

Code No. KOD-401  
 Code No. KOD-401X5  
 Code No. KOD-401X10  
 保存温度 -20℃

高正確・高効率・高速 PCR 酵素

## KOD-Plus-Neo

KOD-Plus-Neo は、鹿児島県小宝島の硫気孔より単離された超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株由来の KOD DNA Polymerase<sup>1,2)</sup> をベースに開発された PCR 用酵素です。KOD DNA Polymerase は、強い 3'→5' Exonuclease 活性 (Proofreading 活性) を有するため、高い正確性を示し、特にクローニングを目的とした PCR に適しています。また、本製品は、KOD DNA Polymerase に独自の伸長エンハンサーを添加することにより、従来の KOD-Plus- (Code No. KOD-201)、KOD-Plus-Ver. 2 (Code No. KOD-211) の優れた正確性 (Taq の約 80 倍) はそのままに、増幅量や伸長性を格段に向上させています。

さらに、伸長時間を従来の 1 min./ kb から 30 sec./ kb に短縮できるため、PCR に要する時間を大幅に短縮することができます。

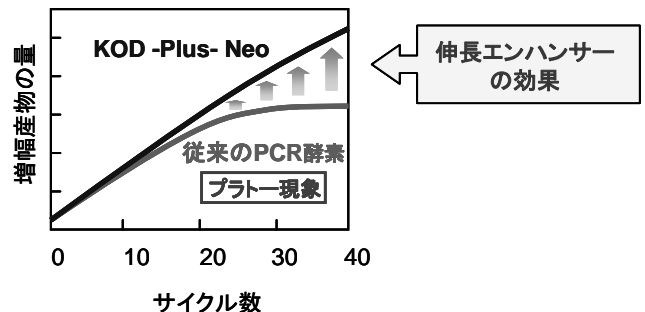
本酵素には、Polymerase 活性と 3'→5' Exonuclease 活性を抑える 2 種類のモノクローナル抗体が混合されており、簡便に特異性の高い Hot start PCR を行うことができます。

### 特長

#### ● 微量なテンプレートから正確・高効率な増幅が可能

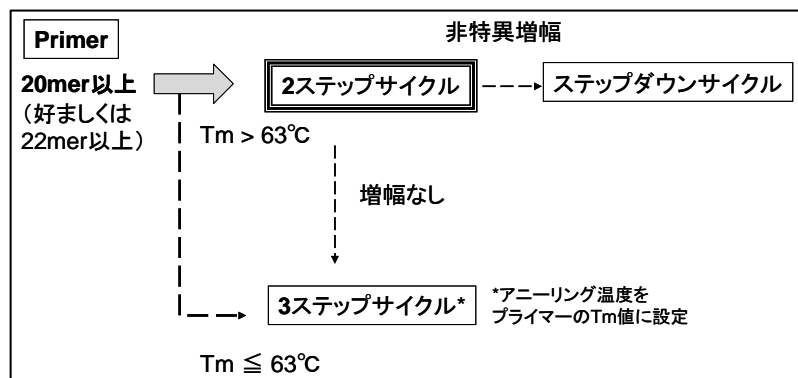
KOD-Plus-Neo には独自の伸長エンハンサー\*が添加されており、微量なテンプレートからでも高正確・高効率に目的遺伝子を増幅することが可能になりました。本酵素は高い正確性 (Taq の約 80 倍) を示し、低コピー数のテンプレートからも正確に目的遺伝子を増幅することができます。

\*KOD DNA polymerase をはじめ高正確性 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>が出やすいと言われていました。伸長エンハンサーはこの<プラトー現象>を抑える働きを有し、反応をより長く持続させます。そのため、微量なテンプレートからの増幅や長いターゲットの増幅で特に大きな効果を発揮します。



#### ● 様々なプライマーで同一温度サイクル条件を実現

検討不要のサイクル条件を実現しました。20mer 以上のプライマー (Tm 値\* >63℃) においては、まずは 2 ステップサイクルをお試しください。検討要らずで簡単です。



\*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、50 mM Na<sup>+</sup>濃度と 0.5 μM オリゴヌクレオチド濃度で計算した値を利用しております。

