



Flexible KOD DNA polymerase KOD FX

PCR実験の悩み、KOD FXが解決いたします。
KOD FX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」、「増幅効率」、「伸長性」を示し、幅広いPCRにおいて確実な結果を期待できます。

PCRの新境地へ!!

大好評販売中

他社酵素では増えなかったターゲットが1回で増えたとのことご連絡を、多くいただいております。

6名の先生方の実施例を掲載しております。

		正確性	伸長性 (ロング性能)	増幅効率 (収量)	増幅成功率	G C サンプリッチ	増幅末端	伸長時間 (/kb)	ホット スタート
PCRがうまくいかない原因を、幅広いPCRで力を発揮	KOD FX	★★★★ (Taqの約11倍)	★★★★★	★★★★★	★★★★★	★★★★★	平滑末端	1min.	○
	KOD DNA Polymerase	★★★★★ (Taqの約50倍)	★★	★★	★★	★★★★	平滑末端	30sec.	—
	KOD -Plus-	★★★★★ (Taqの約80倍)	★★★★	★★★★	★★★★	★★★★	平滑末端	1min.	○
	KOD -Plus-Ver.2	★★★★★ (Taqの約80倍)	★★★★	★★★★	★★★★	★★★★	平滑末端	1min.	○
	Blend Taq®	★★ (Taqの約3倍)	★★★★★	★★★★★	★★★★	★★★	A付加あり	1min.	—
	Blend Taq® -Plus-	★★ (Taqの約3倍)	★★★★★	★★★★★	★★★★★	★★★	A付加あり	1min.	○
KOD Dash®	★★ (Taqの約3倍)	★★★★★	★★★★★	★★★★	★★★★	A付加あり	30sec.	—	

高い成功率

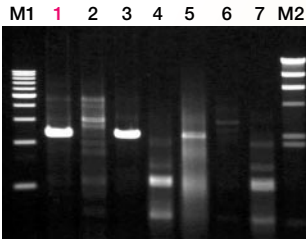
Reliability

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できます。

GC richターゲットの増幅

ヒトTGF-β 2.3kb

(GC含量約70%)

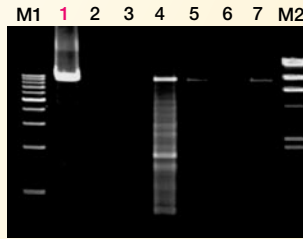


M1: 1kb DNA ラダー
 1: KOD FX
 2: KOD -Plus-
 3: KOD -Plus-+5% DMSO
 4: A社汎用PCR酵素 (Taqベース)
 5: B社高正確性酵素
 6: C社高正確性酵素
 7: Taq DNA Pol.
 M2: λ/Hind III digest

鋳型: ヒトゲノムDNA 10ng/50μl 反応系

ヒト IGF2R遺伝子 [NM_000876] 8.9kb

(GC含量約90%の領域を含む)



M1: 1kb DNA ラダー
 1: KOD FX
 2: A社汎用PCR酵素 (Taqベース)
 3: D社Long PCR酵素 (Taqベース)
 4: E社GCrich対応高正確性酵素
 5: F社GCrich対応Long PCR酵素 I
 6: G社GCrich対応Long PCR酵素 II
 7: H社高効率Long PCR酵素
 M2: λ/Hind III digest

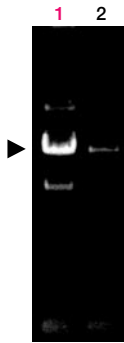
鋳型: ヒトcDNA (HeLa Total RNA 50ng相当)/50μl 反応系

実施例

様々な先生方からKOD FXを使った実施例

(実施例は弊社ウェブサイト: www.kodakoba.com)

c-mos遺伝子の増幅 (変異導入のためのPCR)

