高成功率PCR酵素

KOD FX

実施例集

PCR実験にお困りの方、是非ご一読ください

難配列ターゲットの増幅

クルードサンプルからの増幅（DNA精製なし）

Contents

Ⅰ KOD FXの特性 1

Ⅱ PCR諸条件について 2

Ⅲ 実施例

基本編

GC含量の高いターゲットの増幅例 3

増幅効率の比較 3

増幅可能鎖長 4

正確性 4

応用編

■クルードサンプルからのPCR

全血サンプルからの増幅例（血液を直接サンプルとして使用） 5

トランスジェニックラット血液（ろ紙血）からのGFP遺伝子の検出 6

培養細胞からの増幅例（細胞懸濁液を直接サンプルとして使用） 7

コロニーダイレクトPCRによる酵母形質転換の確認 8

■クルードライセートからのPCR

アルカリ溶解法で調製したマウステールライセートからの増幅例 9

マウステールライセートを直接用いたトランスジェニックマウスのジェノタイピング 10

ワンステップ法で調製した植物ライセートからの増幅例 11

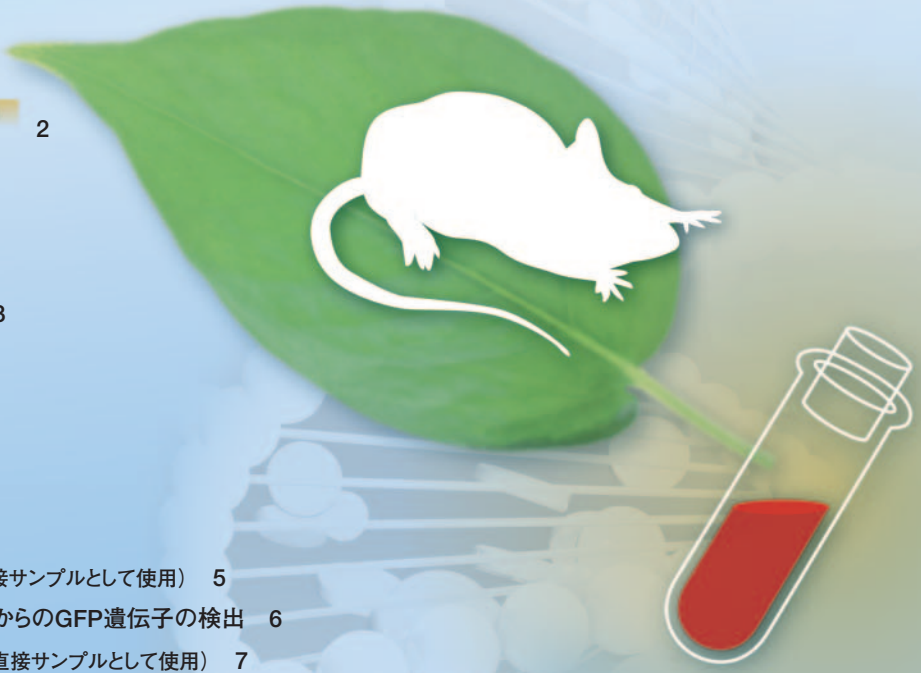
■難増幅ターゲットの増幅

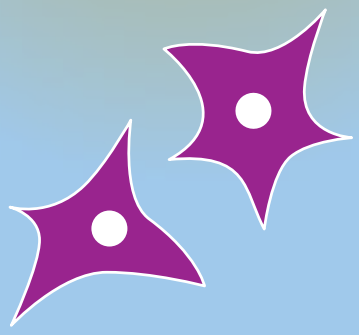
ヒト糞便から精製したDNAを用いた*Helicobactor pylori cagA*遺伝子の増幅 12

ヒトジストロフィン遺伝子の増幅とクローニング 13

Ⅳ FAQ 14

Ⅴ KOD FX、及び関連商品プライスリスト 15





TOYOBO

0815

I KOD FXの特性

『KOD　FX』は、様々な優れた特性を有するPCR酵素『KOD　DNA Polymerase』をベースに開発された高性能PCR試薬です。本酵素は、優れた「増幅成功率」、「増幅効率」、「伸長性」を示し、幅広いPCRにおいて確実にPCR産物を得ることができます。KOD -Plus-やKOD -Plus- Ver.2がKOD　DNA　polymeraseの高い正確性に着目して開発されたのに対し、本酵素は「増幅成功率」、「増幅効率」、「伸長性」を重視して開発された酵素であるといえます（図1）。

特に、KOD FXのその優れた「増幅成功率」は、クルードなサンプルを鋳型に用いる場合においても発揮され、全血や培養細胞等を直接PCR反応液に添加しても、十分な増幅が得られることを確認しています。すなわち、従来、サンプルからDNAを一旦精製してから行っていたようなPCR実験も、『KOD　FX』を用いることによって、煩雑なDNAの精製が不要になったり、簡単なサンプルの前処理のみでPCR実験が可能になります。

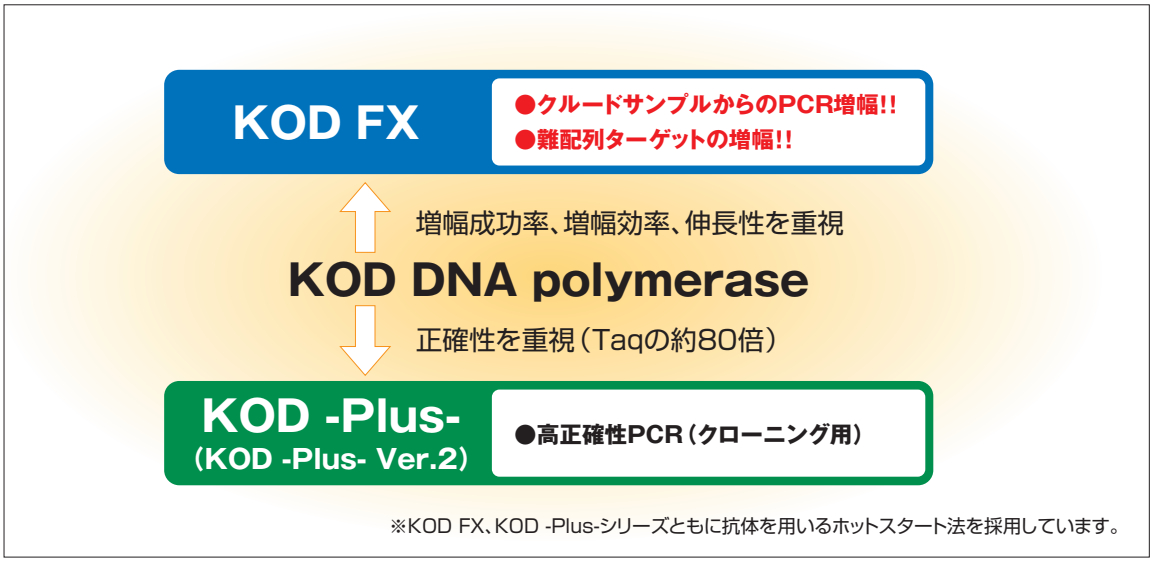


図1. KOD DNA polymeraseを用いた試薬

KOD FXのPCR産物は、高正確性PCR酵素KOD -Plus-やKOD -Plus- Ver.2と同じく、KOD DNA polymeraseの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の作用により、末端が平滑化されているため、平滑末端クローニングの方法に従ってクローニングする必要があります。当然、通常の方法を用いてはTAクローニングすることはできません。よって、KOD -Plus-やKOD -Plus- Ver.2と同様に、KOD FXのPCR産物をTAクローニングする場合は、専用のTAクローニングキット『TArget Clone™ -Plus-（Code No. TAK-201）』を用いる必要があります。

