



取扱説明書

Code No. KFX-101
 Code No. KFX-101X5
 Code No. KFX-101X10
 保存温度 -20°C

高成功率 PCR 酵素

KOD FX

本製品は、KOD DNA Polymerase をベースに開発された高性能 PCR 試薬です。優れた「増幅成功率」、「伸長性」、「増幅効率」を示し、幅広い PCR において確実な結果を期待できます。また、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

- ・ 高い増幅成功率(弊社 No.1)
GC リッチターゲットや細胞懸濁液などのクールドサンプルなどからも高い成功率で増幅が可能です。
- ・ 抜群の増幅効率
高い収量が得られるため、少ない鋳型量からでも増幅が可能です。
- ・ 優れた伸長性
λ DNA を鋳型に 40kb、ヒトゲノム DNA を鋳型に 24kb、cDNA を鋳型に 13.5kb の増幅を確認しています。
- ・ ホットスタートで PCR パフォーマンス向上
2 種類の抗 KOD 抗体を酵素に混合することによって、非特異反応の原因となる常温下での Polymerase 活性と 3'→5' Exonuclease 活性を抑制しています。抗体は PCR の最初の変性ステップで失活し、増幅反応には影響を及ぼしません。

1. 内容物

	KFX-101 (200U × 1 本)	KFX-101X5	KFX-101X10
KOD FX (1.0 U/μl)	200 μl × 1 本	(KFX-101) × 5	(KFX-101) × 10
2x PCR Buffer for KOD FX*	1.7ml × 3 本		
2mM dNTPs	1ml × 2 本		

* 2x PCR Buffer for KOD FX は、-20°C 保存で液状です（凍結しません）。-20°C 以下で保存した場合、凍結することがありますが、品質上問題なくご使用いただけます。ご使用時には、融解後、良く攪拌してからご使用ください。

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. 性能・品質

KOD FX は、各ロットにおいて、ヒトゲノム DNA を鋳型として、tPA 遺伝子領域 24kb の増幅ができることを確認して出荷しております。（tPA: tissue-type plasminogen activator）



< 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>

A 3 7 1 2 K

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 KOD FX (酵素液) 以外の各試薬を十分攪拌してからご使用ください。凍結している場合は完全に融解してください。

	使用量	最終濃度
2x PCR buffer for KOD FX	25 μ l	1x
2mM dNTPs	10 μ l	0.4mM each
10pmol / μ l Primer #1	1.5 μ l	0.3 μ M
10pmol / μ l Primer #2	1.5 μ l	0.3 μ M
Template DNA	X μ l	{ Genomic DNA \sim 200 ng / 50 μ l Plasmid DNA \sim 50 ng / 50 μ l cDNA \sim 200 ng (RNA 相当量) / 50 μ l
Autoclaved, distilled water	(11-X) μ l	
KOD FX (1.0U/ 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、反応液を十分混合してから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2ステップのサイクルを行ってください。プライマーの T_m 値が 73°C 未満の場合、あるいは、2ステップのサイクルで増幅が見られない場合には、3ステップのサイクルをお試しください。また、10kb 以上のターゲットを増幅する Long PCR においてエキストラバンドあるいはスメアが認められた場合には、ステップダウン PCR をお試しください。

2ステップ	3ステップ
Predenature : 94°C , 2min. Denature : 98°C , 10sec. \leftarrow 25~40 cycles Extension : 68°C , 1min. /kb \leftarrow	Predenature : 94°C , 2min. Denature : 98°C , 10sec. \leftarrow 25~40 cycles Annealing : $(T_m-5)^{\circ}\text{C}$, 30sec. \leftarrow Extension : 68°C , 1min. /kb \leftarrow
ステップダウン	
Predenature : 94°C , 2min. Denature : 98°C , 10sec. \leftarrow 5 cycles Extension : 74°C , 1min. /kb \leftarrow Denature : 98°C , 10sec. \leftarrow 5 cycles Extension : 72°C , 1min. /kb \leftarrow Denature : 98°C , 10sec. \leftarrow 5 cycles Extension : 70°C , 1min. /kb \leftarrow Denature : 98°C , 10sec. \leftarrow 15 ~ 25 cycles Extension : 68°C , 1min. /kb \leftarrow Extension : 68°C , 7min.	