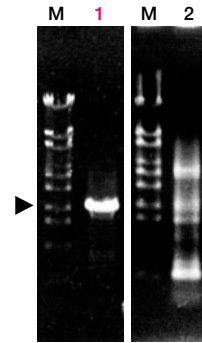


1: KOD FX
 2: A社高正確性酵素

遺伝子名: プロトオンコジーンc-mos
 サンプル: Plasmid DNA 5ng
 ターゲット長: 約4.5kb
 プライマー条件: 32mer, 0.2μM (final)
 サイクル: KOD FX (95°C 3min, (95°C 30sec., 55°C 1min., 72°C 4min.) ×20, 72°C 7min)
 A社高正確性酵素 推奨条件

データご提供
 東京工業大学大学院
 生命理工学研究科
 生命情報専攻
 立花和則先生
 先生からのコメント
 得られたコロニー数は、
 KOD FXの方が圧倒的に多
 かった。

BMP-2遺伝子の増幅

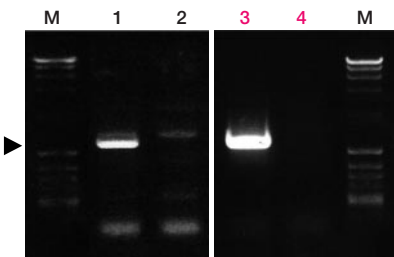


M: λ/EcoT141 DNA Markers
 1: KOD FX
 2: A社Long PCR酵素

遺伝子名: Mouse BMP-2
 サンプル: Mouse genome BAC clone DNA 0.1μg
 ターゲット長: 約2kb (GC-rich領域含む)
 プライマー条件: 20mer, 1μM (final)
 サイクル: KOD FX (98°C 10sec., 68°C 2min.) ×35cycles
 A社Long PCR酵素 (94°C 1min., 60°C 30sec., 72°C 2min.) ×35

データご提供
 鳥取大学医学部
 生命科学科 分子生物学
 安永菜由先生、
 佐藤建三先生
 先生からのコメント
 これまで何回も失敗してい
 たPCRが一度うまく行っ
 った。ちなみに、A社の酵素で
 増幅した約2kbのバンドは、
 シーケンスの結果、別の遺
 伝子だった。

マウスゲノムDNAを用いたPGK neo遺伝子の検出

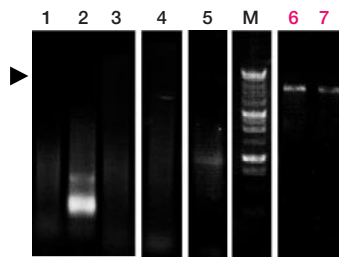


1, 2: A社Long PCR酵素
 3, 4: KOD FX
 1, 3: 遺伝子型 (+) の遺伝子
 変異マウスゲノム
 2, 4: 遺伝子型 (-) の遺伝子
 変異マウスゲノム (NC)
 M: φ X174/Hinc II +
 λ/Hind III DNA Markers

遺伝子名: PGK neo
 サンプル: Mouse genomic DNA 5~10ng
 ターゲット長: 1.5kb
 プライマー条件: 30mer, 0.4μM (final)
 サイクル: KOD FX (94°C 2min., (98°C 10sec., 68°C 90sec.) ×30)
 A社Long PCR酵素 (94°C 2min., (94°C 30sec., 60°C 2min.) ×30, 72°C 2min.)

データご提供
 東京大学大学院医学系
 研究科細胞分子薬理学教室
 (飯野研究室)
 金丸和典先生
 先生からのコメント
 既存の製品では比較的困
 難な検出が、KOD FXでは
 明確に検出できて驚いた。
 さらに、非特異的増幅が
 KOD FXでは消失した。