TArget Clone™ -Plus-には、TベクターとDNAリガーゼとは別に、10×A-attachment mixが含まれています。この10×A-attachment mixには、抗KOD DNA polymerase抗体とTaq DNA polymeraseが含まれているため、未精製のPCR産物にこの試薬を添加して、60℃・10分間加温することで容易に3'末端にdAを付加することができ、付加反応の後、産物をそのままTベクターとライゲーションさせることができます。また、お手持ちのTベクターにクローニングしたい場合は、別売りの10×A-attachment mix（Code No. TAK-301）を用いることで効果的にKOD FXのPCR産物をTAクローニングすることができます。

【KOD DNA polymeraseに関する参考文献】

1）Takagi M, Nishioka M, Kakihara H, Kitabayashi M, Inoue H, Kawakami B, Oka M, and Imanaka T., *Appl Environ Microbiol*., **63**: 4504-10（1997）
2）Hashimoto H, Nishioka M, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T, Inoue T and Kai Y, *J Mol Biol*., **306**: 469-77（2001）
3）Mizuguchi H, Nakatsuji M, Fujiwara S, Takagi M and Imanaka T, *J Biochem*., **126**: 762-8（1999）

Ⅱ PCR諸条件について

(1) 反応液組成

滅菌蒸留水	X μl	
2x PCR buffer for KOD FX	25 μl	
2mM dNTPs	10 μl	(0.4mM)
10pmol /μl Primer F	1.5 μl	(0.3μM)
10pmol /μl Primer R	1.5 μl	(0.3μM)
KOD FX (1.0U/μl)	1 μl	(1U)
Genomic DNA	～200ng	
Plasmid DNA	～50ng	
cDNA	～200ng (RNA相当)	
クルードサンプル	～ 2 μl	
〈ワンステップ法の植物ライセートは1 μl〉		
Total	50 μl	

※KOD FXは、クルードサンプルに対して高い耐性を持ちますが、増幅が見られない場合は、サンプル量をより少なくし、PCR阻害物質の持込を最小限にされることをお薦めいたします。

(2) プライマー条件

プライマーは22mer以上のもののご使用をお薦めします。また、10 kb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)にプライマー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、脱塩グレードなどの精製度の低いプライマーを用いるとスメアや非特異増幅の原因となることがあるため、カートリッジ精製、もしくはHPLC精製グレードのプライマーのご使用をお薦めします。

(3) サイクル条件

以下の3種類のサイクル条件をお薦めします。プライマーは少なくとも22mer程度のものを使用されることをお薦めしますが、プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップサイクルを用いて検討を進めてください。

クルードサンプルを用いられる場合は、2ステップよりも3ステップサイクルの方が安定した結果が得られる場合があります。また、通常30サイクルで十分な増幅が得られますが、クルードサンプルからの場合、ターゲット長やサンプルによっては増幅が低下する場合があります。そのような場合は、35～40サイクル程度までサイクル数を増やすことにより、良好な結果が得られることがあります。

[2ステップサイクル] *

94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ┐ 25～40 cycles
68℃, 1 min./kb ┘

[3ステップサイクル]

94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ┐
(Tm-5)℃, 30 sec. ├ 25～40 cycles
68℃, 1 min./kb ┘

[ステップダウンサイクル] *

94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ┐ 5 cycles
74℃, 1 min./kb ┘
98℃, 10 sec. ┐ 5 cycles
72℃, 1 min./kb ┘
98℃, 10 sec. ┐ 5 cycles
70℃, 1 min./kb ┘
98℃, 10 sec. ┐ 15～25 cycles
68℃, 1 min./kb ┘
68℃, 7 min.

注意
*プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

(4) マルチプレックスPCR

プライマーを等モルで添加した場合、どちらかのターゲットが増幅しすぎてしまうことがあります。その場合、添加するプライマーの量を検討してください。一般的には、増幅の悪かった方のターゲットのプライマー量を1.5倍程度に増やし、サイクル数を若干少なくする方向で検討することで良好な結果が得られることがあります。

(5) クルードサンプルからの増幅

KOD FXはクルードサンプルからの増幅に向きます。詳細はⅢ実施例をご覧ください。SDSやProteinase Kなどを用いて調製したライセートを直接サンプルとして用いると、酵素活性が低下し、PCR効率が極端に低下することがありますのでご注意ください。

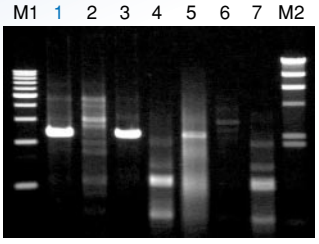
Ⅲ 実施例

基本編

1 GC含量の高いターゲットの増幅例

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る可能性があります。

●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

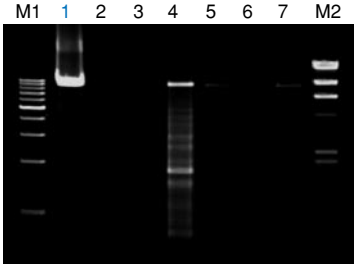
ターゲット
TGF-β 2.3kb

サイクル
94℃ 2 min.
98℃ 10 sec. ┐ 30 cycles
68℃ 2.5 min. ┘
※プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

鋳　型 ヒトゲノムDNA 10ng／50μl Reaction

プライマー配列 Primer F: 5'-CATTTCCAGGTGTGGTCCCAGGACAGC-3'
Primer R: 5'-GTTGTGGGTTTCCACCATTAGCACGC-3'

●ヒト IGF2R 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

ターゲット
IGF2R[NM_000876] 8.9kb

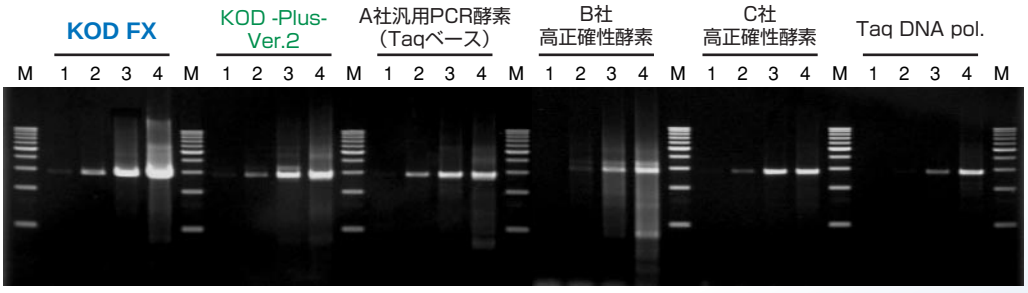
サイクル
94℃ 2 min.
98℃ 10 sec. ┐ 30 cycles
68℃ 9 min. ┘
※プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

