D_4 kb_R primer	CACAAATCTATTGCCCTGATAGCAT	25	65.7	40.0	
KRAS_5 kb_F primer	CTTCCTGTGGGCTAGAGATACACTG	25	65.9	52.0	5 kb
KRAS_5 kb_R primer	CAAGCAACTAAGGTGAGTGAAGAG	25	66.0	48.0	
BRCA1_7 kb_F primer	GCCCTTTAAGCAAAGACAGTAGTCC	25	65.8	48.0	7 kb
BRCA1_7 kb_R primer	CATCTCTGTCTGGTCAATCCCTTAC	25	65.7	48.0	
DDB2_10 kb_F primer	GCAGCAATAGTGGAAGACTGGTTAC	25	65.7	48.0	10 kb
DDB2_10 kb_R primer	GCTAGAGCCACCATTAGACTCAGAC	25	65.2	52.0	

(3) バイサルファイト処理 DNA を用いる PCR 反応条件

バイサルファイト処理したDNAをテンプレートとして約1.5 kbまでのターゲットを増幅することができます。

a. PCR 反応液の調製

反応液を調製する前に各試薬を十分攪拌してご使用ください。凍結している試薬は完全に融解してください。

Components	Volume	Final Concentration
Autoclaved, distilled water	X μ l	
2× PCR Buffer for KOD -Multi & Epi- [®] *1	25 μ l	1×
Primer	Y μ l	0.3 μ M each*2
バイサルファイト処理 DNA	Z μ l	~200 ng/50 μ l
KOD -Multi & Epi- [®] (1.0 U/ μ l)	1 μ l	1.0 U/50 μ l
Total	50 μ l	

・全ての液を添加した後、反応液をボルテックス等で十分攪拌してサーマルサイクラーにセットしてください。

*1 2× PCR Buffer for KOD -Multi & Epi-[®]にはdNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) およびMg²⁺ (終濃度2.0 mM) が含まれています。

オプション

*2 非特異増幅あるいはスメアが生じる場合、プライマー濃度を0.1 μ M (終濃度) まで段階的に減らして検討してください。

b. PCR サイクル条件

PCRのサイクル条件は、下記の3ステップサイクルを推奨します。

Pre-denature :	94°C, 2 min.	} 40 cycles*3
Denature :	98°C, 10 sec.	
Annealing :	T _m °C, 30 sec.*1	
Extension :	68°C, 時間は表3を参照*2	

表3 伸長時間の目安

	500 bp未満	500~1000 bp未満	1000 bp以上
Extension	15 sec.	30 sec.	30 sec./ kb

オプション

*1 増幅が見られない場合はT_m~T_m-5°Cの間で検討してください。

*2 増幅が見られない場合は伸長時間をさらに2倍程度まで延長してください。

*3 非特異増幅あるいはスメアが生じる場合、サイクル数を40サイクルから30~35サイクル程度に減らして検討してください。

c. 実施例2

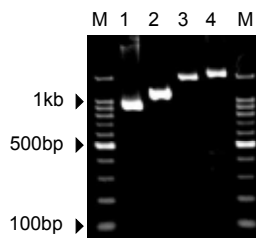
バイサルファイト処理を行った Jurkat 細胞由来のメチル化 DNA を鋳型として、917 bp~1583 bp のターゲットの増幅を行いました。その結果、KOD -Multi & Epi[®]は 1583 bp までのターゲットについて良好な結果を示しました。

【バイサルファイト処理方法】
EpiTect[®] Fast DNA Bisulfite Kit (QIAGEN社)

【プライマー濃度】
各0.3 μM

【バイサルファイト処理DNA】
55 ng /反応

【PCRサイクル条件】
94°C, 2 min.
98°C, 10 sec. ← 40 cycles
60°C, 30 sec.
68°C, 30 sec./ kb
4°C, hold



M. 100 bp DNA ladder
1. TGFβ 917 bp (AT含有率*1 69.9%)
2. BRCA2 1134 bp (AT含有率*1 63.9%)
3. APOE 1487bp (AT含有率*1 69.1%)
4. TGFβ 1583 bp (AT含有率*1 61.8%)
*1 AT含有率はバイサルファイト処理後の割合を表します

プライマー	配列	bp	Tm(°C)	GC(%)	増幅サイズ
TGF β 917 bp_F	TGGATTTTAAAGTTTTAGTTTTTTTAGG	29	61.6	20.7	917 bp
TGF β 917 bp_R	CAACTACTTCCAACCTCCCATAATA	25	62.8	40.0	
BRCA2_1134 bp_F	GGGGAATAGGTTTTGAGAGAATATT	25	62.2	36.0	1134 bp
BRCA2_1134 bp_R	ATACCACTAACCACATTAACACTC	25	58.8	36.0	
APOE_1487 bp_F	GGTTTTTTTAAAGTAGGGTGGTTTG	24	62.3	37.5	1487 bp
APOE_1487 bp_R	TCAAAAACCAATTTCTCTTTATC	25	62.0	28.0	
TGF β 1583 bp_F	TTGGAGAAAGTTGATTTAGAGTTTG	25	61.3	32.0	1583 bp
TGF β 1583 bp_R	CAACTACTTCCAACCTCCCATAATA	25	62.8	40.0	