Chick GAD67プロモーター領域のクローン化



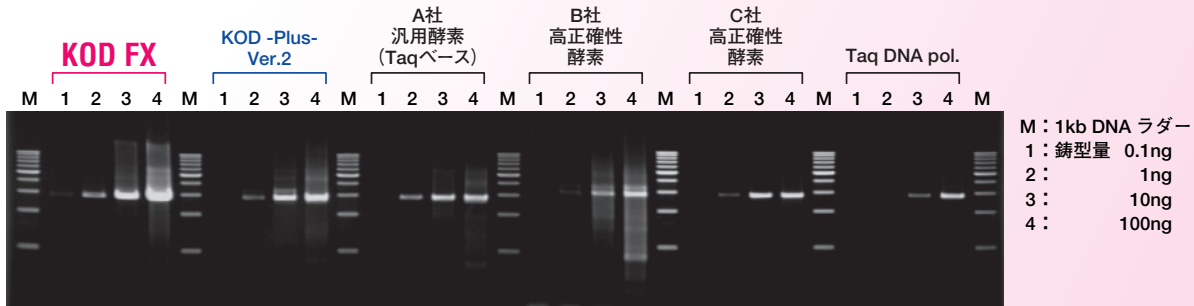
1: A社高正確性酵素
 2: B社Long PCR酵素
 3: C社Long PCR酵素
 4: D社Long PCR酵素
 5: E社Long PCR酵素
 6, 7: KOD FX
 M: 1kb Ladder Markers
 (上から10kb, 8kb, 6kb)

遺伝子名: Chick GAD67プロモーター領域
 サンプル: Chick kidney genomic DNA 0.1μg
 ターゲット長: 6273bp
 プライマー条件: F primer: TCAGGTTGGTGTCTCTCACTG 22mer
 R primer: TCAGCGCGGTTGAAGGAAGC 22mer
 サイクル: KOD FX (98°C 10sec., 68°C 7min.) ×35
 KOD FX以外 推奨条件

データご提供
 京都大学医学部神経生物学
 講座 (第一生理学教室)
 石井孝広先生
 先生からのコメント
 全く増えなかったのが増え
 た。クローン化後、配列が合
 っていることも確認した。

≫ 抜群の増幅効率 Amplification Efficiency

KOD FXでは、少ない鋳型量からでも優れた増幅効率を示します。

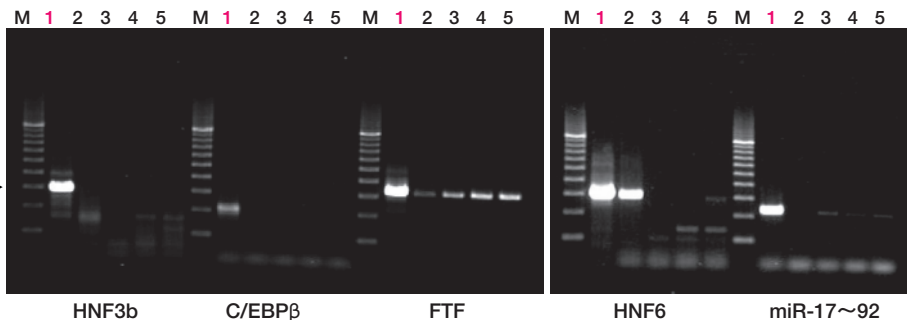


鋳型：ヒトゲノムDNA 0.1ng~100ng/50μl 反応系 PCRサイクル条件： 94°C 2min.
 ターゲット：β-globin 2.8kb 98°C 10sec. 30 cycles
 68°C 3min. *他社酵素については、製品添付のプロトコールに従い30サイクルにて実施しました。

をお寄せいただきました。

toyobo.co.jp/bioでも公開しています

Human転写因子 (HNF3b, C/EBPβ, FTFおよびHNF6) cDNAとmiR-17, 18, 19, 20, 92領域genomic DNAの増幅



サンプル HNF3b, C/EBPβ, FTF, HNF6:
 ヒト肝癌由来細胞株HuH7由来cDNA (0.1μg Total RNA相当)
 miR-17~92:
 ヒト肝癌由来細胞株HuH7由来Genomic DNA 0.2μg