● **増幅時間を短縮 (長いターゲットでより便利になりました)**

伸長時間を、従来品の 1 min./kb から 30 sec./kb に短縮できます。伸長性が向上しているため、長いターゲットを迅速に増幅することができます。

● **幅広いターゲットの増幅**

従来品より伸長性が向上し、様々な長さのターゲットを増幅できます。ヒトゲノム DNA をテンプレートとして 17.5 kb までの増幅を確認しています。また、反応液の Mg 濃度を 2 mM にすることで、ヒトゲノム DNA をテンプレートとして 24.0 kb までの増幅を確認しています。

1. 内容物

KOD-Plus- Neo は容量別に次の 3 種類をご用意しております。

	KOD-401 (200 U × 1 本)	KOD-401X5	KOD-401X10
KOD -Plus- Neo (1.0 U/μl)	200 μl × 1 本	(KOD-401) × 5	(KOD-401) × 10
10 × PCR Buffer for KOD -Plus- Neo	1 ml × 1 本		
25 mM MgSO <sub>4</sub>	1 ml × 1 本		
2 mM dNTPs	1 ml × 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。

3. 性能・品質

KOD -Plus- Neo は、各ロットにおいて、ヒトゲノム DNA をテンプレートとして  $\beta$ -globin 遺伝子領域 17.5 kb の増幅ができることを確認して出荷しております。

#### 4. PCR プロトコール

##### (1) 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\* > 63°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。
- ・ イノシンを含むプライマーの使用は避けてください。

\*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、50 mM Na<sup>+</sup> 濃度と 0.5 μM オリゴヌクレオチド濃度で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 KOD-Plus-Neo のサイトからダウンロードしてご利用いただけます。

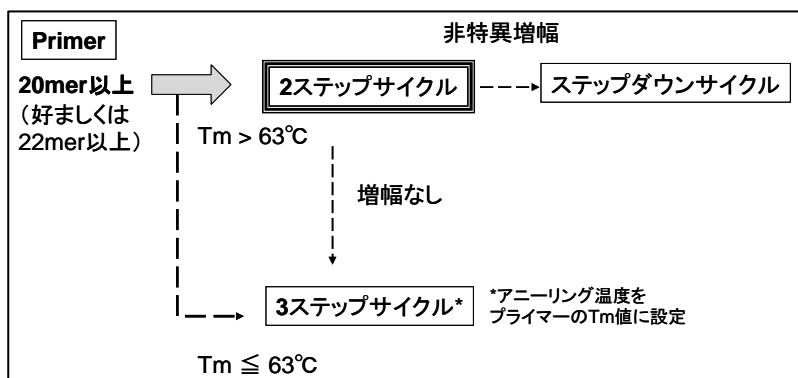
##### (2) PCR 反応液の調製

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	(33 - X) μl	
10× PCR Buffer for KOD-Plus-Neo	5 μl	1×
2 mM dNTPs	5 μl	0.2 mM each
25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 μl	1.5 mM
プライマー (10 μM each)	0.75~1.5 μl	0.15~0.3 μM each
テンプレート	X μl	<ul style="list-style-type: none"> <li>Genomic DNA ~200 ng/50 μl</li> <li>Plasmid DNA ~50 ng/50 μl</li> <li>cDNA ~200 ng/50 μl</li> </ul>
KOD-Plus-Neo (1 U/μl)	1 μl	1 U/50 μl
Total	50 μl	

- ・ 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。
- ・ PCR Buffer は終濃度 1× でご使用ください。過剰に添加されると、増幅が阻害されることがあります。
- ・ Mg 濃度は、通常 1.5 mM (終濃度) にてご使用ください。
- ・ プライマー濃度は、10 kb 未満のターゲットにおいては、通常 0.3 μM (終濃度) にてご利用ください。10 kb 以上の長鎖を増幅する場合、0.15 μM (終濃度) を推奨します (実施例 2 参照)。
- ・ 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 に添加する逆転写反応液量は、まず、RNA 量として 50 ng (Total RNA 1 μg を用いて 20 μl の容量で逆転写反応を行った場合、反応液 1 μl) 程度でお試しく下さい。
- ・ テンプレートについて、詳細は、5. (1) をご参照ください。

(3) PCR サイクル条件 **【重要事項】**



KOD -Plus- Neo のサイクル条件は、2ステップサイクルを基本サイクルとするため、条件の設定を簡便に行うことができます。 Tm 値が低いプライマーにおいても、63°Cより高いTm 値を有するプライマーであれば、ほとんどの場合、68°Cでアニーリングできるように設計されています。まずは、以下の 2 ステップサイクルにてお試しください。

