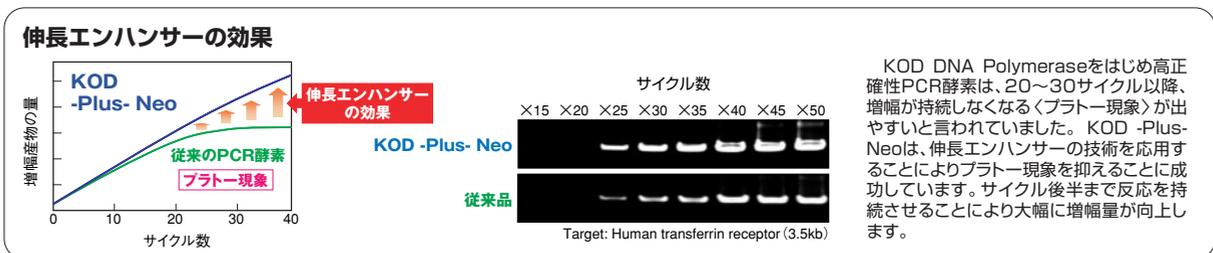


## 高正確・高効率・高速PCR酵素『KOD -Plus- Neo』を用いたPCR増幅例

東洋紡績（株） 敦賀バイオ研究所 小林 哲大

### はじめに

『KOD -Plus- Neo』は、『KOD DNA Polymerase』に弊社独自の技術である『伸長エンハンサー』を添加することにより開発されたPCR酵素です。従来の『KOD -Plus-』シリーズの優れた正確性 (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。そのため、『KOD -Plus- Neo』を用いることにより、レアな遺伝子や長いターゲットを正確かつ確実に、増幅することが可能です。また、『KOD -Plus- Neo』では、伸長反応を従来の1 min./kbから30sec./kbに短縮することができるため、PCRに要する時間を大幅に短縮することが可能です。



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。KOD -Plus- Neoは、伸長エンハンサーの技術を応用することによりプラトー現象を抑えることに成功しています。サイクル後半まで反応を持続させることにより大幅に増幅量が向上します。

今回は、この『KOD -Plus- Neo』を用いて、従来品や他社の高正確性酵素と比較を行いました。以下に、その方法及び結果をご紹介します。

### 方法

#### (1) テンプレート

PCRのテンプレートにはHuman genomic DNA、またはHeLa Total RNAから調製したcDNA (弊社のReverTra Ace- $\alpha$ <sup>®</sup>; Code No. FSK-101を用いて調製) を使用しました。

#### ② PCRサイクル

94°C, 2 min.  
98°C, 10 sec. ← 30 cycles (実施例1) or  
68°C, 30 sec./kb ← 40 cycles (実施例2)

※KOD -Plus- Neoは上記の2ステップサイクルに至適化されています。Tm値が63°C以上の場合は2ステップサイクルを実施してください。

#### (2) PCR反応

PCR反応は、以下の条件にて実施しました。

##### ① 反応液組成

PCR grade water	32	$\mu$ l
10×PCR buffer for KOD -Plus- Neo	5	$\mu$ l
2 mM dNTPs	5	$\mu$ l
25 mM MgSO <sub>4</sub>	3	$\mu$ l
10 pmol / $\mu$ l Primer #1	1.5	$\mu$ l
10 pmol / $\mu$ l Primer #2	1.5	$\mu$ l
50 ng Human Genomic DNA (実施例1) or 0.5 ng (RNA相当量) / $\mu$ l cDNA (実施例2)	1	$\mu$ l
KOD -Plus- Neo (1.0 U/ $\mu$ l)	1	$\mu$ l
Total reaction volume	50	$\mu$ l

94°C, 2 min.  
98°C, 10 sec. ← 5 cycles  
74°C, 9 min. ← 5 cycles  
98°C, 10 sec. ← 5 cycles  
72°C, 9 min. ← 5 cycles  
98°C, 10 sec. ← 5 cycles  
70°C, 9 min. ← 20 cycles  
98°C, 10 sec. ← 20 cycles  
68°C, 9 min. ← 20 cycles