サイクル **KOD FX** 94°C 2min.,
 (98°C 10sec., 55°C 30sec., 68°C 2min.) × 40cycles
 他社酵素 推奨条件

遺伝子名、ターゲット長、及びプライマー配列

- HNF3b (ターゲット長:1.4kb)
 プライマー 5'ACTCGAATTC**C**AGTATGCTGGGAGCGGTGAAGA3'
 5'AAGGGGTA**C**CAGAGTTAGCCGGGCCTGAA3'
 - C/EBPβ (ターゲット長:1.0kb)
 プライマー 5'ATTAGAATT**C**GTTTCATGCAACGCCTGGTGGCC3'
 5'CGCGGGT**A**CCGCGCTAGCAGTGGCCGGAGGA3'
 - FTF (ターゲット長:1.6kb)
 プライマー 5'CTATGAAT**C**ACTAAGAATGTCTTCTAATTC3'
 5'ATTCG**A**TATCTTTAAAGCAAGTTTTTAA3'
 - HNF6 (ターゲット長:1.4kb)
 プライマー 5'TCGCAAT**C**CACGATGAACGCGCAGCTGACCAT3'
 5'CTTTGGT**A**CCGAGTTTTAGTTTGTGGTTCT3'
 - miR-17, 18, 19, 20, 92領域 (ターゲット長:1.1kb)
 プライマー 5'GGTTACT**A**GTGTTAGAGTTTGAGGTTGTTA3'
 5'TATGACT**A**GTTCATATCGCAACTTAACAG3
- (赤字はhomologous sequenceを示します)

- 1: KOD FX
 - 2: A社高正確性酵素
 - 3: B社高正確性酵素
 - 4: B社高正確性酵素 (GC buffer + 3% DMSO)
 - 5: B社高正確性酵素 (GC buffer + 6% DMSO)
- M: 500base Ruler

データご提供
 金沢大学がん研究所
 細胞情報調節
 黒木和之先生

先生からのコメント
 容易に各種クローンを入手
 でき驚きました。

基本条件

- (1) 反応液組成
- | | |
|-------------------------|----------------|
| 2×PCR buffer for KOD FX | 25μl |
| 2mM dNTPs | 10 μl |
| 10pmol/μl Primer F | 1.5μl |
| 10pmol/μl Primer R | 1.5μl |
| Genomic DNA | ~200ng |
| Plasmid DNA | ~50ng |
| cDNA | ~200ng (RNA相当) |
| KOD FX (1.0U/μl) | 1 μl |
| DW | up to 50μl |

2ステップサイクル

- 94°C 2min.
 98°C 10sec. ← 25~40cycles
 68°C 1min./kb

ステップダウンサイクル

- 94°C 2min.
 98°C 10sec. ← 5 cycles
 74°C 1min./kb
 98°C 10sec. ← 5 cycles
 72°C 1min./kb
 98°C 10sec. ← 5 cycles
 70°C 1min./kb
 98°C 10sec. ← 15~25cycles
 68°C 1min./kb
 68°C 7min.

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?

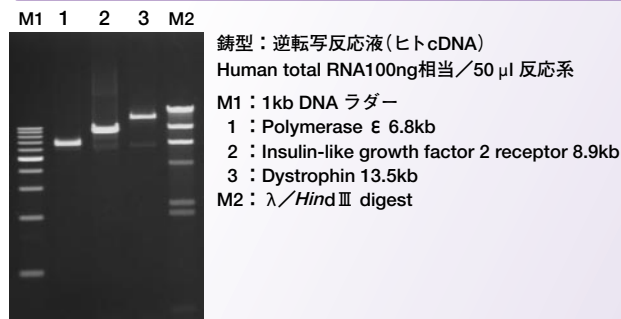
A1: 10kbを超える長いターゲットの増幅には、通常より長め(27mer以上)にPrimerを設計して特異性を上げると共に、アニーリング(及び伸長反応)を比較的高い温度に設定することで、より良い結果を得ることができます。特に、ステップダウンサイクルでの増幅が有効です。また、少なくともカートリッジ精製した精製度の高いプライマーを用いることによって、非特異バンドを減らすことが可能です。