A. 2ステップサイクル

プライマーの Tm 値が 63°Cより高い場合は、2 ステップサイクルをご使用ください。

2ステップ

Pre-denature :	94°C, 2 min.	
Denature :	98°C, 10 sec.	← 25~45 cycles
Extension :	68°C, 30 sec./ kb	

- ・ ターゲットのコピー数が少ないと予想される場合や長鎖ターゲットを増幅する場合は、30~45サイクルでお試しください。
- ・ 伸長 (Extension) 時間は、ターゲット鎖長1 kb あたり 30 sec.で設定してください。
- ・ 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1 min./kb に延長する、または、反応液のMg濃度を2 mMにすると増幅量が増加することがあります。
- ・ DNA変性 (Denature) を94°C, 15 sec.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°C, 10 sec.の変性条件としてください。
- ・ DMSOを添加する場合は、3ステップサイクルで行うか、25~35mer程度でTm値が68°C以上のプライマーをご使用ください。プライマーのTm値が68°Cより低い場合、2ステップサイクルにおけるDMSOの添加量は2%以下としてください。

B. その他のサイクル

プライマーの Tm 値が 63°C 以下の場合や 2 ステップサイクルで増幅が見られない場合は、3 ステップサイクルをお試しください。また、増幅産物にエキストラバンドあるいはスミアが認められた場合は、ステップダウンサイクルをお試しください。

3ステップ

Predenature :	94°C, 2 min.	
Denature :	98°C, 10 sec.	} 25~45 cycles
Annealing :	(Tm)°C, 30 sec.	
Extension :	68°C, 30 sec./ kb	

- ・ アニーリング温度をプライマーの Tm 値に設定してください。

ステップダウン

Predenature :	94°C, 2 min.	
Denature :	98°C, 10 sec.	} 5 cycles
Extension :	74°C, 30 sec./ kb	
Denature :	98°C, 10 sec.	} 5 cycles
Extension :	72°C, 30 sec./ kb	
Denature :	98°C, 10 sec.	} 5 cycles
Extension :	70°C, 30 sec./ kb	
Denature :	98°C, 10 sec.	} 15 ~ 30 cycles
Extension :	68°C, 30 sec./ kb	
Extension :	68°C, 7 min.	

3ステップサイクル、ステップダウンサイクルにおいても以下のことがいえます。

- ・ 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 1 min./ kb に延長する、または、反応液の Mg 濃度を 2 mM にすると増幅量が増加することがあります。
- ・ DNA 変性 (Denature) を 94°C, 15 sec. 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°C, 10 sec. の変性条件としてください。

5. PCR をうまく行うために

(1) テンプレートについて

- ・テンプレート量は以下を参照してください（PCR反応液50 $\mu$ lの場合）。

			一般的なテンプレート量
Genomic DNA	真核細胞由来DNA	5~200 ng	50 ng
	原核細胞由来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)
$\lambda$ DNA		10 pg~10 ng	1 ng

- ・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、事前に電気泳動して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 $\mu$ lに添加する逆転写反応液量は、まず、RNA量として50 ng（Total RNA1 $\mu$ gを用いて20 $\mu$ lの容量で逆転写反応を行った場合、反応液1 $\mu$ l）程度でお試してください。
- ・ウラシルを含むテンプレートは使用できません。

(2) 添加剤について

- ・プライマーが二次構造をとる場合やGC rich ターゲットを増幅する場合、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。ただし、DMSOはプライミング効率を下げることで知られています。DMSOを添加する場合は、プライミング効率を高めるため3ステップサイクルで行うか、25~35mer程度でTm値が68 $^{\circ}$ C以上のプライマーをご使用ください。プライマーのTm値が68 $^{\circ}$ Cより低い場合、2ステップサイクルにおけるDMSOの添加量は2%以下としてください。

(3) その他注意事項

- ・反応チューブはできるだけthin-wallタイプのものご使用ください。また、PCR反応液はtotal 50 $\mu$ lにすることを勧めます。
- ・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勧めいたします。
- ・dNTPsは必ず本製品添付のもの、あるいは弊社別売の「dNTPs Mixture (2 mM) (Code No. NTP-201)」をご使用ください。