鋳　型 ヒトcDNA（HeLa Total RNA 50ng相当）／50μl Reaction

プライマー配列 Primer F: 5'-TCCCGCTCCGTCTCCACCTCCGC-3'
Primer R: 5'-CAGGGCGGTTTGCTTCTCAGCAATAGA-3'

2 増幅効率の比較

KOD FXでは、少ない鋳型量からでも優れた増幅能力を示します。



M：1kb DNA ラダー
1：鋳型量 0.1ng
2： 1ng
3： 10ng
4： 100ng

鋳　型 ヒトゲノムDNA 0.1ng～100ng／50μl Reaction

ターゲット β-globin 2.8kb

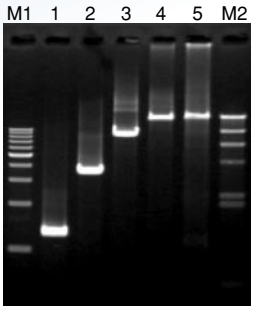
プライマー配列 Primer F: 5'-GCTGCTCTGTGCATCCGAGTGG-3'
Primer R: 5'-CCAGGATTTTTGATGGGACACG-3'

サイクル
94℃ 2 min.
98℃ 10 sec. ┐ 30 cycles
68℃ 3 min. ┘
※プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。
※他社酵素につきましては、各推奨条件を用いました。

3 増幅可能鎖長

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。

●Template: ヒトゲノムDNA



M1: 1kb DNA Ladder
1: β-globin 1.3kb
2: β-globin 3.6kb
3: β-globin 8.5kb
4: β-globin 17.5kb
5: tPA 24.0kb
M2: λ／*Hin*d Ⅲ digest

鋳　型

ヒトゲノムDNA 50～200ng / 50μl Reaction

サイクル

94℃ 2 min.
98℃ 10 sec. ┐ 30 cycles
68℃ 1 min./kb ┘

※プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

プライマー配列

1.3 kb β-globin Target
Primer F: 5'-TTAGGCCTTAGCGGGCTTAGAC-3'
Primer R: 5'-CCAGGATTTTTGATGGGACACG-3'

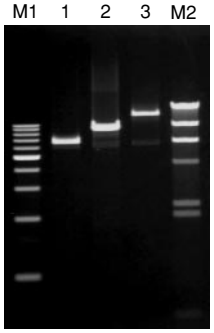
3.6 kb β-globin Target:
Primer F: 5'-GGTGTTCCCTTGATGTAGCACA-3'
Primer R: 5'-ACATGTATTTGCATGGAAAACAACTC-3'

8.5 kb β-globin Target:
Primer F: 5'-TGATAGGCACTGACTCTCTGTCCCTTGGGCTGTTT-3'
Primer R: 5'-ACATGATTAGCAAAAGGGCCTAGCTTGGACTCAGA-3'

17.5 kb β-globin Target:
Primer F: 5'-TGCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC-3'
Primer R: 5'-ACATGATTAGCAAAAGGGCCTAGCTTGGACTCAGA-3'

24 kb tPA Target:
Primer F: 5'-CCTTCACTGTCTGCCTAACTCCTTCGTGTGTTCC-3'
Primer R: 5'-TGTCTCCAGCACACAGCATGTTGTCGGTGAC-3

●Template:逆転写反応液（cDNA）



M1: 1kb DNA Ladder
1: Human polymerase (DNA directed), epsilon [NM_006231] 6.8kb
2: Human insulin-like growth factor 2 receptor [NM_000876] 8.9kb
3: Human dystrophin [NM_004006] 13.5kb
M2: λ／*Hin*d Ⅲ digest

鋳　型

逆転写反応液（total RNA100ng相当）/ 50μl Reaction

サイクル

94℃ 2 min.
98℃ 10 sec. ┐ 30 cycles
68℃ 1 min./kb ┘

※プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

プライマー配列

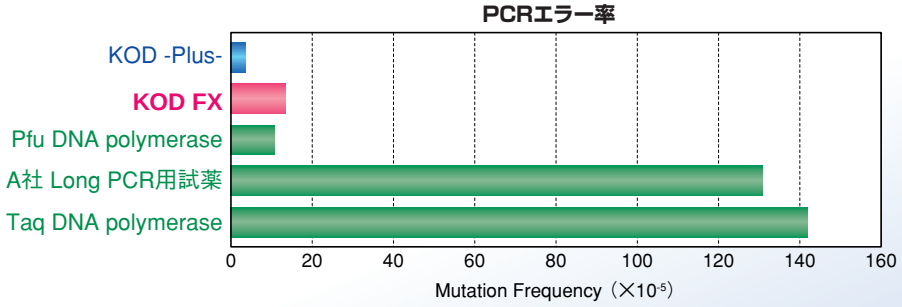
6.8 kb DNA Polymerase Epsilon Catalytic Subunit Target
Primer F: 5'-CACTTCCTCAGTTTCGGCACTCAAGCG-3'
Primer R: 5'-CTTCTGCAGCAGCCACTCCAGGGTCTC-3'

8.9 kb IGFR2 Receptor Target
Primer F: 5'-TCCCGCTCCGTCTCCACCTCCGC-3'
Primer R: 5'-CAGGGCGGTTTGCTTCTCAGCAATAGA-3'

13.5 kb Dystrophin Target
Primer F: 5'-GCCTACTGGAGCAATAAAGTTTGAAGAACTTTTACCAGG-3'
Primer R: 5'-CACAACACGAAATAATGTCCAAATTAATTATGC-3'

4 正確性

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、Taqや他社Long PCR用酵素の約11倍優れている値でした。



〈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、配列を確認しました。

➡p.13にLong Targetのクローニング例を掲載しています。

実施例 1 全血サンプルからの増幅例（血液を直接サンプルとして使用）

血液から抽出したDNAを用いる遺伝子解析が盛んに行われていますが、DNAを精製するステップはかなり煩雑です。そこで、血液を直接サンプルとして検討を行いました。

方　法

EDTA採血管によって採血したヒト全血（1～4μl）をサンプルとして、1.3 kbのβ-globin遺伝子の増幅を様々なPCR酵素を用いて行いました。また、KOD FXを用いて1.3～8.5 kbのβ-globin遺伝子の増幅を試みました。

ターゲット Human β-globin gene 1.3, 3.6, 8.5 kb

プライマー配列 p.4参照

反応液組成

滅菌蒸留水	X μl
2x PCR Buffer for KOD FX	25 μl
2mM dNTPs	10 μl
10pmol /μl Primer F	1.5 μl
10pmol /μl Primer R	1.5 μl
KOD FX（1.0U/μl）	1 μl
全血サンプル（EDTA採血）	1～4 μl
Total	50 μl