≫優れた伸長性 (増幅可能鎖長) Long Target Capability

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

Long Targetの増幅

Template:逆転写反応液 (cDNA)



実施例

植物発現プロモーターに連結させた植物ウイルスcDNA増幅

M: 1kb Ladder Markers
 1: KOD FX
 2: A社Long PCR用酵素
 3: A社高正確性酵素

遺伝子名 発現プロモーター+植物ウイルスcDNA
 サンプル プラスミドDNA 0.2μg
 ターゲット長 11kb
 プライマー条件 21 mer (GC=21%)
 サイクル
KOD FX 94°C 2.5min., (94°C 15sec., 57°C 15sec., 68°C 7min.) ×25
 A社Long PCR酵素、高正確性酵素 94°C 2.5min., (94°C 15sec., 57°C 15sec., 72°C 7min.) ×25

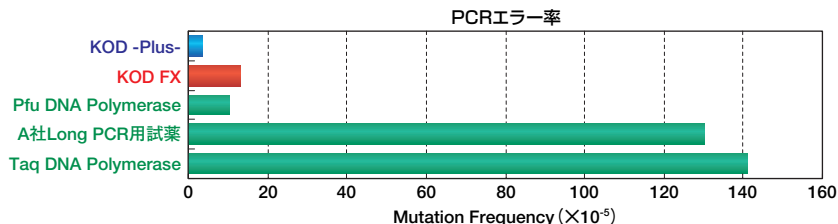
データご提供
 日本大学生物資源科学部
 植物病理学研究室
 井村喜之先生

先生からのコメント
 KOD FXは、A社のLong PCR酵素と比較して増幅効率が高らかに優れていた。また、A社高正確性酵素ではどの条件でも増幅することができなかった。さらに、KOD FXは50μlの系に対して1Uの使用で十分な結果が得られた。

FAQコーナー

Q2: PCR増幅時の正確性はどのくらいですか?

A2: Taq DNA polymeraseの約11倍です。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、他社Long PCR用酵素の約10倍優れている値でした。実際に、KOD FXで増幅した13.5kbのヒトジストロフィン (DMD) 遺伝子をベクターにクローニングしたところ、5クローン中1クローンの割合でPCRエラーのないクローンを取得することができました。



<PCRエラー率の測定方法>
 各酵素にてヒトゲノム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。

※KOD -Plus- Ver.2の正確性はKOD -Plus- とほぼ同等です。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
KOD FX KOD FX (1U/μl) 2×PCR Buffer for KOD FX 2mM dNTPs	200U×1本 [200回用*]	-20°C	KFX-101	¥35,000
	(200U×1本)×5 [1,000回用*]	-20°C	KFX-101X5	¥140,000
高効率TAクローニングキット TArget Clone™ -Plus-	10回用	-20°C	TAK-201	¥16,000

*50μl反応を行った時の反応回数を表示しています。
 ※KOD FXで増幅されたDNA断片は平滑化されているため、通常のTAクローニングはできません。TArget Clone™ -Plus-をお使いください。



東洋紡績株式会社

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

ライフサイエンス事業部 (東京)
 〒103-8530 東京都中央区日本橋小網町17番9号
 TEL.03-3660-4819 FAX.03-3660-4951
 E-mail order_lifescience@toyobo.jp

Toyoboテクニカルライン
 TEL.06-6348-3888
 (9:00~12:00 13:00~17:00 (土・日・祝を除く))
 FAX.06-6348-3833
 E-mail tech_osaka@toyobo.jp

Toyobo Web Site
 [<http://www.toyobo.co.jp/bio>]