- ・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。ターゲット鎖長1kb あたり 30sec.で設定してもほとんどの場合増幅が得られますが、増幅量や増幅の確実性が低下する場合があります (P.9 検討例3ご参照)。
- ・本製品は非常に優れた増幅効率を有しているため、通常25~30サイクルで十分な増幅が得られます。ターゲットのコピー数が少ないと予想される場合や10kbを超えるLong PCRでは、30~40サイクルでお試ください。

5. PCR をうまく行うために

- (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 μ l にすることを推奨します。
- (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、都度使い切りをすることをお勧めいたします。
- (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 22~35mer 程度(T_m 値 $>60^{\circ}\text{C}$)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 Long PCR では、できるだけプライマー設計ソフトを利用し、25~35mer 程度で、 T_m 値が 65°C 以上のプライマーを設計ください。また、プライマーの 3' 端領域が GC リッチにならないようにご注意ください。
- (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勧めします。

6. PCR 産物のクローニングについて

- (1) 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、必要によりリン酸化を行った後、blunt end を利用したクローニングを行ってください。また、TA クローニングを行いたい場合には、弊社 KOD / KOD-Plus- / KOD FX 用 TA クローニングキット TArget CloneTM-Plus-(Code No.:TAK-201)を用いることにより、簡便に TA クローニングを行うことができます。
- (2) 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。KOD FX(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 MagExtractorTM-PCR & Gel Clean up-(Code No.:NPK-601)を利用すると便利です。

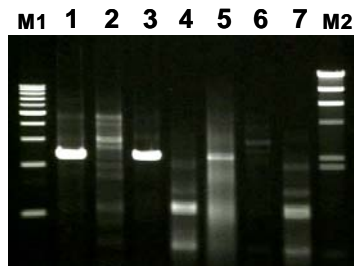
7. 性能データ

(1) 増幅成功率 (GC rich ターゲット、クールドサンプル)

■ GC rich ターゲットの増幅

KOD FX では、他社 GC rich 対応 PCR 試薬が増幅できないターゲットでも増幅が可能でした。

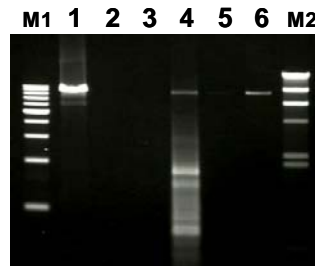
●ヒト TGF-β 2.3kb
(GC含量約70%)



M1: 1kb DNA ラダー
1: KOD FX
2: KOD -Plus-
3: KOD -Plus-+5% DMSO
4: A社酵素
5: B社酵素
6: C社酵素
7: Taq DNA Pol.
M2: λ / Hind III digest

鋳型: ヒトゲノムDNA 10ng / 50 μl 反応系

●ヒト IGF2R遺伝子[NM_000876] 8.9kb
(GC含量約90%の領域を含むmRNA)

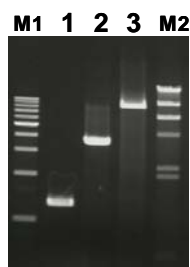


M1: 1kb DNA ラダー
1: KOD FX
2: A社酵素
3: D社酵素
4: E社GCrich対応酵素
5: F社GCrich対応酵素
6: G社GCrich対応酵素
M2: λ / Hind III digest