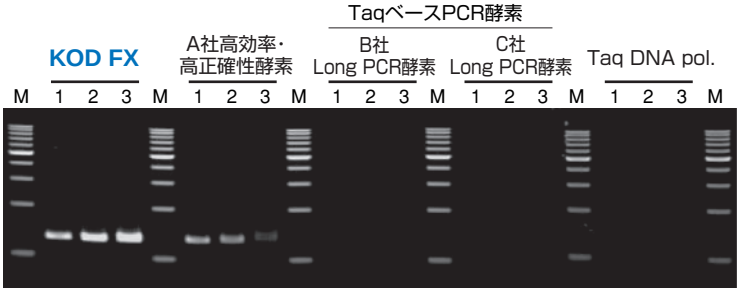
サイクル

94℃　2 min.
98℃　10 sec.
68℃　1 min./kb
30 cycles

※プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

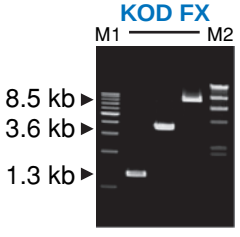
結　果

検討の結果、KOD FXを用いた場合のみ良好な増幅を確認することができました。また、KOD FXを用いて最大8.5 kbまでの増幅が可能でした。



M: 1kb DNA Ladder
〈サンプル〉
1: 血液　1 μl
2:　2 μl
3:　4 μl

※他社酵素につきましては、推奨条件を用いました。



M1: 1kb DNA Ladder
M2: λ／*Hin*d Ⅲ Marker
〈サンプル〉
血液　2 μl

考　察

KOD FXでは血液量にほぼ比例して増幅産物の増加が確認できたことから、今回の血液の添加量において、KOD FXは夾雑物によるPCR阻害をほとんど受けなかったことが示唆されます。よって、KOD FXは血液等を用いるジェノタイピングに適していると考えられます。

実施例 2 トランスジェニックラット血液（ろ紙血）からのGFP遺伝子の検出

【データご提供】生理学研究所 機能協関研究部門　安井尚美先生、佐藤かお理先生

小動物からの遺伝子解析のための採血は煩雑な作業です。今回、血液をろ紙にしみ込ませておき、それを直接サンプルとする簡便なPCR解析についてご紹介いたします。

方　法

ターゲット　eGFP gene 171 bp

プライマー配列*
Primer F: CACCATCTTCTTCAAGAACGAC
Primer R: ATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGT
［*参考文献　Ueta Y., et.al., *Endocrinology* **146**: 406−413（2005）］

サンプル　Wistar rat 3週令　血液

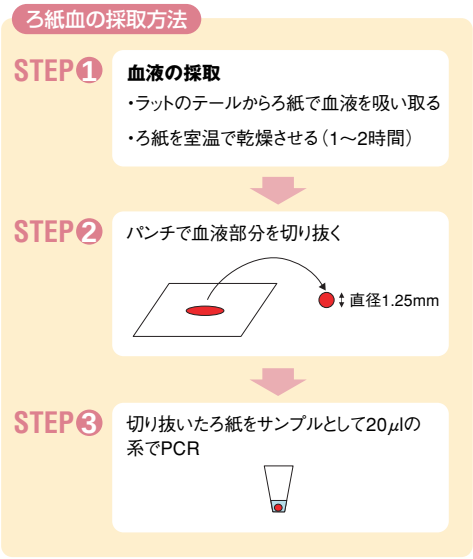
準備するもの　ろ紙はWhatman社
filter papter1または2　φ90mm

反応液組成

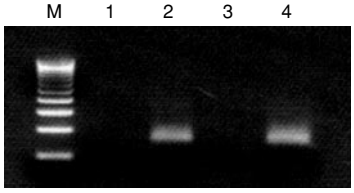
滅菌蒸留水	4.4 μl
2x PCR Buffer for KOD FX	10 μl
2mM dNTPs	4 μl
10pmol /μl Primer F	0.6 μl
10pmol /μl Primer R	0.6 μl
KOD FX（1.0U/μl）	0.4 μl
パンチで打ち抜いたろ紙血	1 枚
Total	20 μl

サイクル

94℃	2 min.	
98℃	10 sec.	30 cycles
60℃	30 sec.	
68℃	10 sec.	
68℃	20 sec.	



結　果



M: 100bp DNA Ladder
1: ネガティブサンプル1
2: ポジティブサンプル1
3: ネガティブサンプル2
4: ポジティブサンプル2

※ポジティブサンプルはポジティブラット、ネガティブサンプルはネガティブラットのろ紙血サンプルを用いています。

先生からのコメント

テールを切ったときに出る血液をろ紙につけるだけでよいため、血液や尻尾そのものをサンプルとしてチューブに採取する作業よりもずっと早く、楽にできた。バンドも非特異的なものが出ることなく、非常に濃くきれいに検出できた。

実施例 3 培養細胞からの増幅例（細胞懸濁液を直接サンプルとして使用）

培養した動物細胞のDNAを用いて遺伝子解析する場合、DNAの精製は大変手間のかかる煩雑なステップです。そこで、培養細胞を直接サンプルとして用いるPCR法ついて検討を行いました。

方　法

DMEM/10%血清培地を用いて培養したJurkat細胞を直接サンプルとして、1.3～8.5 kbのβ-globin遺伝子の増幅を試みました。

ターゲット Human β-globin gene 1.3, 3.6, 8.5 kb

プライマー配列 p.4参照

反応液組成

滅菌蒸留水	9 μl
2x PCR Buffer for KOD FX	25 μl
2mM dNTPs	10 μl
10pmol /μl Primer F	1.5 μl
10pmol /μl Primer R	1.5 μl
KOD FX（1.0U/μl）	1 μl
Jurkat Cells（1×10^4 cells /μl）	2 μl
Total	50 μl

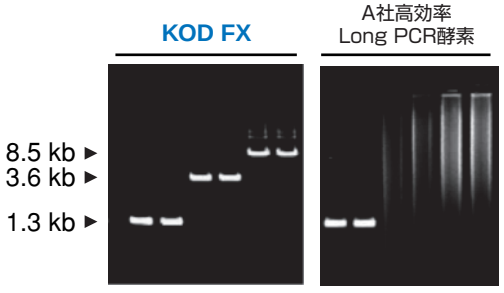
サイクル

94℃　2 min.
98℃　10 sec.
68℃　1 min./kb
30 cycles

※プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

結　果

検討の結果、KOD FXを用いた場合のみ良好な増幅を確認することができました。



※他社酵素につきましては、推奨条件を用いました。

考　察

KOD FXでは、すべてのサイズのターゲットを増幅できたことから、KOD FXは細胞由来の夾雑物によるPCR阻害をほとんど受けなかったことが示唆されます。よって、KOD FXは培養細胞を直接サンプルとして用いる遺伝子解析に適していると考えられます。

実施例 4 コロニーダイレクトPCRによる酵母形質転換の確認

【データご提供】奈良先端科学技術大学院大学 細胞機能学講座　浮辺健先生、大津厳生先生、高木博史先生

Y2Hなどを用いる遺伝子解析が盛んとなりましたが、酵母からのDNA抽出は煩雑なステップです。そこで、酵素処理した酵母および酵母コロニーを直接サンプルとして用いるPCRの検討を行いました。