6. PCR をうまく行うために
 - ・ 反応チューブはできるだけ thin-wall タイプのものをご使用ください。また、PCR 反応液量は total 50 μ l にすることをお薦めします。
 - ・ 滅菌水、プライマーは事前に小分け分注を行って保存し、都度使い切りにすることをお薦めいたします。
7. PCR 産物の次世代シーケンサー（NGS）への対応について
 - ・ PCR 産物を次世代シーケンサー（NGS）に使用する際はライブラリー調製キットの取扱説明書に従って精製などを行い、テンプレートの調製を行ってください。
8. PCR 産物のクローニングについて
 - ・ 本製品で増幅した PCR 産物の末端形状は、blunt end（平滑末端）になっています。従って、PCR 産物をクローニングする場合には、あらかじめリン酸化したプライマーを用いるか、PCR 産物の末端をリン酸化した後、blunt end を利用したクローニングを行ってください。TA クローニングを行う場合には、弊社 KOD DNA Polymerase 用 TA クローニングキット「TArget Clone™-Plus- (Code No. TAK-201)」を用いることにより、未精製 PCR 産物を用いて、簡便に TA クローニングを行うことができます。また、TArget Clone™-Plus-のパーツ別売品である「10× A-attachment Mix (Code No. TAK-301)」を用いることで、PCR 産物の 3'末端に A を付加することができ、そのまま任意の T ベクターに PCR 産物をクローニングすることができます。その際のライゲーション試薬としては、TA クローニングに優れる「Ligation high Ver. 2 (Code No. LGK-201)」をお薦めします。
 - ・ 本製品で増幅した PCR 産物を制限酵素にて処理し、その突出末端を利用してクローニングを行う場合には、制限酵素処理前に増幅産物の精製を行ってください。DNA Polymerase が残存している場合、本酵素の持つ 3'→5' Exonuclease 活性により制限酵素処理中に突出末端が削られる可能性があります。増幅産物の精製は、フェノール/クロロホルム処理を行った後、エタノール沈殿を行うか、弊社の磁性ビーズを利用した DNA 精製キット「MagExtractor™-PCR & Gel Clean up- (Code No. NPK-601)」を利用すると便利です。
9. 実施例について
ライフサイエンス事業部のウェブページ (<http://www.toyobo.co.jp/bio/>)に掲載しております。

10. トラブルシューティング

(1) シングルプレックス PCR

問題	対策	具体例・目安
増幅が見られない。 増幅産物が少ない。	サイクル条件を変更する。	伸長時間を 60 sec./kb に延長する。
		サイクル数を 2~5 サイクル増やす。
		3 ステップサイクルで行う。 アニーリング温度を下げて Tm から Tm-5°C の間で検討する。
		縮重プライマーを使用している場合、アニーリング時間を 10 sec. から 30 sec. に伸ばす。
	使用しているテンプレートの量、品質を確認する（特に、テンプレートに過剰の RNA 等がコンタミしていないか確認する）。	テンプレートの量を増やす。
		テンプレートの調製法を検討する。
		テンプレートを精製する。
		RNA による阻害をなくすため、cDNA サンプル量を減らす。 RNA を分解もしくは除去する。
	使用しているプライマーの量、品質を確認する。	プライマー濃度を 0.3 μM から 0.1 μM（終濃度）まで段階的に減らして検討する（特に 10 kb 以上の長鎖ターゲットで有効な場合がある）。
		縮重プライマーを使用している場合はプライマー濃度を上げる。[5.(1)オプション参照]
		プライマーを再調製、再合成する。
	プライマー配列を変更する。	プライマーを再設計する。[3.(1) 参照]
使用酵素量を増やす。	標準 1.0 U を 1.5~2.0 U に増やす。	
スミア、エキストラバンドが見られる。	サイクル条件を変更する。	3 ステップサイクルで行っている場合、2 ステップサイクルに変更する。
		サイクル数を 2~5 サイクル程度減らす。
	使用しているテンプレートの量を確認する。	テンプレートの量を減らす。
	使用しているプライマーの量、品質を確認する。	プライマーを再調製、再合成する。
		プライマー濃度を 0.1 μM（終濃度）まで段階的に減らして検討する。
プライマー配列を変更する。	プライマーを再設計する（長めのプライマーを設計するとスミア、エキストラバンドが解消する場合がある）。[3.(1) 参照]	
使用酵素量を減らす。	標準 1.0 U を 0.5~0.8 U に下げる。	
TA クローニングできない。	専用のキットを用いる。	専用 TA クローニングキット「TARget Clone™ -Plus-（Code No. TAK-201）」を用いる（KOD -Multi & Epi® の増幅産物の末端は平滑化されている）。