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

■ 全血をサンプルとしたダイレクト PCR

KOD FX では、全血をサンプル (鋳型) とした場合でも、8.5kb のターゲットの増幅が可能でした。

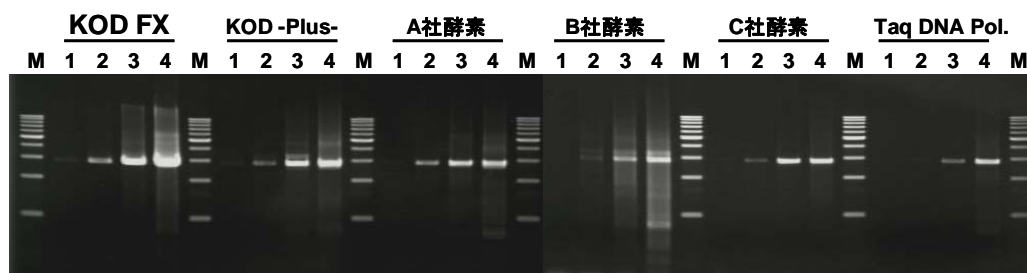


鋳型: ヒト全血 2 μl / 50 μl 反応系

M1: 1kb DNA ラダー
1: β-globin 1.3kb
2: β-globin 3.6kb
3: β-globin 8.5kb
M2: λ / Hind III digest

(2) 増幅効率

KOD FX では、他社 PCR 酵素を大幅に上回る収量が得られ、少ない鋳型量からでも増幅が可能でした。



鋳型: ヒトゲノムDNA
1: 鋳型量 0.1ng / 50 μl 反応系
2: 1 ng
3: 10 ng
4: 100 ng
ターゲット: β-globin 2.8kb

PCR サイクル条件:
94°C 2min.
98°C 10sec. ↻ 30 cycles
68°C 3min.

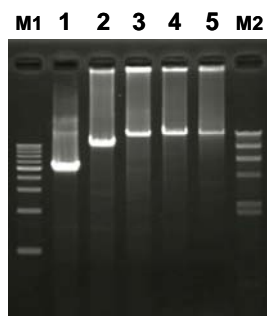
M: 1kb DNA ラダー

*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。

(3) 伸長性 (増幅可能鎖長)

KOD FX では、λ DNA を鋳型に 40kb、ヒトゲノム DNA を鋳型に 24kb、cDNA を鋳型に 13.5kb の増幅が可能でした。

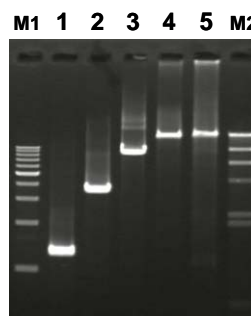
●Template: λ DNA



鋳型: λ DNA
10ng / 50 μl 反応系

M1: 1kb DNA ラダー
1: 5kb
2: 10kb
3: 20kb
4: 30kb
5: 40kb
M2: λ / Hind III digest

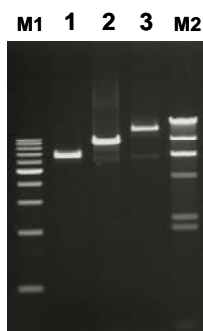
●Template: ヒトゲノムDNA



鋳型: ヒトゲノムDNA
50~200ng / 50 μl 反応系

M1: 1kb DNA ラダー
1: β-globin 1.3kb
2: β-globin 3.6kb
3: β-globin 8.5kb
4: β-globin 17.5kb
5: tPA 24.0kb
M2: λ / Hind III digest

●Template: 逆転写反応液(cDNA)