方　法

ターゲット

【実験1】*Xanthophyllomyces dendrorous* からクローニングし、*Saccharomyces cerevisiae* Y187にプラスミドの状態で導入した配列4種（A-D）〈約3 kb〉

【実験2】他種酵母のcDNAライブラリー〈約500 bp～4 kb〉

プライマー配列

Primer F: 5'-CTATTCGATGATGAAGATACCC-3'
Primer R: 5'-AAATTGAGATGGTGCACGA-3'

サンプル

【実験1】*Saccharomyces cerevisiae* Y187のコロニーをつまようじで少量とり、Zymolyase®溶液（Zymolyase 2.5 mg/ml、10 mMリン酸ナトリウム緩衝液pH7.5、1.2 Mソルビトール）10 μlに懸濁し、37℃ 30分インキュベートした溶液を1μ

【実験2】他種酵母のcDNAライブラリーを導入した *Saccharomyces cerevisiae* Y187のコロニーを少量

プロトコール

【実験2*】

滅菌蒸留水	11 μl
2x PCR Buffer for KOD FX	25 μl
2mM dNTPs	10 μl
10 pmol/μl Primer F	1.5 μl
10 pmol/μl Primer R	1.5 μl
KOD FX（1U/μl）	1 μl
Total	50 μl

↓ ← 酵母コロニー（チップの先に少量）
PCR

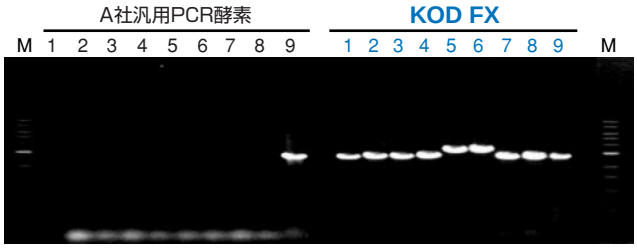
サイクル

94℃	4 min.	
98℃	10 sec.	30 cycles
60℃	30 sec.	
68℃	4 min.	

*実験1につきましては、滅菌蒸留水を10μlとして、サンプルを1μl添加して行いました。

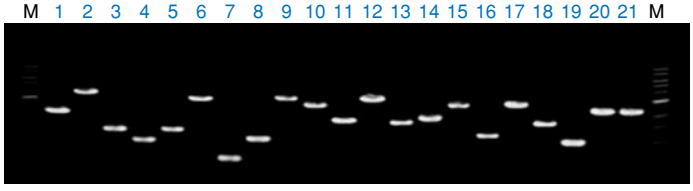
結　果

【実験1】Zymolyase処理サンプルを直接用いたPCR



M: 1 kb DNA Ladder
1: A配列をもつプラスミドを導入したコロニー1
2: A配列をもつプラスミドを導入したコロニー2
3: B配列をもつプラスミドを導入したコロニー1
4: B配列をもつプラスミドを導入したコロニー2
5: C配列をもつプラスミドを導入したコロニー1
6: C配列をもつプラスミドを導入したコロニー2
7: D配列をもつプラスミドを導入したコロニー1
8: D配列をもつプラスミドを導入したコロニー2
9: B配列をもつプラスミド（酵母から抽出）
※他社酵素につきましては、推奨条件を用いました。

【実験2】*Saccharomyces cerevisiae* Y187のコロニーからダイレクトPCR



M: 1kb DNA Ladder
1～21: KOD FX

先生からのコメント

以前から他社のポリメラーゼを用いて酵母のコロニーPCRを行っていたが、ちょっとした条件の違い（コロニーの年齢、使用する菌体の量）などで増えたり、増えなかったりということが頻繁に起きていた。このKOD FXを使ってすでに100回以上コロニーPCRを行ったが、今までに増幅に失敗したことはない。さらに、酵母菌体をZymolyaseで処理せずに（大腸菌のコロニーPCRと同様に）、直接PCR溶液に加える方法でも問題なく増幅できている。

実施例 1 アルカリ溶解法で調製したマウステールライセートからの増幅例

トランスジェニックマウスを用いる実験が盛んになってきましたが、マウステールから精製したDNAをサンプルとするPCR解析は、かなり煩雑で時間がかかるステップです。そこで今回、マウステールを簡便なアルカリ溶解法を用いて処理した上清をサンプルとするPCR解析法の検討を行いました。また、増幅産物を精製なしで、数種類の制限酵素で消化する検討もあわせて行いました。

方　法

ターゲット　Mouse membrane glycoprotein（Thy-1） gene〈M10246〉

プライマー配列
Primer F: 5'-CCACAGAATCCAAGTCGGAACTCTTG-3'
Primer R: 5'-GTAGCAGTGGTGGTATTATACATGGTG-3'

サンプル　アルカリ溶解法で調製したマウステールライセート

サイクル

94℃	2 min.	
98℃	10 sec.	30 cycles
68℃	2.5 min.	

※プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

反応液組成

滅菌蒸留水	10.5 μl
2x PCR Buffer for KOD FX	25 μl
2mM dNTPs	10 μl
10 pmol/μl Primer F	1.5 μl
10 pmol/μl Primer R	1.5 μl
KOD FX（1U/μl）	1 μl
ライセート（アルカリ溶解法）	0.5 μl〈最大2 μl〉
Total	50 μl

PCR産物の制限酵素処理

PCR産物（未精製）	10 μl
制限酵素	1 μl（約10U）
Total	11 μl → 37℃, 60 min.

※熱アルカリ溶液の取扱いに十分ご注意ください。

結　果

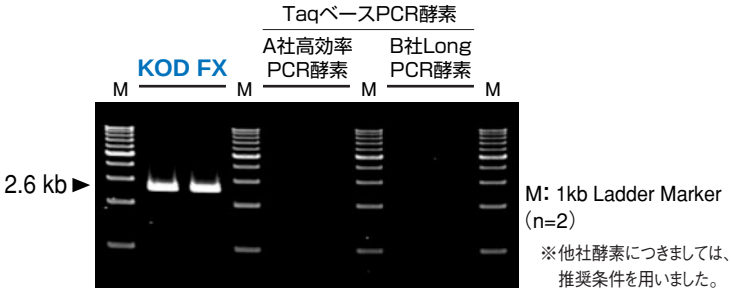


図1. マウステールライセートを用いたPCRの結果

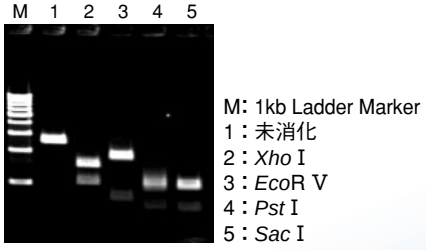


図2. PCR産物（未精製）の制限酵素消化結果

考　察

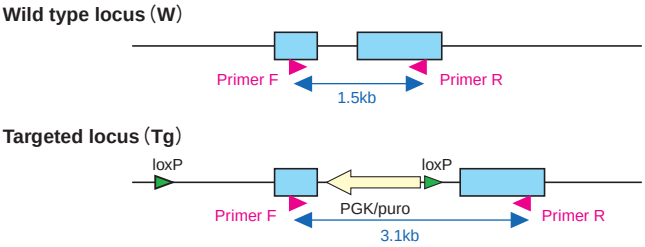
KOD FXを用いた場合のみ、明瞭な増幅が認められ、また、未精製PCR産物の制限酵素での消化も、今回用いた酵素では良好でした（その他の制限酵素においては事前検討をお薦めいたします）。アルカリ溶解法は、Proteinase Kを用いる方法よりも手間が少ないため、本方法を行うことにより、より簡便にトランスジェニックマウスの遺伝子解析ができるものと思われます。