(実施例1 Human  $\beta$ -globin 17.5kbの増幅のみ)

※長鎖増幅の場合は、上記のステップダウンのサイクルを行うことで増幅量が増えることがあります。

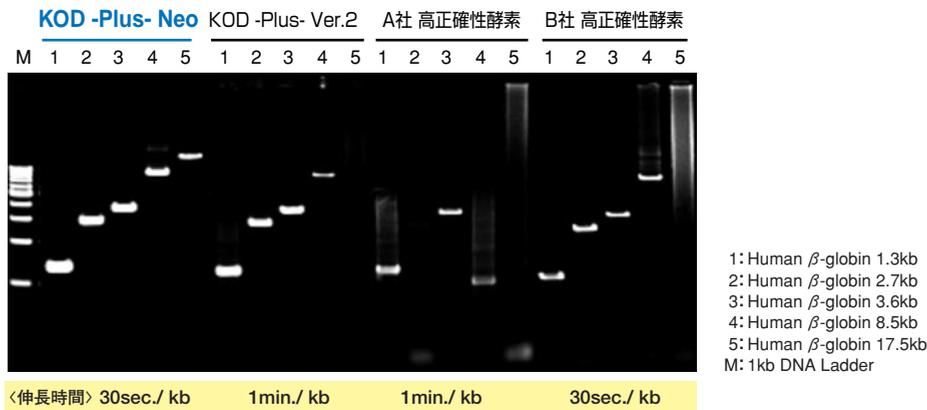
他の高正確性PCR酵素は取扱説明書推奨の条件にてPCRを実施し、比較を行いました。

	Target	増幅サイズ	配列	長さ	Tm (°C)	GC%
実施例1	1 Human $\beta$ -globin	1.3 kb	#1: TTAGGCCTTAGCGGGCTTAGAC #2: CCAGGATTTTTGATGGGACACG	22 mer 22 mer	66.2 69.2	54.5 50.0
	2 Human $\beta$ -globin	2.7 kb	#1: GCTGCTCTGTGCATCCGAGTGG #2: CCAGGATTTTTGATGGGACACG	22 mer 22 mer	73.5 69.2	63.6 50.0
	3 Human $\beta$ -globin	3.6 kb	#1: GGTGTTCCCTTGATGTAGCACA #2: ACATGTATTTGCATGGAAAACAAC	22 mer 26 mer	65.9 65.5	50.0 34.6
	4 Human $\beta$ -globin	8.5 kb	#1: TGATAGGCACTGACTCTCTGTCCCTTGGGCTGTTT #2: ACATGATTAGCAAAGGGCCTAGCTTGGACTCAGA	35 mer 35 mer	79.6 76.9	51.4 45.7
	5 Human $\beta$ -globin	17.5 kb	#1: TGCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCACAGTC #2: ACATGATTAGCAAAGGGCCTAGCTTGGACTCAGA	35 mer 35 mer	77.5 76.9	48.6 45.7
実施例2	1 Human transferrin receptor	3.5 kb	#1: CCACCATCTCGGTTCATCAGGATTGCCT #2: TACTCCTTAACGAGAAAGACATCTCAAGAC	27 mer 29 mer	77.2 65.6	55.6 41.4
	2 Human Tuberosus scleosis	5.3 kb	#1: GGAGTTTATCATCCCGCGAAACTGAGAG #2: TATTTCACTGACAGGCAATACCGTCCAAGG	32 mer 30 mer	74.2 74.2	46.9 46.7
	3 Human adaptin	5.7 kb	#1: ACCATCTTTGTCCCTGGCAAAGTGG #2: GACGAAGACACAAGTCAAGCTTCC	25 mer 25 mer	73.2 69.8	52.0 52.0
	4 Human polymerase $\epsilon$	6.8 kb	#1: CACTTCTCAGTTTCGGCACTCAAGCG #2: CTTTGCAGCAGCCACTCCAGGGTCTC	27 mer 27 mer	76.2 77.6	55.6 63.0

