

# HOT ITEM

## 高効率・高成功率PCR酵素 KOD FX Neo

難配列・Long PCR・  
クールドサンプルにお勧め

伸長性・クールドサンプルからの増幅性能が格段にアップしました。

KOD DNA polymerase\*は、優れた伸長性を有し、クールド成分の阻害に強いといった特長を持っております。KOD FXは、この特性を利用して開発された高成功率PCR酵素であり、難配列やクールドサンプルからの増幅などにご好評いただいております。

しかし、KOD FXをはじめ従来の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〉が生じ、PCR機能が完全には発揮できていませんでした。「KOD FX Neo」は、KOD FXの技術に、弊社で新たに開発した「伸長エンハンサー」などの技術を応用することで、〈プラトー現象〉を抑え、長いターゲットや難配列ターゲット、クールドサンプルなどからの増幅効率をさらに向上させることに成功しました。

\* M. Takagi et al., Appl. Environ. Microbiol., 63 : 4504-4510 (1997)

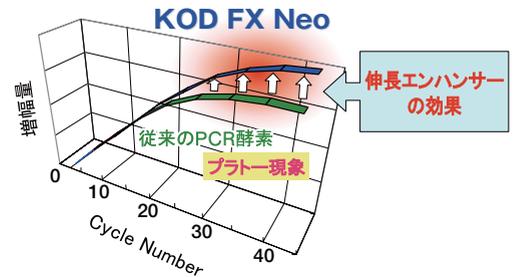


図1. 伸長エンハンサーの効果

### 特長1 ▶ 優れたPCR性能

- ・ゲノムDNAを鋳型として最大40kbの増幅が可能。
  - ・30sec./kbの高速サイクルを実現。(クールドサンプルでは1min./kbをお薦めしております)
  - ・高GCターゲットなどの難配列の増幅に最適。
- ※正確性はTaq DNA Polymeraseの約1.1倍

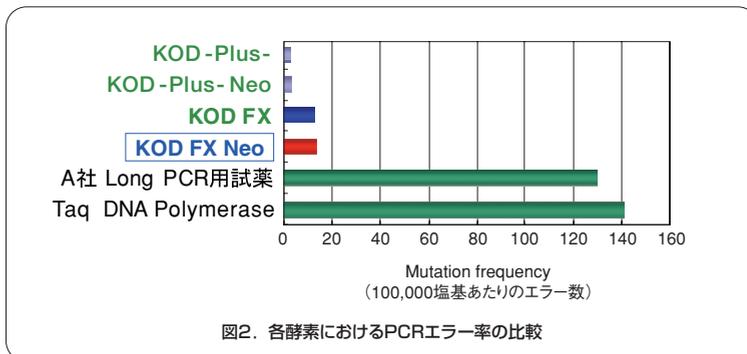


図2. 各酵素におけるPCRエラー率の比較

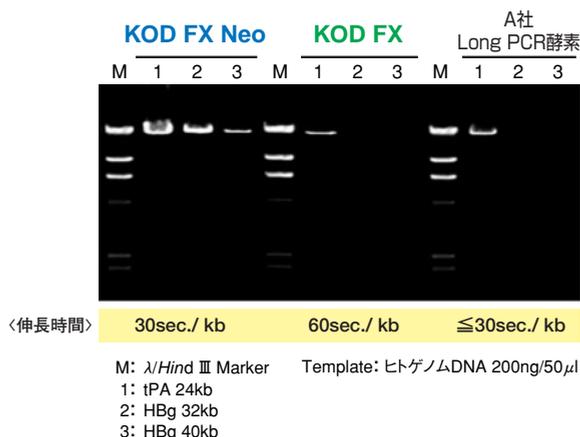


### 実施例1 ▶ 増幅長の比較

KOD FX Neo及び従来品を用いて、ヒトゲノムDNAを鋳型に長鎖ターゲットの増幅を行いました。

その結果、KOD FX Neoを用いた場合のみ、今まで増幅が困難であった40kbの増幅を確認することができました。また、KOD FX Neoでは従来品に比べ、伸長時間を半分(30sec./kb)で行うことが可能です\*。そのため、反応時間を大幅に短縮することができました。

\*クールドサンプルでは1min/kbで実施することをお薦めしております。



#### 【サイクル条件】

#### KOD FX Neo

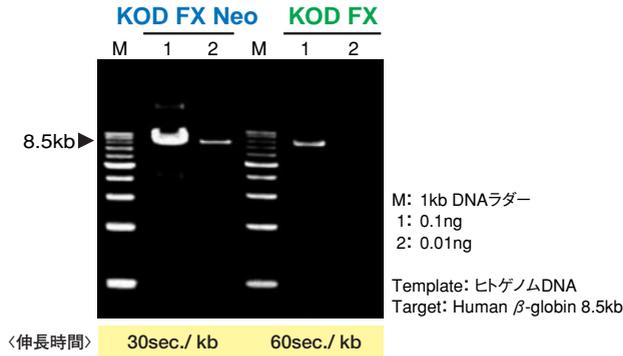
- 94°C, 2min.
- 98°C, 10sec. ← 5 cycles
- 74°C, 30sec./kb
- 98°C, 10sec. ← 5 cycles
- 72°C, 30sec./kb
- 98°C, 10sec. ← 5 cycles
- 70°C, 30sec./kb
- 98°C, 10sec. ← 5 cycles
- 68°C, 30sec./kb ← 20 cycles
- 68°C, 7min.
- 4°C, Hold