実施例 2 マウステールライセートを直接用いたトランスジェニックマウスのジェノタイピング

アルカリ溶解法で調製したマウステールライセートを用いて実際にトランスジェニックマウスのジェノタイピングを行いました。

方　法

ターゲット　ターゲット遺伝子マップとプライマー



※本実験で使用したトランスジェニックマウスのマウステール、及びプライマー情報は国立循環器病センター・荒井勇二先生よりご供与いただきました。

サンプル　マウステールライセート（p.9参照）

サイクル

94℃　1 min.
98℃　10 sec. ← 30 cycles
68℃　3 min.

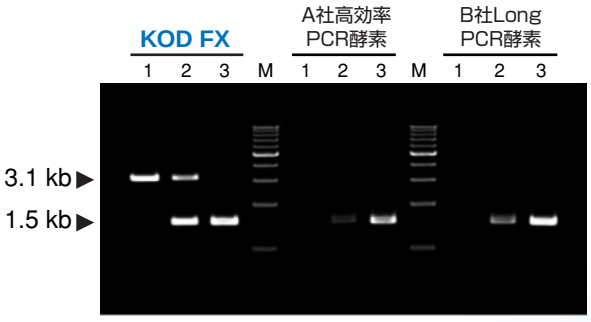
※プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

反応液組成

滅菌蒸留水	10 μl
2x PCR buffer for KOD FX	25 μl
2mM dNTPs	10 μl
10pmol /μl Primer F	1.5 μl
10pmol /μl Primer R	1.5 μl
マウステールライセート	1 μl
KOD FX（1.0 U/μl）	1 μl
Total	50 μl

結　果

PCR産物を、1%アガロースゲルに5 μlをアプライして解析を行いました。その結果、KOD FXを用いた場合のみ、すべてのタイプで解析が可能でした。



M: 1kb DNA Ladder
1: Tg / Tg
2: Tg / W
3: W / W

※他社酵素につきましては、推奨条件を用いました。

考　察

KOD FXを用いた場合のみ、3.1kbと1.5kbの両方のターゲットが均一に増幅することが可能であったことから、KOD FXはこのようなジェノタイピング実験に適しているものと思われます。

実施例 3 ワンステップ法で調製した植物ライセートからの増幅例

植物を用いる実験が盛んとなってきましたが、植物から精製したDNAをサンプルとするPCR解析は、かなり煩雑で時間がかかるステップです。そこで今回、植物組織を簡便なワンステップ法を用いて処理した上清をサンプルとするPCR解析法の検討を行いました。

方　法

ターゲット　rbcL、rbcmtT（Long Target）

プライマー配列
Primer F: 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'（トマト&タバコ rbcL　1.3kb）
Primer R: 5'-AAGCAGCAGCTAGTTCCGGGCTCCA-3'（トマト&タバコ rbcL　1.3kb）
Primer F: 5'-ATGTCACCACAAACAGAAACTAAAGC-3'（イネ rbcL　1.3kb）
Primer R: 5'-AAGCTGCGGCTAGTTCAGGACTCCA-3'（イネ rbcL　1.3kb）
Primer F: 5'-TCCCCTTTGCTGACCTGGTAAGATTC-3'（タバコ rbcmtT　2.2kb）
Primer R: 5'-GATAAAAGCCACCTCTCAAGCCCAAG-3'（タバコ rbcmtT　2.2kb）
Primer F: 5'-CGGTAAAGCCAGGAATTGTACCAGAAGG-3'（タバコ rbcmtT　4.6kb）
Primer R: 5'-GGAAGATAATGGTGGCCTCAATCAAAGG-3'（タバコ rbcmtT　4.6kb）

サンプル　ワンステップ法で調製したトマト葉、タバコ葉、イネ葉、精米ライセート

サイクル
94℃　2 min.
98℃　10 sec.
68℃　1 min./kb
30 cycles
※プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

反応液組成

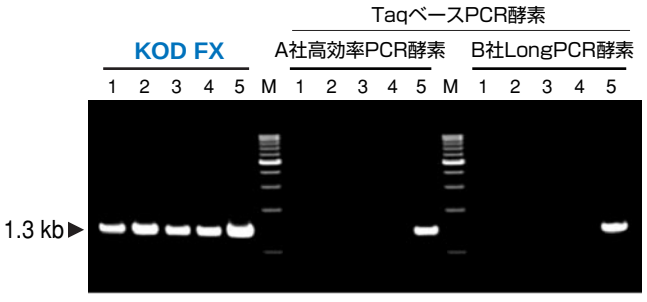
滅菌蒸留水	10 μl
2x PCR Buffer for KOD FX	25 μl
2mM dNTPs	10 μl
10 pmol/μl Primer F	1.5 μl
10 pmol/μl Primer R	1.5 μl
KOD FX（1U/μl）	1 μl
ライセート（ワンステップ法）	1 μl
Total	50 μl

ワンステップ法

【参考文献】*BioTechniques*, **19**: 394（1995）

結　果

本方法を用いることで、トマト、タバコ、イネの葉、及び精米のライセートをサンプルとして、明瞭な増幅が認められました。また、タバコ葉ライセートから4.6kbの増幅が認められました。



M: 1kb DNA Ladder
1: トマト葉
2: タバコ葉
3: イネ葉
4: 精米
5: 精製イネゲノムDNA
※他社酵素につきましては、推奨条件を用いました。

図1. 各種植物サンプルライセートからの直接PCR

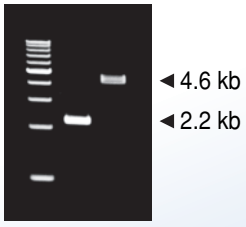


図2. タバコ葉ライセートからの直接PCR（Long Target）

考　察

KOD　FXを用いたときのみ増幅が認められたことから、ワンステップ法とKOD　FXを組み合わせることで、植物の遺伝子解析を簡便化できると思われます。

実施例 1　ヒト糞便から精製したDNAを用いた *Helicobactor pylori cagA* 遺伝子の増幅

【データご提供】大阪大学大学院 医学系研究科 保健学専攻 生体情報科学講座　山本容正先生、平井到先生、紀本愛先生

糞便は夾雑物が多いサンプルの一つであり、精製されたDNA中にも大腸菌由来のDNAをはじめPCRを阻害する成分が多く含まれています。ここでは、糞便より精製されたDNAから、Nested PCRを用いて特定の細菌を検出した例をご紹介します。