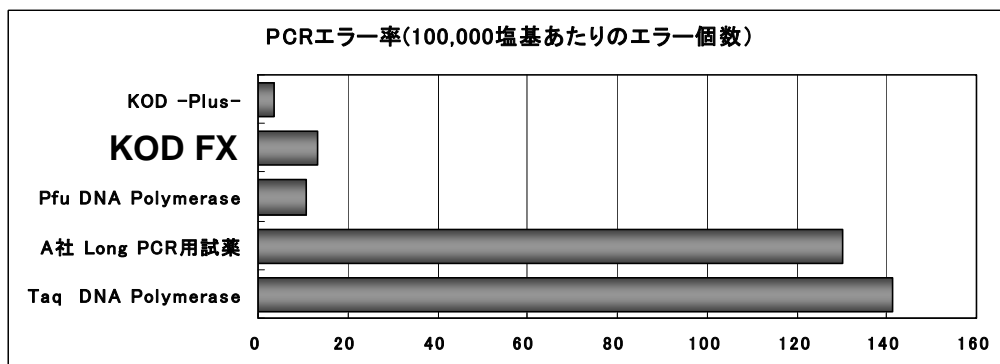


鋳型: 逆転写反応液 (ヒトcDNA)
total RNA100ng相当 / 50 μl 反応系

M1: 1kb DNA ラダー
1: *Homo sapiens* polymerase (DNA directed), epsilon [NM_006231] 6.8kb
2: *Homo sapiens* insulin-like growth factor 2 receptor [NM_000876] 8.9kb
3: *Homo sapiens* dystrophin [NM_004006] 13.5kb
M2: λ / Hind III digest

(4) 正確性

ヒトゲノム DNA を鋳型に β-globin 領域 2.4kb の増幅を行い、PCR 産物を TArget Clone™ -Plus-(Code No.:TAK-201)を用いて TA クローニング後、96 クローンをピックしてシーケンシングを行い、配列の確認を行いました。その結果、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 144,535 塩基中、わずか 19 塩基でした。このエラー率は、Taq DNA Polymerase や他社 Long PCR 用酵素の約 10 倍優れている値です。



8. クロードサンプルを鋳型とした使用例

本製品は、様々なクロードサンプルに対しても高い成功率で増幅が可能です。例えば、全血、培養細胞、酵母などは、DNA を抽出することなく直接 PCR 反応液に加えるだけで十分に増幅が得られます。また、マウステールや植物組織の場合は、簡便な方法で調製したライセートで確実に増幅産物が得られます。以下にそのプロトコールをお示しします。

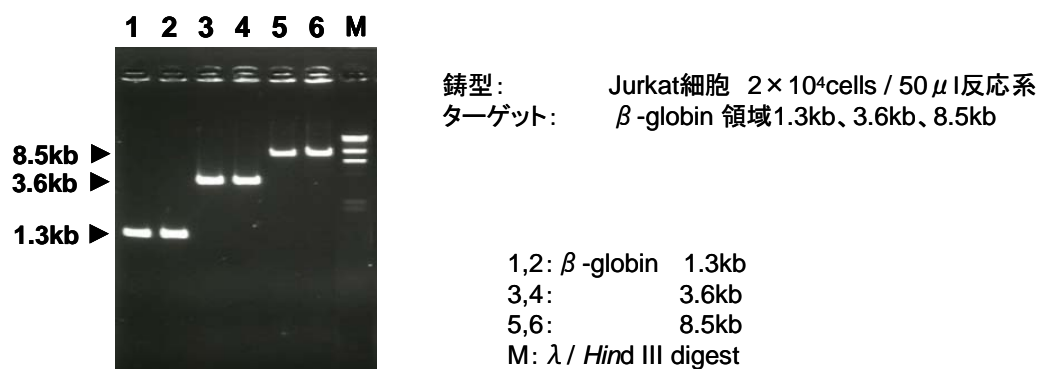
(1) 全血、培養細胞、酵母など

●方法

PCR 反応液 50 μ l に以下の量のサンプルを直接添加し、PCR を実施します。

- ・全血…1~4 μ l
- ・培養細胞… $\sim 2 \times 10^4$ cells (例: RPMI/10%FCS に懸濁した 1×10^4 cells / μ l の細胞懸濁液を 2 μ l)
- ・酵母…チップの先についた少量 (コニーク® ルト PCR。酵素処理による酵母細胞壁の溶解は不要です。)

●実施例



(2) マウステールなど

●方法

以下の方法 (アルカリ溶解法) にてライセートを調製し、PCR に供します。

マウステール (3mm 程度)

- ↓ ←50mM NaOH 180 μ l
- ↓ Vortex にて良く攪拌
- ↓ 95°C, 10min. インキュベート
- ↓ ←1M Tris-HCl (pH8.0) 20 μ l
- ↓ Vortex にて良く攪拌
- ↓ 遠心 12,000rpm, 10min.

