

## 高正確・高効率・高速PCR酵素 KOD -Plus- Neo



■期間：2009年11月2日～2010年3月19日(ご注文分)

サイクル後半での増幅の鈍化を改善。伸長時間短縮(30sec./kb)で理想的なクローニング用PCRを実現。

KOD DNA polymeraseは、強い3'→5' エキソヌクレアーゼ活性(校正活性)を有し、正確にターゲット配列を増幅することができるため、クローニング用のPCR酵素として好評いただいております。しかし、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おります。KOD -Plus- Neoは、高正確性PCR酵素：KOD -Plus-シリーズの技術に、弊社で新たに開発した「伸長エンハンサー」を応用することでTaqの約80倍というKOD -Plus-シリーズの高い正確性を保持しつつ、<プラトー現象>を抑えることにより、微量な鋳型DNAからの増幅や長いターゲットの増幅効率を格段に向上させることに成功しました。

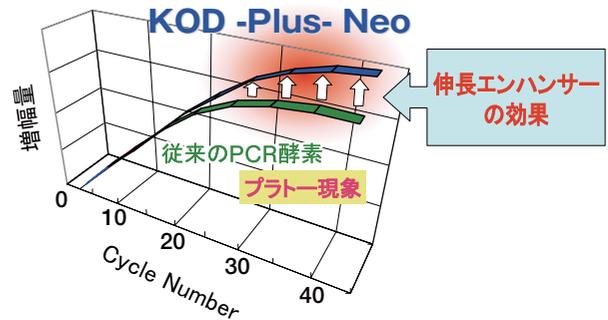


図1. 伸長エンハンサーの効果

### 特長1 微量な鋳型DNAから正確・高効率な増幅が可能

伸長エンハンサー技術を応用することによって、微量な鋳型DNAからでも高正確・高効率に目的遺伝子を増幅することができるようになりました。本酵素は高い正確性(Taqの約80倍)を示し、低コピー数の鋳型からも正確に目的遺伝子を増幅することができます。

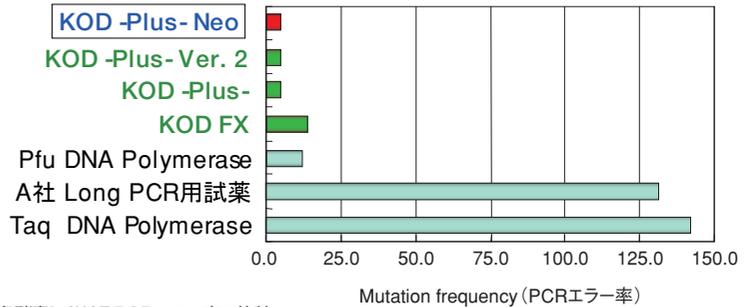


図2. 各酵素におけるPCRエラー率の比較

### 特長2 伸長時間を短縮<30sec./kb>(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60sec./kbから30sec./kbに短縮。長いターゲットでより便利になりました。

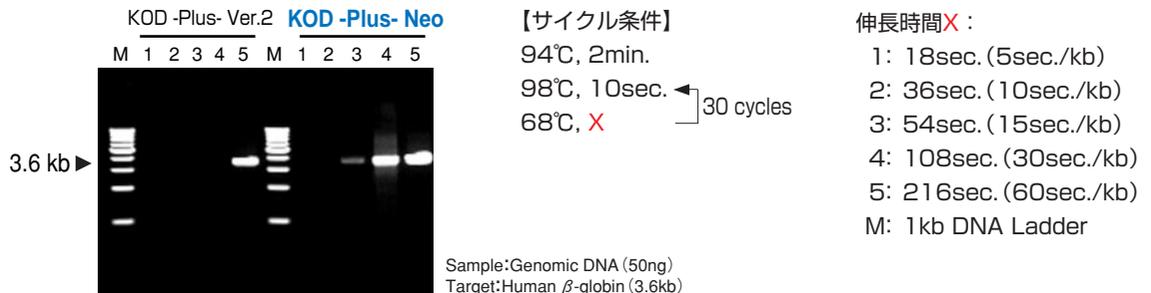


図3. 様々な伸長時間における増幅効率の比較

### 特長3 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。ゲノムDNAで24kbまでの増幅を確認しています。

## 特長4 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 (T<sub>m</sub>値>63°C)\*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。