方　法

ターゲット　Helicobacter pylori cagA 239 bp

プライマー配列

〈1st PCR〉 Primer F: AACCAATCGTTGATAAGAAYGATAG
Primer R: TGTTGATTTTAGAYGGATCKTTTTG

〈2nd PCR〉 Primer F: GAAYGATAGGGATAAYAGGC
Primer R: CKTTTTGAWGRGACACCCAA　（K: G/T、Y: C/T、W: A/T）

サンプル　ヒトの糞便1gからQIAmp DNA stool mini kit（QIAGEN）を用い精製しTE bufferにて1/10希釈したDNA

反応液組成

〈1st PCR〉

滅菌蒸留水	1.2 μl
2x PCR Buffer for KOD FX	5 μl
2mM dNTPs	2 μl
10pmol /μl Primer F	0.3 μl
10pmol /μl Primer R	0.3 μl
KOD FX（1.0U/μl）	0.2 μl
精製した糞便DNA（10倍希釈）	1 μl *
Total	10 μl

*5～50ngのDNAを含みます。

〈2nd PCR〉

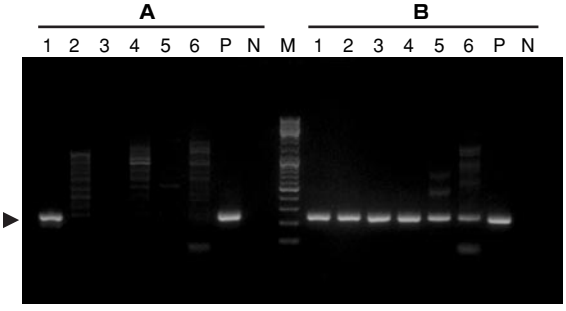
滅菌蒸留水	1.2 μl
2x PCR Buffer for KOD FX	5 μl
2mM dNTPs	2 μl
10pmol /μl Primer F	0.3 μl
10pmol /μl Primer R	0.3 μl
KOD FX（1.0U/μl）	0.2 μl
1st PCR産物の10倍希釈液	1 μl
Total	10 μl

サイクル

〈1st PCR〉
94℃　2 min.
98℃　10 sec. ←
55℃　30 sec.　50 cycles
68℃　30 sec.

〈2nd PCR〉
94℃　2 min.
98℃　10 sec. ←
56℃　30 sec.　50 cycles
68℃　30 sec.

結　果



1～6: 各検体（DNA量5～50ng / 10μl Reaction）
※複数の糞便サンプルから抽出したDNAをそのまま使用
P: ポジティブコントロール（OK111株から抽出したDNA 0.01g）
N: ネガティブコントロール（滅菌蒸留水）
M: DNA Ladder Mix（Fermentas #SM0331）

A 1st PCR: A社PCR試薬
2nd PCR: KOD -Plus-

B 1st PCR: KOD FX
2nd PCR: KOD FX

※他社酵素につきましては、推奨条件を用いました。

先生からのコメント

KOD FXを用いる前に幾つかの酵素を使用して条件を検討していましたが、満足できる増幅は得られておりませんでした。KOD FXを使用した場合、増幅も特異性も著しく向上したと考えております。

実施例 2 ヒトジストロフィン遺伝子の増幅とクローニング

ヒトジストロフィン（DMD）遺伝子は、真核細胞における最も長いmRNAの一つです。今回、KOD FXを用いて本遺伝子の全長クローニングを行いました。

方　法

以下のようなフローに従って、ジストロフィン遺伝子を増幅した後に、プラスミドにクローニングを行い、得られた5クローンの遺伝子配列を確認しました。

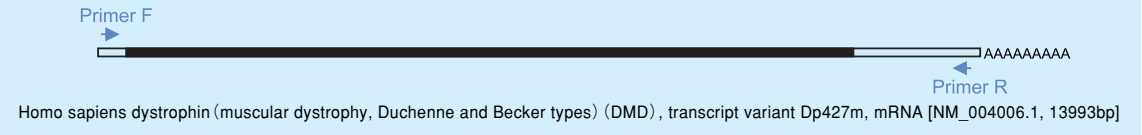


図1. ジストロフィン遺伝子の構造とPCR プライマーの位置

逆転写反応　1st Strand 合成キット: ReverTra Ace -α -®（Code No.: FSK-101）
RNA: Human Adult Skeletal Muscle total RNA（Code No.: CA1H60）1μg / 20μl Reaction
逆転写Primer: Oligo（dT）20 primer

KOD FXを用いたPCR

プライマー配列
Primer F: GATGGCCTTGTTGGCCTACTGGAGCAATAAAGTTTGAAGAACTTTTACCAGG
Primer R: GACGGCCTATGTGGCCACAACACGAAATAATGTCCAAATTAATTATGC
（下線部は*Sfi* Iサイト）

サイクル
94 ℃　2min.
98 ℃　10sec.
68 ℃　14min
30 or 35 or 40 cycles
※プライマーのTm値が73℃未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

アガロースゲル電気泳動による増幅産物の確認

残りのPCR増幅産物をMagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-（Code No.: NPK-601）を用いて精製

制限酵素*Sfi* I（Code No.: SFI-111）によるPCR産物の消化

アガロースゲル電気泳動による分離、切り出し、DNA回収

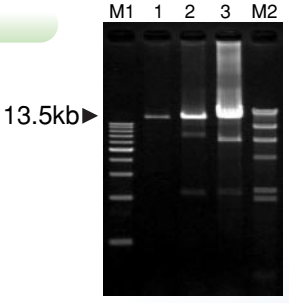
予め*Dra* IIIでカットしたPlasmid Vector pME13SFL3とligation

大腸菌コンピテントセルDH5 α（Code No.: DNA-903）を形質転換

形質転換体5クローンをシーケンシングにより配列確認

結　果

PCRの結果、40サイクルの条件で明瞭な13.5kbの増幅が確認できました。
また、シーケンシングの結果、5クローン中1クローンにおいて、PCRエラーによる変異のないDMD遺伝子の全長を取得することができました。



M1: 1kb DNA ラダー
1: 30サイクル
2: 35サイクル
3: 40サイクル
M2: λ／*Hin*d III digest

考　察

KOD FXはKOD -Plus-では増幅が困難な比較的長いターゲットを直接増幅してクローニングするような用途に適していると思われます。本酵素は、KOD -Plus-に比べて正確性は低いですが、Taqベースの酵素に比べると格段に正確性が良いので、このような用途に適していると思われました。

Ⅳ FAQ

Q1 伸長の最適温度は何℃ですか?

A1 72℃よりも68℃の方が良好な結果が得られるようです。

Q2 PCR時の伸長反応時間の目安は?

A2 1 min./kbが目安になります。

Q3 プライマーのTm値の算出方法はどの方法が適切ですか?

A3 最近接塩基対法(Nearest Neighbor method)による算出をお薦めしています。

Q4 どのような原理のホットスタート法を用いていますか?