上清 (ライセート) ⇒ 0.5~2 μ l を PCR 反応液 50 μ l に添加

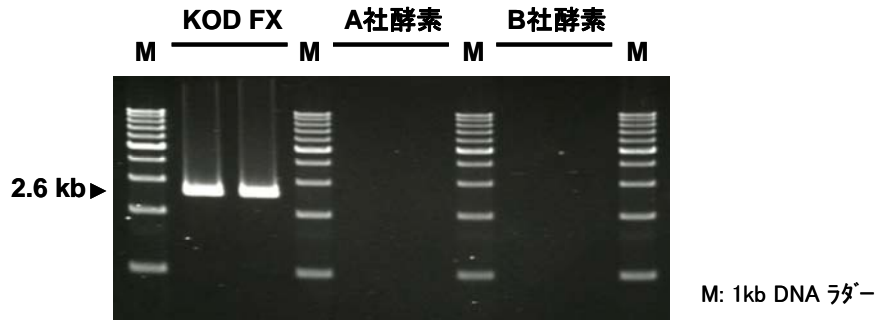
※本方法ではマウステールは完全には溶解しません。

※熱アルカリ溶液の取り扱いに十分ご注意ください。

※Proteinase K を用いて調製されたライセートを直接 PCR に用いることはお薦めできません。

Proteinase K と SDS が PCR 反応に悪影響を及ぼす可能性がありますので、ご使用の場合、精製が必要となります。ライセートから直接 PCR されたい場合は、上記の「アルカリ溶解法」をお薦めします。

●実施例



鑄型: マウステールライセート0.5 μ l / 50 μ l Reaction
 ターゲット: Mouse membrane glycoprotein (Thy-1) gene <M10246> 2.6kb

(3) 植物組織など

●方法

以下の方法（ワンステップ法）にてライセートを調製し、PCR に供します。

植物葉（3mm 角程度 1 枚）、精米（1 粒）

- ↓ ←溶解 buffer 100 μ l
- ↓ Vortex にて良く攪拌
- ↓ 95°C, 10min. インキュベート
- ↓ Vortex にて良く攪拌

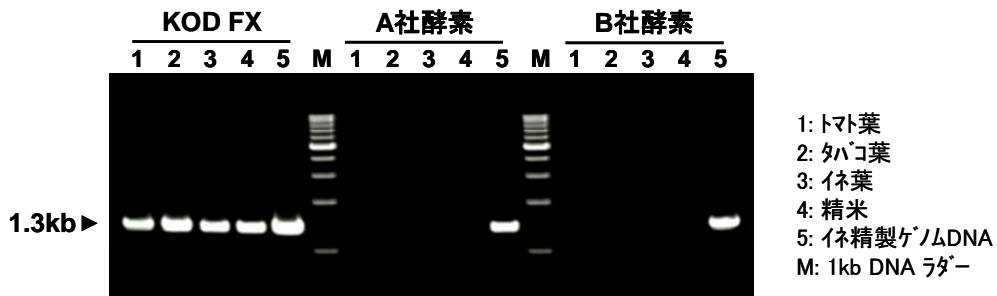
上清（ライセート） ⇒ 1 μ l を PCR 反応液 50 μ l に添加

溶解 buffer :
 100mM Tris-HCl (pH9.5)
 1M KCl
 10mM EDTA

※本方法では植物組織は完全には溶解しません。

※参考文献 : *Biotechniques*. 19: 394 (1995)