※ プライマーは22~35mer (Tm値>63°C) で設計してください。長めのプライマーを用いることで特異性があり、PCR成功率が向上することがあります。

結果及び考察

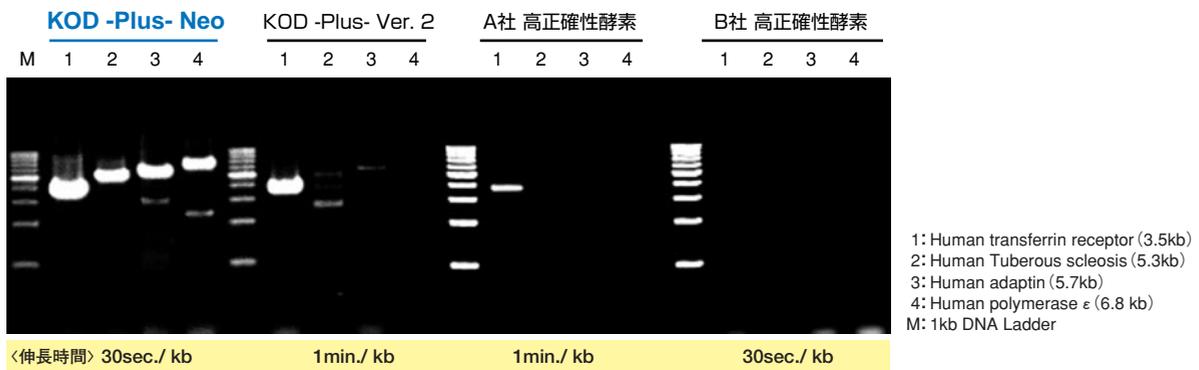
実施例1 様々なサイズの遺伝子を増幅した増幅量・伸長性の評価



Human  $\beta$ -globin遺伝子をターゲットとし、様々なサイズの増幅を試みました。PCR産物を、1%アガロースゲルに5 $\mu$ lアプライして解析を行った結果、KOD -Plus- Neo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、他の高正確性酵素を上回る収量が確認され、KOD -Plus- Neoが増幅量・伸長性共に最も優れていることが示されました。KOD -Plus- Neoを用いれば、正確にかつ他の高正確性酵素では伸長できない長いターゲットの増幅が可能になると考えられます。

実施例2 微量テンプレートを鋳型とした増幅効率の評価



cDNA 0.5ng (RNA相当分) を用いて4種類の遺伝子を増幅し、増幅効率を比較しました。PCR条件は40サイクルにて増幅を行い、PCR産物を、1%アガロースゲルに5 $\mu$ lアプライして解析を行いました。その結果、KOD -Plus- Neoのみ4種類の遺伝子すべてについて、微量テンプレートから効果的な増幅を確認でき、5kb以上の長鎖ターゲットにおいても優れた増幅効率を持つことが示されました。

KOD -Plus- Neoは通常より多めのサイクル数をかけることが可能であるため、他の高正確性酵素では不可能だったレア遺伝子等の微量のテンプレートからの増幅に利用することができます。

まとめ

KOD -Plus- Neoは、他の高正確性酵素に比べ、増幅量が多く、伸長性も大幅に向上しています。クローニングをはじめ高い正確性が必要な場面で、増幅が見られない、増幅が少ないといった問題解決にはぜひ、KOD -Plus- Neoを一度お試しください。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
高正確・高効率・高速PCR酵素 KOD -Plus- Neo KOD -Plus- Neo (1U/ $\mu$ l) 10 $\times$ Buffer for KOD -Plus- Neo 2mM dNTP 25mM MgSO <sub>4</sub>	200U $\times$ 1本 [200回用*]	-20 $^{\circ}$ C	KOD-401	¥30,000
	(200U $\times$ 1本) $\times$ 5 [1,000回用*]	-20 $^{\circ}$ C	KOD-401X5	¥120,000

\*50 $\mu$ l反応を行ったときの反応回数で表示しています。