## 6. 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。

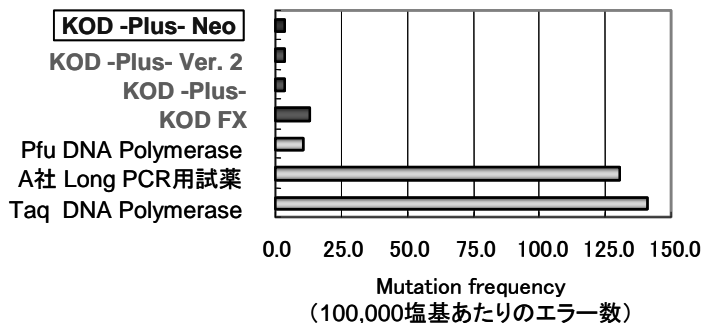
また、TArget Clone™-Plus-のパーツ別売品である「10× A-attachment Mix (Code No. TAK-301)」を用いることで、PCR 産物の 3'末端に A を付加することができ、そのまま任意の T ベクターに PCR 産物をクローニングすることができます。その際のライゲーション試薬としては、TA クローニングに優れる「Ligation high Ver. 2 (Code No. LGK-201)」をお薦めします。
- 本製品で増幅した PCR 産物を制限酵素にて処理し、その突出末端を利用してクローニングを行う場合には、制限酵素処理前に増幅産物の精製を行ってください。

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。

7. 性能データ

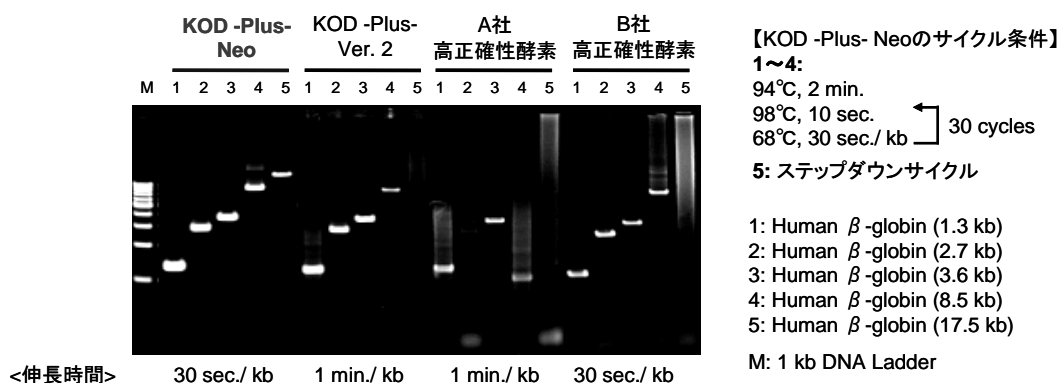
(1) 正確性

ヒトゲノム DNA をテンプレートに  $\beta$ -globin 遺伝子の増幅を行い、PCR 産物を TArget Clone™ -Plus- (Code No. TAK-201) を用いて TA クローニングを行いました。その後、96 クローンをピックしてシーケンシングを行い、配列を確認しました。その結果、KOD -Plus- Neo は KOD -Plus-、KOD -Plus- Ver. 2 と同等の正確性を示しました。この正確性は Taq DNA Polymerase の約 80 倍優れている値であり、PCR 増幅でエラーが入ることはほとんどありません。



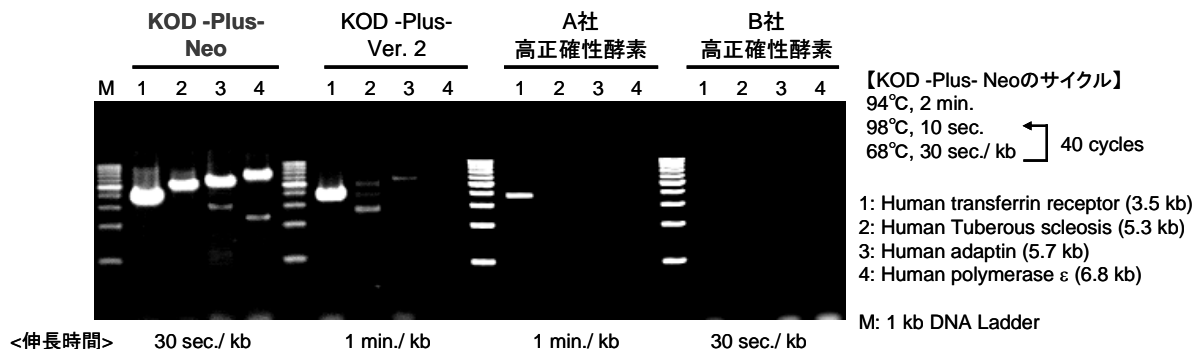
(2) 増幅効率・伸長性

KOD -Plus- Neo 及び従来の PCR 酵素を用いて、ヒトゲノム DNA をテンプレートに様々なサイズの  $\beta$ -globin 遺伝子の増幅を行いました。反応はそれぞれの PCR 酵素の推奨条件に従って、30 サイクルにて実施しました。その結果、KOD -Plus- Neo を用いた場合にのみ、17.5 kb までの明瞭な増幅を確認することができました。また、17.5 kb 以下の増幅においても他社 PCR 酵素を大幅に上回る収量が得られました。