(2) マルチプレックス PCR

問題	対策	具体例・目安
増幅が見られない。 増幅産物が少ない。	サイクル条件を変更する。	伸長時間を 60 sec./kb に延長する。
		サイクル数を 2~5 サイクル増やす。
		3 ステップサイクルで行う。 3 ステップサイクルでアニーリング温度を 下げて Tm から Tm-5°C の間で検討する。
	使用しているテンプレートの量、 品質を確認する（特に、テンプレ ートに過剰の RNA 等がコンタ ミしてないか確認する）。	テンプレートの量を増やす。
		テンプレートの調製法を検討する。
		テンプレートを精製する。
		RNA による阻害をなくすため、cDNA サンプル 量を減らす。
RNA を分解もしくは除去する。		
使用しているプライマーの量、 品質を確認する。	プライマーを再調製、再合成する。 プライマーを再設計する。[3. (2) 参照]	
使用酵素量を増やす。	標準 1.0 U を 1.5~2.0 U に増やす。	
各ターゲットの増幅が 不均一である。	サイクル条件を変更する。	アニーリング温度を下げて Tm から Tm-5°C の 間で検討する。
	使用しているプライマーの量、 品質を変更する。	他のターゲットと比較し増幅効率の低いタ ーゲットに対してプライマー濃度を高める。 または、増幅効率の高いターゲットに対して プライマー濃度を下げる。
	プライマー配列を変更する。	使用するプライマーの Tm をなるべく揃える ようにする。
スミア、エキストラバンドが 見られる。	サイクル条件を変更する。	3 ステップサイクルで行っている場合、2 ステ ップサイクルに変更する。
		サイクル数を 2~5 サイクル程度減らす。
	使用しているテンプレートの量 を確認する。	テンプレートの量を減らす。
	使用しているプライマーの量、 品質を確認する。	プライマーを再調製、再合成する。 プライマー濃度を 0.1 μM（終濃度）まで段階 的に減らして検討する。
	プライマー配列を変更する。	プライマーを再設計する。[3. (2) 参照]
使用酵素量を減らす。	標準 1.0 U を 0.5~0.8 U に下げる。	

(3) バイサルファイト処理 DNA を用いる PCR

問題	対策	具体例・目安
増幅が見られない。 増幅産物が少ない。	サイクル条件を変更する。	伸長時間を 60 sec./kb に延長する。
		サイクル数を 2~5 サイクル増やす。
		アニーリング温度を下げて Tm から Tm-5°C の間で検討する。
	使用しているテンプレートの量、品質を確認する。	テンプレートの量を増やす(1 kb 以上のターゲットではより多くのテンプレートを必要とする)。
		バイサルファイト処理を行うキットを変更する。
		再度バイサルファイト処理した鋳型 DNA を調製する。
		使用しているプライマーの量、品質を確認する。
プライマーの配列を変更する。	プライマーを再設計する。[3. (3) 参照]	
使用酵素量を増やす。	標準 1.0 U を 1.5~2.0 U に増やす。	
スミア、エキストラバンドが見られる。	サイクル条件を変更する。	アニーリング温度を上げて Tm から Tm+5°C の間で検討する。
		サイクル数を 40 サイクルから 30~35 サイクル程度に減らす。
	使用しているテンプレートの量を確認する。	テンプレートの量を減らす。
	使用しているプライマーの量、品質を確認する。	プライマーを再調製、再合成する。
		プライマー濃度を 0.1 μM (終濃度) まで段階的に減らして検討する。
	プライマーの配列を変更する。	プライマーを再設計する。[3. (3) 参照]
使用酵素量を減らす。	標準 1.0 U を 0.5~0.8 U に下げる。	
変換効率が低い。	変換効率を確認する。	人工的にメチル化された DNA をポジティブコントロールとしてバイサルファイト処理に使用して確認する。
TA クローニングできない。	専用のキットを用いる。	専用 TA クローニングキット「TARget Clone™ -Plus- (Code No. TAK-201)」を用いる (KOD -Multi & Epi® の増幅産物の末端は平滑化されている)。

11. 関連商品

品名	包装	Code.No.
<KOD DNA Polymerase 用高効率 TA クローニングキット> TArget Clone™ -Plus-	10 回用	TAK-201
<TA クローニング用 A 付加試薬(KOD 用)> 10 × A-attachment Mix	25 μl × 1 本 (25 回用)	TAK-301



【製造・販売元】

—納期・注文に関するお問い合わせ—

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (大阪)

〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号

TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833

E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (東京)

〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目 17 番 10 号 住友商事京橋ビル

TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951

E-mail : order_lifescience@toyobo.jp