A4 KOD FXの酵素にはあらかじめKOD DNA polymeraseに対する中和抗体が添加してあります。この抗体は、ポリメラーゼ活性と3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を抑制するため、PCR反応液調製時の副反応がなく、PCRの特異性・感度をアップさせることができます。

抗体は、最初のPCRサイクルの変性条件で失活するため、PCRには影響ありません。

Q5 KOD FXのPCR産物をクローニングしたいのですが。

A5 KOD FX のPCR産物はKODの強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性によってほぼ完全に平滑化されています。よって、一般的な平滑末端DNAをクローニングする方法を用いてクローニングすることができます(一般的なPCRプライマーの5'末端がリン酸化されていないことに注意してください)。

また、KOD用のTAクローニングキット『TArget Clone™ -Plus-(Code No.TAK-201)』を用いることによって、未精製のPCR産物を直接Tベクターにクローニングすることが可能です。【通常の方法ではTAクローニングできませんのでご注意ください】

Q6 さらにPCR効率をアップさせたいのですが。

A6 GC含量の高いターゲットを増幅する場合、DMSOを最終濃度で5%になるように添加することで、PCR効率が改善されることがあります。

Q7 KOD FXはGC含量が低いターゲットに対しても効果的ですか?

A7 GC含量が低いターゲットに対しても有効な場合がありますので、十分お試しいただく価値はあると考えられます。

Q8 PCR産物を精製なしでそのまま制限酵素処理はできますか?

A8 何種類かの制限酵素では、PCR産物10μlに対して制限酵素1μl(約10U)を添加するだけで、効率的に切断可能であることを確かめています(p.9参照)。ただし、初めて行う場合は、一度予備検討してから実施されることをお薦めします。

Q9 長鎖ターゲットを増幅する際のコツはありますか?

A9 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)にプライマー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、脱塩グレードなどの精製度の低いプライマーを用いるとスメアや非特異増幅の原因となることがあるため、カートリッジ精製、もしくはHPLC精製グレードのプライマーのご使用をお薦めします。

Q10 KOD FXでクルードサンプルを鋳型に用いる場合、何かコツや注意点はありますか?

A10 KOD FXは、クルードサンプルに対し高い耐性を示しますが、増幅が見られない場合はサンプル量を少なくする方向で検討します。また、2ステップサイクルよりも3ステップサイクルの方が安定した結果が得られる場合があります。

通常、30サイクルで十分増幅が得られますが、ターゲット長やサンプルによっては、増幅が低下する場合があります。このような場合には、35~40サイクル程度までサイクル数を増やすことで良好な結果が得られることがあります。

さらに、クルードサンプルを直接PCR反応に持ち込む場合、Proteinase KやSDSなどが含まれる処理液を用いないように注意してください。これらの成分の活性が残っていると、PCR酵素などが不活性化され、PCR効率が低下します。

Q11 KOD FXをマルチプレックスPCRに応用したいのですが、コツはありますか?

A11 プライマーを等モルで添加した場合、どちらかの増幅産物が増幅しすぎてしまうことがあります。その場合、添加するプライマー量の比を検討してください。一般的には、増幅の悪かった方のターゲットのプライマー量を1.5倍程度に増やし、サイクル数を少なくする方向で検討することで良好な結果が得られることがあります。

Q12 KOD -Plus-やKOD -Plus- Ver.2との使い分けはどのようにすれば良いですか?

A12 KOD -Plus-やKOD -Plus- Ver.2は正確性を重視して製品設計されていますので、主にクローニングに適しています。KOD FXは、成功率を重視して設計されているため、難配列ターゲットの増幅やクルードサンプルからの増幅に適しています。とは言ってもKOD FXもTaqの約11倍の正確性を示すので、クローニングに使用することも可能です。特に、Long Targetのクローニングに有用です(p.13参照)。

V KOD FX、及び関連商品プライスリスト

（保存・輸送温度：-20℃）

品名及び内容	包　装	Code No.	価　格
KOD FX KOD FX（1 U/μl）　200 μl ×1本 2×PCR Buffer for KOD FX*　1.7 ml ×3本 2mM dNTPs　1 ml ×2本	200 U ×1本 〈200回用〉	KFX-101	¥35,000
KOD FX	（200 U ×1本）×5 〈1000回用〉	KFX-101X5	¥140,000

*終濃度2.0mMのMg^{2+}を含有します。

関連商品

（保存・輸送温度：-20℃）

高正確性PCR酵素

品名及び内容	包　装	Code No.	価　格
KOD -Plus- KOD -Plus-（1 U/μl）　200 μl ×1本 10×PCR Buffer for KOD -Plus-　1 ml ×1本 25mM $MgSO_4$　1 ml ×1本 2mM dNTPs　1 ml ×1本	200 U ×1本 〈200回用〉	KOD-201	¥30,000
KOD -Plus-	（200 U ×1本）×5 〈1000回用〉	KOD-201X5	¥120,000
KOD -Plus-	（200 U ×1本）×10 〈2000回用〉	KOD-201X10	¥210,000
KOD -Plus- Ver.2 KOD -Plus-（1 U/μl）　200 μl ×1本 10×PCR Buffer for KOD -Plus- Ver.2　1 ml ×1本 25mM $MgSO_4$　1 ml ×1本 2mM dNTPs　1 ml ×1本	200 U ×1本 〈200回用〉	KOD-211	¥32,000
KOD -Plus- Ver.2	（200 U ×1本）×5 〈1000回用〉	KOD-211X5	¥128,000

（保存・輸送温度：-20℃）

TAクローニング試薬（KOD用）

品名及び内容	包　装	Code No.	価　格
TArget Clone™ -Plus- pTA2 Vector（50 ng/μl）　10 μl 2×Ligation Buffer　50 μl T4 DNA Ligase　10 μl 10×A-attachment mix　10 μl	10回用	TAK-201	¥16,000
10×A-attachment mix 10×A-attachment mix　25 μl	25回用	TAK-301	¥12,000

※TArget Clone™ -Plus-には、TベクターとDNAリガーゼとは別に、10×A-attachment mixが含まれています。この10×A-attachment mixには、抗KOD DNA polymerase抗体とTaq DNA polymeraseが含まれているため、未精製のPCR産物にこの試薬を添加して、60℃・10分間加温することで容易に3' 末端にdAを付加することができ、付加反応の後、産物をそのままTベクターとライゲーションさせることができます。また、お手持ちのTベクターにクローニングしたい場合は、別売りの10×A-attachment mix（Code No. TAK-301）を用いることで効果的にKOD FXやKOD -Plus-のPCR産物をTAクローニングすることができます。

KOD FXの詳細情報はこちら!!

弊社ウェブページ
http://www.toyobo.co.jp/bio

KOD FXコーナー

TOYOBO 東洋紡績株式会社

◆◆ 納期・注文に関するお問合せ ◆◆

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

◆◆ 製品内容・技術に関するお問合せ ◆◆

テクニカルライン
TEL.06-6348-3888　FAX.06-6348-3833
開設時間：9:00～12:00　13:00～17:00
（土・日・祝を除く）
E-mail　tech_osaka@toyobo.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio

PCRは東洋紡

2009.1.17,000