(3) 微量テンプレートからの増幅効率

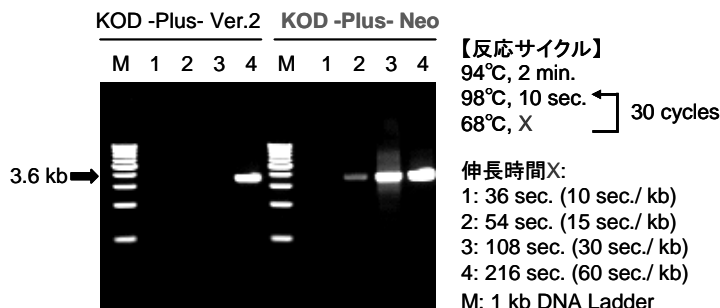
HeLa 細胞由来 Total RNA より逆転写した cDNA (Total RNA 0.5 ng 相当) をテンプレートとして、4 種類の遺伝子を増幅し、増幅効率を比較しました。反応はそれぞれの PCR 酵素の推奨条件に従って、40 サイクルにて実施しました。その結果、KOD -Plus- Neo のみ 4 種類の遺伝子すべてについて十分量の増幅を認めることができました。





(4) 伸長速度

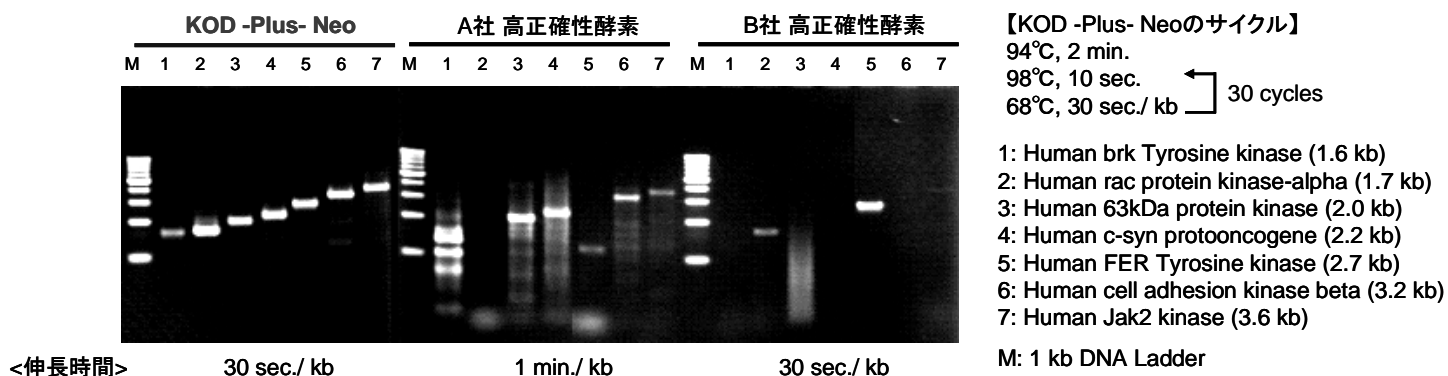
ヒトゲノム DNA (50 ng) をテンプレートに様々な伸長時間で  $\beta$ -globin 遺伝子 (3.6 kb) の増幅を行いました。その結果、従来品では増幅しない短い伸長時間でも明瞭な増幅を確認できました。このように、KOD -Plus- Neo では伸長時間を 30 sec./ kb に設定することが可能です。