●実施例

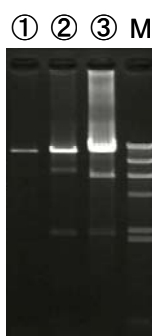


鑄型: 各植物組織ライセート1 μ l あるいは 精製DNA 10ng / 50 μ l Reaction
 ターゲット: rbcL(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase large subunit gene) 1.3kb

9. トラブルシューティング

トラブル	考えられる要因	対策
増幅産物が見られない。 増幅量が少ない。	サイクル	3ステップのサイクルで行う。アニーリング温度を Tm-10°C程度まで下げる。 サイクル数を 2-5 サイクル程度増やす。 <検討例 1 ご参照>
	プライマー	プライマーの品質を確認する。→再調製・再合成する。 プライマーを再設計し直す。
	鋳型DNAの純度・量	鋳型DNAの純度を確認する（特に RNA 等が多量にコンタミしていないかを確認する）。→鋳型 DNA の精製度を上げる。 適量の鋳型 DNA を使用する。<検討例 3 ご参照>
スミア、エキストラバンドが見られる。	サイクル	サイクル数を 2-5 サイクル程度減らす。 <検討例 1 ご参照> ステップダウン PCR を行う。<検討例 2 ご参照>
	プライマー	プライマーの品質を確認する。→再調製・再合成する。 プライマーを再設計し直す。
	鋳型DNA量	適量の鋳型 DNA を使用する。<検討例 3 ご参照>
	酵素量	酵素使用量を 0.5~0.8U/ 50 μl 反応系程度に下げる。

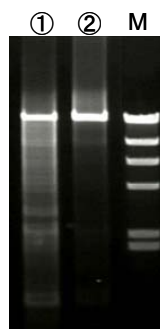
■検討例 1 : サイクル条件の検討 (その 1)



鋳型: 逆転写反応液(ヒトcDNA) Human Adult Skeletal Muscle total RNA 100ng相当 / 50 μl 反応系
 ターゲット: *Homo sapiens dystrophin* [NM_004006] 13.5kb
 PCRサイクル条件:
 94°C 2min.
 98°C 10sec. ↙ ①30 cycles ② 35 cycles ③ 40 cycles
 68°C 14min. ↘

M: λ / Hind III digest

■検討例 2 : サイクル条件の検討 (その 2)

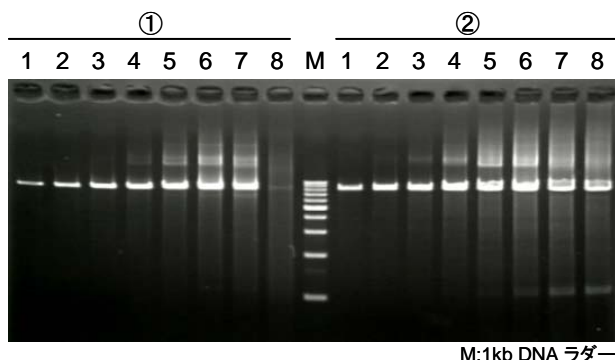


鋳型: ヒトゲノムDNA 200ng / 50 μl 反応系
 ターゲット: tPA 24kb
 PCRサイクル条件:
 ① 94°C 2min.
 98°C 10sec. ↙ 30 cycles
 68°C 24min. ↘
 ② 94°C 2min.
 98°C 10sec. ↙ 5 cycles
 74°C 24min. ↘
 98°C 10sec. ↙ 5 cycles
 72°C 24min. ↘
 98°C 10sec. ↙ 5 cycles
 70°C 24min. ↘
 98°C 10sec. ↙ 20 cycles
 68°C 24min. ↘
 68°C 7min.