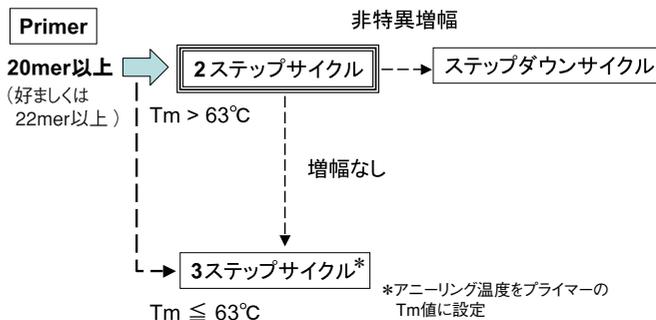
\*T<sub>m</sub>値は最近接塩基対法 (Nearest Neighbor method) を用いて計算した値を利用しています。

### 一ロメモ① 反応条件について

#### 〈基本反応組成〉

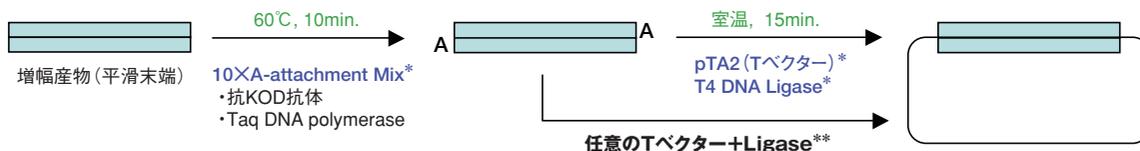
滅菌蒸留水	X μl
10×PCR buffer for KOD -Plus- Neo	5 μl
2mM dNTPs	5 μl
25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 μl
10pmol / μl Primer F	1.5 μl
10pmol / μl Primer R	1.5 μl
KOD -Plus- Neo (1.0U / μl)	1 μl
Genomic DNA	~200ng
Plasmid DNA	~50ng
cDNA	~200ng (RNA相当)
Total	50 μl

#### 〈サイクル選定条件〉



### 一ロメモ② PCR産物のクローニングについて

KOD -Plus- Neoによって増幅されたDNAの末端は他のKOD -Plus-シリーズPCR酵素同様に平滑化されていますので、末端を制限酵素処理するか、平滑末端クローニングの手法を用いてクローニングを行う必要があります。また、専用のTAクローニングキット「TARget Clone™ -Plus- (Code No. TAK-201)」を用いることで、増幅産物に直接Aを付加し、そのまま容易にTAクローニングを行うことができます。本キットのパーツである10×A-attachment Mixには、抗KOD DNA polymerase抗体とTaq DNA polymeraseが含有されており、PCR終了後の未精製のPCR産物に添加、反応させることにより末端にAを付加し、そのまま添付のTベクターに連結することができます。また、10×A-attachment Mixのみの別売品 (Code No. TAK-301) をご使用いただくことで、任意のTベクターに産物をクローニングすることも可能です。



\* TARget Clone™ -Plus- (Code No. TAK-201) に含まれています。  
\*\*Ligation high Ver.2 (Code No. LGK-201) を推奨いたします。

## 実施例1 Total RNAからの様々な遺伝子の全長ORFの増幅

HeLa cell由来Total RNA 1 μgから合成したcDNA約50ngを使用して、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。サイクルは各酵素の最適条件にて、30サイクル行いました。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、すべてのORFを迅速にクローニングすることが可能でした。