8. 実施例

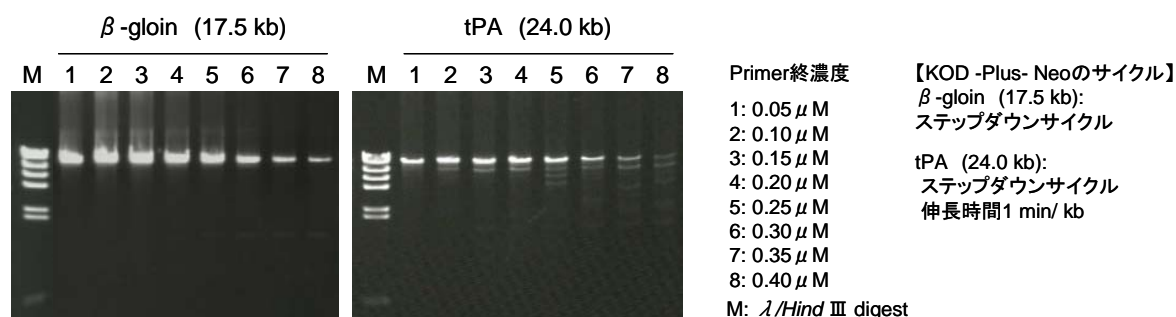
【実施例 1】 Total RNA からの様々な遺伝子の全長 ORF の増幅

HeLa 細胞由来 Total RNA より逆転写した cDNA (Total RNA 50 ng 相当) をテンプレートとして、様々なプロテインキナーゼの ORF (open reading frame) の全長を増幅しました。反応はそれぞれの PCR 酵素の推奨条件に従って、30 サイクルにて実施しました。その結果、KOD -Plus- Neo で増幅した場合にのみ、すべての遺伝子で明瞭な増幅産物を得ることができました。



【実施例2】長鎖ターゲットの増幅例

ヒトゲノムDNA (200 ng) をテンプレートに様々なプライマー濃度で  $\beta$ -globin 遺伝子 (17.5 kb)、tPA (Human tissue-type plasminogen activator) 遺伝子 (24.0 kb) の増幅を行いました。その結果、長鎖ターゲットの増幅では、プライマー濃度を下げること増幅量が増すことが示されました。



このように 10 kb 以上の長鎖ターゲットを増幅する場合は、プライマー濃度を 0.15  $\mu$  M (終濃度) でご利用ください。増幅量が向上する場合があります。

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).

## 10. 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。	サイクル条件を変更する。	伸長時間を 1 min./ 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 Tm-5~Tm-10°C に下げる。
		ステップダウンサイクルで行う(特に 10 kb 以上の長鎖ターゲットで有効な場合がある)。
	MgSO <sub>4</sub> 濃度を変更する。	標準 1.5 mM を 2.0 mM に上げる (特に 10 kb 以上の長鎖ターゲットで有効な場合がある)。
		GC rich ターゲットでは、標準 1.5 mM を 1.0 mM に下げる。
	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 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。
		テンプレートを精製し直す。
		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。	プライマー濃度を低くする (特に 10 kb 以上の長鎖ターゲットで有効な場合がある)。	
	プライマーを再調製、再合成する。	
	プライマーを設計し直す。	
使用酵素量を増やす。	標準 1 U を 1.5~2.0 U に増やす。	
添加剤を加える。	DMSO を終濃度 2~5% になるように添加する。[添加にあたっては、5. (2) 添加剤について、をお読みください]	
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。
		2 ステップサイクルで行っている場合、ステップダウンのサイクルで行う。
		サイクル数を 2~5 サイクル程度減らす。
	MgSO <sub>4</sub> 濃度を下げる。	標準 1.5 mM を 1.0 mM に下げる。
	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。 プライマーを設計し直す (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)。
使用酵素量を減らす。	標準 1 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 -Plus- Neo の増幅産物の末端は平滑化されています。>

11. 関連商品

品名	包装	Code.No.
<高正確性 PCR 酵素> KOD -Plus-	200 U×1 本 (200 U×1 本)×5 (200 U×1 本)×10	KOD-201 KOD-201X5 KOD-201X10
<高正確性 PCR 酵素(正確性をそのままに PCR 成功率UP)> KOD -Plus- Ver.2	200 U×1 本 (200 U×1 本)×5	KOD-211 KOD-211X5
<高成功率 PCR 酵素> KOD FX	200 U×1 本 (200 U×1 本)×5 (200 U×1 本)×10	KFX-101 KFX-101X5 KFX-101X10
<高成功率 PCR 酵素(KOD FX の改良品)> KOD FX Neo	200 U×1 本 (200 U×1 本)×5 (200 U×1 本)×10	KFX-201 KFX-201X5 KFX-201X10
<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
<高効率ライゲーションキット> Ligation high Ver.2	750 μl×1 本 (100 回用)	LGK-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



【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