#### KOD FX

- 94°C, 2min.
- 98°C, 10sec. ← 5 cycles
- 74°C, 60sec./kb
- 98°C, 10sec. ← 5 cycles
- 72°C, 60sec./kb
- 98°C, 10sec. ← 5 cycles
- 70°C, 60sec./kb
- 98°C, 10sec. ← 5 cycles
- 68°C, 60sec./kb ← 20 cycles
- 68°C, 7min.
- 4°C, Hold

## 実施例2 検出感度の比較

ヒトゲノムDNAを鋳型として検出感度の比較を行いました。その結果、KOD FX Neoは、従来品に比べ約一桁感度の向上を認めました。



【サイクル条件】  
**KOD FX Neo**  
 94°C, 2min.  
 98°C, 10sec. ← 40 cycles  
 68°C, 4.5min.  
 4°C, Hold  
**KOD FX**  
 94°C, 2min.  
 98°C, 10sec. ← 40 cycles  
 68°C, 9min.  
 4°C, Hold

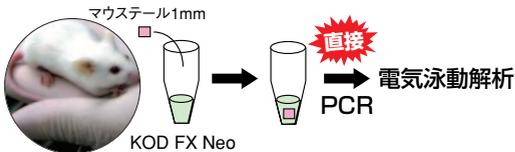
## 特長2 クルードサンプルからの増幅性能アップ

- ・グラム陽性菌や酵母・カビなどの微生物、髪の毛・爪などの動物組織、哺乳類培養細胞や血液などからの直接PCRが可能です。
- ・従来品よりもPCR阻害物質に強く、土壌や食品などのよりクルードなサンプルからの増幅が可能です。
- ・植物ライセートやマウステールなどからの増幅効率が向上。

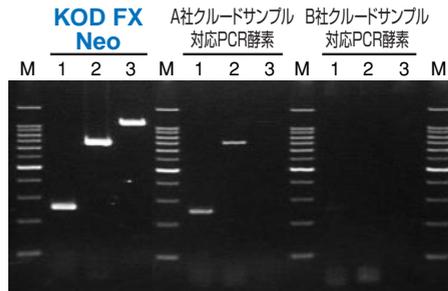
## 実施例3 マウステールの直接PCR

マウステールを直接PCR反応液に添加し、様々なPCR酵素で増幅を比較しました。その結果、KOD FX Neoを用いた場合のみ増幅を確認することができました。

このように、KOD FX Neoではサンプルを直接PCRに持ち込むことが可能であり、煩雑な精製を省略することが可能です。



\*マウステールなど動物組織を直接増幅した場合、PCR産がアガロースゲル電気泳動のウェルに残ることがあります。泳動する際は、PCR産物50μlに対し、20mg/ml Proteinase K 10μlを添加してから泳動することをお薦めします。



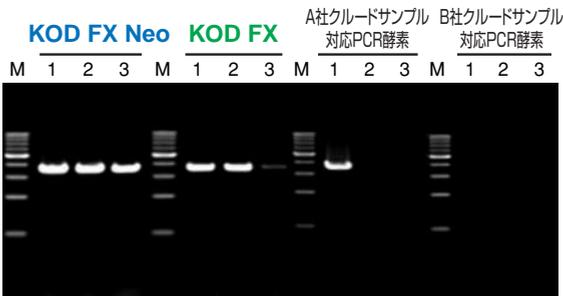
【サイクル条件】  
 94°C, 2min.  
 98°C, 10sec. ← 30 cycles  
 68°C, 1min./kb  
 4°C, Hold

M: 200 bp DNAラダー  
 1: Mouse TATA box binding protein (TBP) 0.5 kb  
 2: Mouse transferrin receptor (Tfr) 1.5 kb  
 3: Mouse membrane glycoprotein (Thy-1) 2.6 kb

## 実施例4 フミン酸添加実験

フミン酸 (humic acid) とは、腐植土や土壌などに存在する赤褐色または黒褐色の有機物であり、PCRを阻害することが知られています。通常行われるDNAの精製ではこのフミン酸は除くことはできません。そのため、環境・生態系サンプルを鋳型としたPCRはとても難しいとされています。ここでは、例としてヒトゲノムDNAにフミン酸を混合し、PCRの阻害に関する評価を行いました。その結果、KOD FX Neoが最もフミン酸の阻害に強い傾向を示しました。KOD FX Neoを用いれば環境・生態系のサンプルからでもPCRが可能であると考えられます。

(関連記事がp5にございます)



M: 1kb DNAラダー  
 1: フミン酸添加量\* 0μl  
 2: フミン酸添加量\* 2μl  
 3: フミン酸添加量\* 4μl

Template: 10ngヒトゲノムDNA  
 Target: Human β-globin 3.6kb

\*フミン酸: OD280=1の溶液を使用

【サイクル条件】  
 94°C, 2min.  
 98°C, 10sec. ← 30 cycles  
 68°C, 4min.  
 4°C, Hold

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
高効率・高成功率PCR酵素 <b>KOD FX Neo</b> KOD FX Neo (1.0U/μl) 2×PCR Buffer for KOD FX Neo 2mM dNTP	200U×1本 [200回用]*	-20°C	KFX-201	¥35,000
	(200U×1本)×5 [1,000回用]*	-20°C	KFX-201X5	¥140,000
	(200U×1本)×10 [2,000回用]*	-20°C	KFX-201X10	¥260,000

\*50μl反応を行ったときの反応回数で表示しています。

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
高効率TAクローニングキット (KOD用) <b>TArget Clone™ -Plus-</b>	10回用	-20°C	TAK-201	¥16,000

KOD FX Neoによって増幅されたDNAの末端は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。