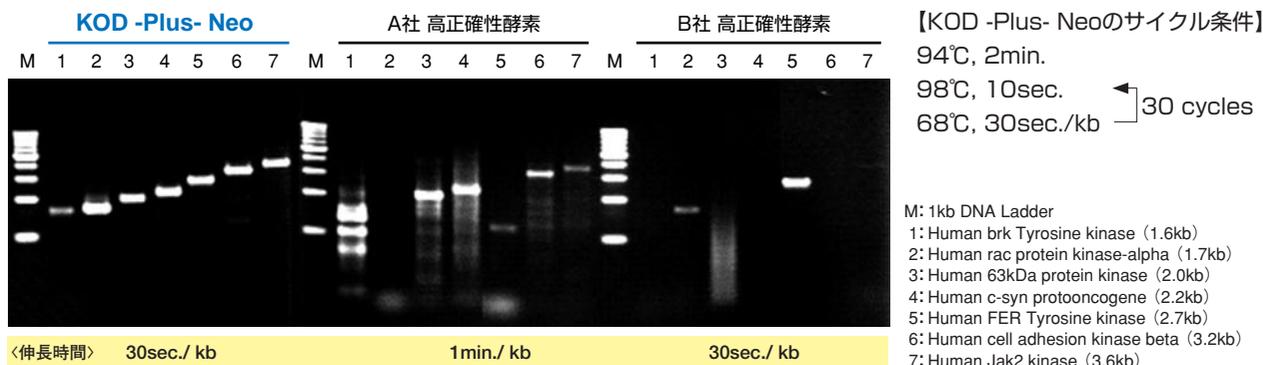


図4. 様々な遺伝子の全長ORFでの増幅効率比較

#### 【プライマー】

1 F : ATGGTGTCCCGGGACCAAGGCT R : GACCTCTGCTGGCTTCGTGTAC	3 F : ACTTGACAGAATGAGGTGCGCG R : ATCCTTCACTGTCTCTGCCAAC	5 F : AGACTTCACTGCACGTTTCTC R : TGGAGGACAGAGTCTGAAGGC	7 F : GCCCGATCTGTGTAGCCGGTTT R : ATCTTTGCTGGCTAGCATCAT
2 F : GTGCAGCTGGTGATCAGAG R : GCGTGGCTTCTCAAATGCAC	4 F : GTAGAGGCGAGGTTGTTGTGCG R : CAGAGGAGGTTCCGATTTGGGG	6 F : ACTGCAATGTGCCGATCTTAGC R : TGCAAAGTGCAAGGGAAGGT	

## 実施例2 微量Templateからの増幅

HeLa cell由来Total RNA 1μgから合成したcDNA 0.5 ngをサンプルとして、レア発現遺伝子として知られている4種類の遺伝子を増幅し、増幅効率を比較しました。増幅条件は各PCR試薬の最適条件を用い、40サイクルにて増幅を行いました。その結果、KOD -Plus- Neoのみ4種類の遺伝子すべてについて効果的な増幅を認めることができました。