M: λ / Hind III digest

■ 検討例 3 : 鋳型 DNA 量と伸長時間の検討

●ターゲット: β -globin 8.5kb



M: 1kb DNA ラダー

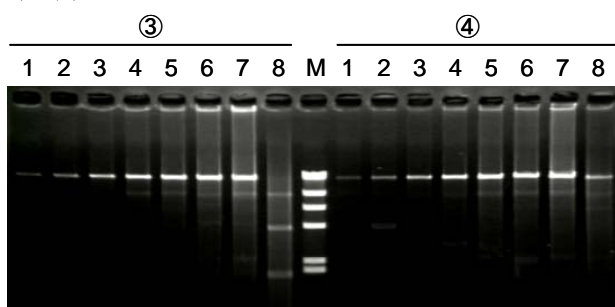
鋳型: ヒトゲノムDNA

- 1: 6ng / 50 μ l 反応系
- 2: 12ng
- 3: 25ng
- 4: 50ng
- 5: 100ng
- 6: 200ng
- 7: 400ng
- 8: 800ng

PCR サイクル条件:

- | | | | | |
|---|--------------|-------------|---|-------------|
| ① | 94°C 2min. | | ② | 94°C 2min. |
| | 98°C 10sec. | ↙ 30 cycles | | 98°C 10sec. |
| | 68°C 4.5min. | | | 68°C 9min. |

●ターゲット: tPA 24kb



M: λ / Hind III digest

- | | | | | |
|---|-------------|-------------|------------|-------------|
| ③ | 94°C 2min. | | ④ | 94°C 2min. |
| | 98°C 10sec. | ↙ 5 cycles | | 98°C 10sec. |
| | 74°C 12min. | | | 74°C 24min. |
| | 98°C 10sec. | ↙ 5 cycles | | 98°C 10sec. |
| | 72°C 12min. | | | 72°C 24min. |
| | 98°C 10sec. | ↙ 5 cycles | | 98°C 10sec. |
| | 70°C 12min. | | | 70°C 24min. |
| | 98°C 10sec. | ↙ 20 cycles | | 98°C 10sec. |
| | 68°C 12min. | | | 68°C 24min. |
| | 68°C 7min. | | 68°C 7min. | |

10. 関連商品

品名	包装	Code No.
<高効率・高成功率 PCR 酵素> KOD FX Neo	200U × 1 本 (200U × 1 本) × 5 (200U × 1 本) × 10	KFX-201 KFX-201X5 KFX-201X10
<高正確性 PCR 酵素> KOD DNA Polymerase	250U × 1 本 (250U × 1 本) × 5	KOD-101 KOD-101X5
<ホットスタート対応高正確性 PCR 酵素> KOD -Plus-	200U × 1 本 (200U × 1 本) × 5 (200U × 1 本) × 10	KOD-201 KOD-201X5 KOD-201X10
<信頼性を向上させたホットスタート対応高正確性 PCR 酵素> KOD -Plus- Ver.2	200U × 1 本 (200U × 1 本) × 5	KOD-211 KOD-211X5
dNTPs Mixture(2mM)	1 ml	NTP-201
<KOD / KOD -Plus- / KOD FX 用高効率 TA クローニングキット> TArget Clone™ -Plus-	10 回用	TAK-201
<磁性ビーズを利用した DNA fragment 精製キット> MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-	200 回用	NPK-601

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

The use of betaine in DNA polymerase reactions is covered by intellectual property, including U.S. Patent No. 6,270,962 and related patents issued or pending in other countries ("I.P."), exclusively licensed to EPICENTRE Technologies Corporation, 726 Post Road, Madison, WI 53713, USA ("EPICENTRE"). The right to use betaine in conjunction with KOD DNA Polymerase in PCR is sublicensed by EPICENTRE to TOYOBO Co., Ltd. solely for research purposes. The purchase of this product conveys to the buyer a limited, non-exclusive, non-transferable right under the I.P. to use the purchased product containing betaine and KOD DNA Polymerase in PCR solely for research purposes. No rights are granted to resell, repackage, or further sublicense. No other license is granted to the buyer, whether expressly, by implication, by estoppel or otherwise.



【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



<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>