



## 取扱説明書

Code No. KOD-211  
Code No. KOD-211X5  
保存温度 -20℃

リライアビリティを向上させた高正確性 PCR 酵素

## KOD -Plus- Ver. 2

本製品は、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株由来の KOD DNA Polymerase を用いて開発された高正確性 PCR 用酵素です。本酵素は、Polymerase 活性の他、強い 3'→5' Exonuclease 活性 (Proof-reading 活性) を持つため Taq DNA Polymerase の約 80 倍という高い正確性を示します。本製品は従来の KOD -Plus- の PCR Buffer を改良することにより、優れた正確性はそのままに PCR 反応のリライアビリティ (成功率) を格段に向上させています。

本酵素は KOD -Plus- 同様、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 Hot start PCR を行うことができます。

- ・ **高いリライアビリティ** 増えにくい配列のターゲットや長いターゲットに対するリライアビリティ (PCR 成功率) が向上していますので、より確実に増幅産物を取得できます。
- ・ **RT 溶液持込による阻害を低減** KOD -Plus- に比べ、逆転写反応溶液の持込による阻害が低減しています。RT-PCR での増幅に向いています。
- ・ **高い正確性** Taq DNA Polymerase の約 80 倍という、従来の KOD -Plus- と同等の正確性を有しており、PCR 産物のクローニング等の用途に最適です。  
※KOD/KOD-Plus- 用 TA クローニングキット『TARget Clone™ -Plus-』(別売) をご用意しています。

KOD -Plus- Ver.2 は KOD -Plus- の反応 Buffer (10×Buffer for KOD -Plus-) を改良したものです。KOD -Plus- をお持ちの方は、別売の KOD -Plus- Ver.2 用 Buffer (Code No. KOD-3B) をご購入いただければ、KOD -Plus- Ver.2 の性能をお試しいただけます。

### 1. 内容物

	KOD-211 (200U×1本)	KOD-211X5
KOD -Plus- (1.0 U/μl)	200 μl×1本	(KOD-211)×5
10× Buffer for KOD -Plus- Ver.2	1ml×1本	
25mM MgSO <sub>4</sub>	1ml×1本	
2mM dNTPs	1ml×1本	

### 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。



<製品の内容・技術に関するお問合せ>  
東洋紡 (株) ライフサイエンス事業部 テクニカルライン  
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833  
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝日を除く)  
E-mail: tech\_osaka@toyobo.jp  
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>

### 3. 性能・品質

KOD-Plus-Ver.2 は、各ロットにおいて、HeLa total RNA の逆転写物を鋳型として DNA Polymerase ε cDNA 6.8kb の増幅ができたことを確認して出荷しております。

### 4. PCR プロトコール

#### (1) 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
10x Buffer for KOD-Plus-Ver.2	5 $\mu$ l	1x
2mM dNTPs	5 $\mu$ l	0.2mM each
25mM MgSO <sub>4</sub>	3 $\mu$ l	1.5mM
プライマー(10 $\mu$ M each)	1.5 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M each
テンプレート DNA	$\geq$ 1 $\mu$ l	Genomic DNA 10~200 ng/50 $\mu$ l Plasmid DNA 1~50 ng/50 $\mu$ l cDNA 5.-(7)の項参照
KOD-Plus- (1U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	1 U/50 $\mu$ l
Autoclaved, distilled water	to 50 $\mu$ l	

酵素液は最後に添加し、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。

#### (2) PCR サイクル条件

通常は以下の3ステップのサイクルを行ってください。T<sub>m</sub>の高い(65°C以上)プライマーを用いたPCRで、エキストラバンドが認められた場合は、2ステップのサイクルをお試しください。

3ステップ		2ステップ	
Pre-denature :	94°C, 2min.	Pre-denature :	94°C, 2min.
Denature :	98°C, 10sec.	Denature :	98°C, 10sec.
Annealing :	(T <sub>m</sub> -5)°C, 30sec.	Extension :	68°C, 1min. /kb
Extension :	68°C, 1min. /kb		

} 25~40 cycles
} 25~40 cycles

・伸長時間(Extension)は、ターゲット鎖長1kb あたり 1min.で設定してください。

### 5. 実験をうまく行うための注意事項

- (1) 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 反応液は total 50  $\mu$ l にすることをお薦めします。
- (2) 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。
- (3) dNTPs は必ず本製品添付のもの、あるいは弊社別売の「dNTPs Mixture(2mM)」(Code No. NTP-201)をご使用ください。
- (4) プライマーは GC 含量に偏りのない 22~34mer 程度(T<sub>m</sub> 値>60°C)のものをご使用ください。また、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。
- (5) 長鎖ターゲットを増幅する PCR では、T<sub>m</sub> 値が 65°C 以上のプライマーをご使用ください。
- (6) テンプレート DNA 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 DNA の量に余裕のある場合は、事前に電気泳動して品質を確認することをお薦めします。本酵素は RNA が多く混入する場合に、PCR 反応が阻害を受ける場合があります。