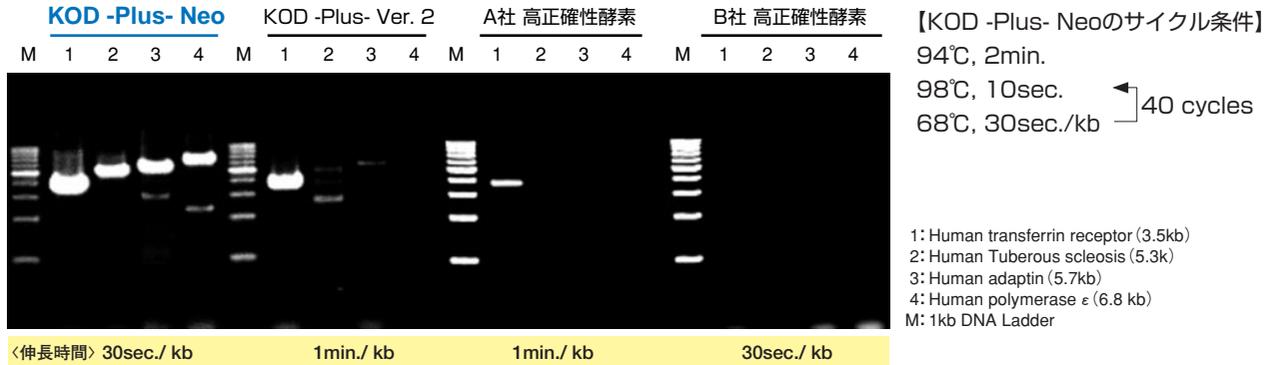


図5. 微量Templateからの増幅効率比較

## 実施例3 様々なサイズのターゲットにおける増幅効率・伸長性の比較

Human genomic DNA 50ngを用いて様々なサイズのβ-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を用いた場合でのみ、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、17.5kb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認められました。

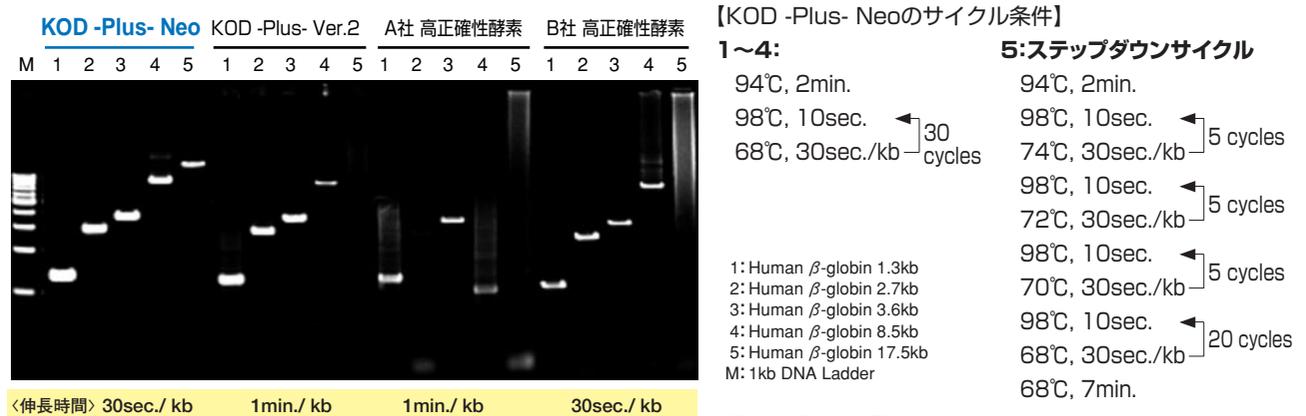


図6. 増幅効率・伸長性の比較

品名および内容	包装*	保存温度	Code No.	価格	キャンペーン価格
高正確・高効率・高速PCR酵素 <b>KOD -Plus- Neo</b> KOD -Plus- Neo (1U/μl) 10×Buffer for KOD -Plus- Neo 2mM dNTP 25mM MgSO <sub>4</sub>	200U×1本 [200回用]	-20℃	KOD-401	¥30,000	¥18,000
	(200U×1本)×5 [1,000回用]	-20℃	KOD-401X5	¥120,000	対象外

\*50μl反応を行ったときの反応回数で表示しています。

### 関連商品

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
高正確性PCR酵素 <b>KOD -Plus-</b>	200U×1本 [200回用]	-20℃	KOD-201	¥30,000
高正確性PCR酵素 (正確性をそのままにPCR成功率UP) <b>KOD -Plus- Ver.2</b>	200U×1本 [200回用]	-20℃	KOD-211	¥32,000
高成功率PCR酵素 <b>KOD FX</b>	200U×1本 [200回用]	-20℃	KFX-101	¥35,000
高効率TAクローニングキット (KOD用) <b>TARget Clone™ -Plus-</b>	10回用	-20℃	TAK-201	¥16,000
TAクローニング用A付加試薬 (KOD専用) <b>10×A-attachment Mix</b>	25μl×1本 [25回用]	-20℃	TAK-301	¥12,000
高効率ライゲーションキット <b>Ligation high Ver.2</b>	750μl×1本 [100回用]	-20℃	LGK-201	¥22,000