- (7) 逆転写反応液をテンプレート DNA として用いる場合、RT 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  $\mu$ l に添加する RT 反応液量は、RNA 量として 150ng 以下にすることをお勧めします。つまり、Total RNA 1  $\mu$ g を用いて 20  $\mu$ l の容量で RT 反応を行った場合、PCR 反応への添加量は 3  $\mu$ l 以下としてください。また、植物ゲノム DNA など、抽出方法によっては、多量の RNA が混入する可能性があります。RNA の混入を抑えるために、DNA サンプルの液量を少なくすることや DNA サンプルを RNase 処理することをお勧めいたします。
- (8) GC rich ターゲットでは、DMSO を終濃度 2~5% になるように添加すると、増幅が改善される場合があります。
- (9) DNA 変性条件を 94 $^{\circ}$ C, 15sec. で行うことによりターゲットの増幅量が増加することがあります。GC rich ターゲットでは、98 $^{\circ}$ C, 10sec. の変性条件としてください。
- (10) PCR のサイクル数は、テンプレート DNA の量に依存します。通常、ヒトゲノム DNA 50~200ng を用いた場合には 30~40 サイクルで良好な結果が得られます。
- (11) Colony Direct PCR を行う場合には、PCR 反応液への菌体の持込を少なくするようにご注意ください。菌体が肉眼で見えない程度で十分 PCR が可能です。
- (12) 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。PCR 産物をクローニングする場合には、blunt end を利用したクローニングを行ってください。また、弊社 KOD/KOD-Plus-用 TA クローニングキット TArget Clone<sup>TM</sup>-Plus-(Code No. TAK-201) を用いることにより、簡便に TA クローニングができます。

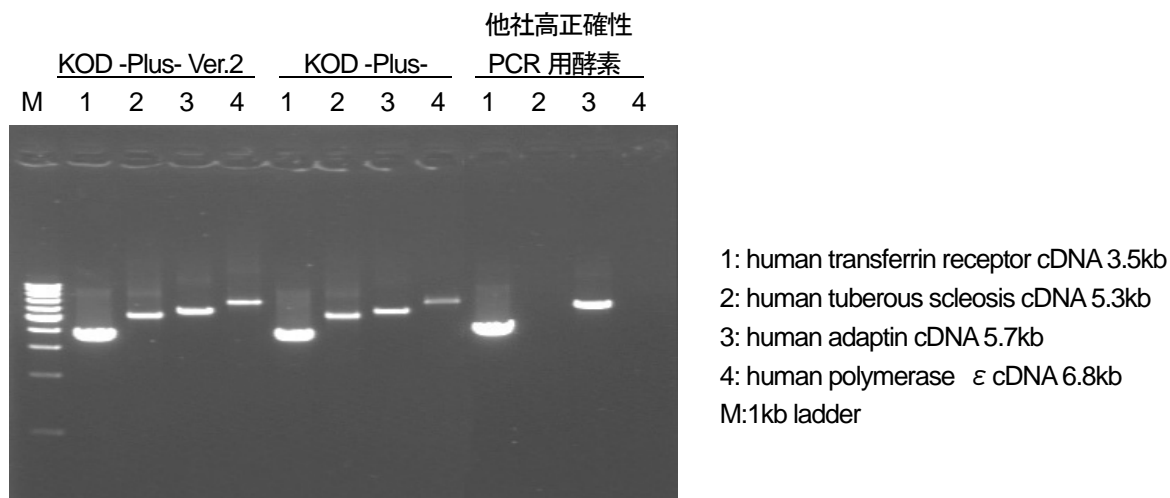
## 6. トラブルシューティング

問題	対策	具体例・目安
増幅産物が見られない 増幅産物が少ない	MgSO <sub>4</sub> 濃度を上げる。	標準 1.5mM を 2.0mM に上げる。
	アニーリング温度を下げる。	T <sub>m</sub> -10 $^{\circ}$ C に下げる。
	サイクル数を増やす。	+2~5 サイクル 増やす。
	テンプレート DNA の量を増やす。	
	使用酵素量を上げる。	標準 1U を 1.5~2.0U に上げる。
	使用しているテンプレート DNA, プライマーの品質を確認する。	特にテンプレート DNA に RNA 等がコタミしてないか確認する。
	GC rich ターゲットでは MgSO <sub>4</sub> 濃度を下げる。	標準 1.5mM を 1.0mM に下げる。
	サンプル中に大量の RNA 成分が混在している。	cDNA サンプルを希釈して使用する。 RNA を分解もしくは除去する。
非特異的増幅産物が見られる	アニーリング温度を上げる。	68 $^{\circ}$ C 以上に上げてはならない。
	ステップダウン PCR を行う。	
	MgSO <sub>4</sub> 濃度を下げる。	標準 1.5mM を 1.0mM に下げる。
	新しいプライマーセットを設計する。	
バックグラウンドにスミア、エキストラバンドが見られる	サイクル数を減らす。	2~5 サイクル程度減らす。
	テンプレート DNA の量を減らす。	
	MgSO <sub>4</sub> 濃度を下げる。	標準 1.5mM を 1.0mM に下げる。
	使用酵素量を下げる。	標準 1U を 0.5~0.8U 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。	TArget Clone <sup>TM</sup> -Plus-を用いる。

## 7. 実施例

【実施例 1】各種 cDNA をターゲットにした場合の KOD -Plus-、他社 PCR 用酵素との増幅性能の比較

HeLa total RNA より逆転写した各種 cDNA を鋳型にして、各製品推奨の条件で PCR を行いました。その結果、KOD -Plus- Ver.2 は、他の酵素に比べて良好な増幅が確認されました。特に、増幅されにくい human polymerase  $\epsilon$  cDNA 6.8kb (レーン 4) においても明瞭なバンドが確認されました。



弊社小冊子、私にもできた!「ライフサイエンス実験シリーズ」Vol.2 遺伝子発現解析編(前編) にも本商品の実施例を紹介しています。(弊社ウェブページでもご覧いただけます。)

## 8. 関連商品

品名	包装	Code.No.
<M-MLV 改変型逆転写酵素> ReverTra Ace <sup>®</sup> (100 U/ $\mu$ l)	2,000 U×1本	TRT-101T
	10,000 U×1本	TRT-101
	(10,000 U×1本)×5	TRT-101X5
	(10,000 U×1本)×10	TRT-101X10
<高正確性 PCR 酵素> KOD DNA Polymerase	250 U×1本	KOD-101
	(250 U×1本)×5	KOD-101X5
<ホット・スタート対応高正確性 PCR 酵素> KOD -Plus-	200 U×1本	KOD-201
	(200 U×1本)×5	KOD-201X5
	(200 U×1本)×10	KOD-201X10
<KOD/KOD -Plus-用高効率 TA クローニングキット> TArget Clone <sup>™</sup> -Plus-	10 回用	TAK-201
dNTPs Mixture(2mM)	1 ml	NTP-201
KOD -Plus-用 25mM MgSO <sub>4</sub>	1 ml	KOD-2S
KOD -Plus- Ver.2 用 Buffer	1 ml	KOD-3B

## 9. 参考文献

- (1) Takagi, M., Nishioka, M., Kakihara, H., Kitabayashi, M., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M., and Imanaka, T., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4504-4510 (1997)
- (2) Hashimoto, H., Matsumoto, T., Nishioka, M., Yuasa, T., Takeuchi, S., Inoue, T., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., and Kai, Y., *J. Biochem. (Tokyo)*, **125**, 983-986 (1999)
- (3) Mizuguchi, H., Nakatsuji, M., Fujiwara, S., Takagi, M., and Imanaka, T., *J. Biochem. (Tokyo)*, **126**, 762-768 (1999)
- (4) Nishioka, M., Mizuguchi, H., Fujiwara, S., Komatsubara, S., Kitabayashi, M., Uemura, H., Takagi, M., and Imanaka, T., *J. Biotechnol.* **88**, 141-149 (2001).
- (5) Hashimoto, H., Nishioka, M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., Inoue, T., and Kai, Y., *J. Mol. Biol.*, **306**, 469-77 (2001).
- (6) Imanaka, T., and Takagi, M., *J. Chin. Inst. Chem. Engrs.*, **32**, 277-288 (2001).



【製造・販売元】

ー納期・注文に関するお問い合わせー

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



<製品の内容・技術に関するお問合せ>  
東洋紡 (株) ライフサイエンス事業部 テクニカルライン  
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833  
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝日を除く)  
E-mail: tech\_osaka@toyobo.jp  
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>