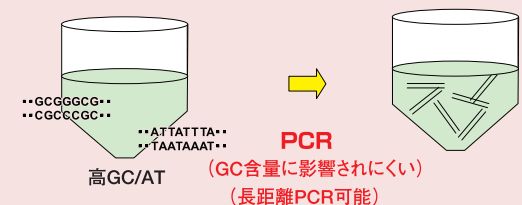


### 3 難配列の増幅



#### 解説

KOD FXには、GC含量の影響を受けにくくする成分が入っています。よって、高GCターゲットや、逆に高ATターゲットの増幅に力を発揮します。また、比較的長距離のPCRが可能なので、長くて難しい配列をクローニングするような用途に用いることができます。また、糞便から抽出したDNAのように、夾雑配列を多く含むようなDNAサンプル中に存在する、低コピー数のターゲット配列を増幅するような用途にも向きます。

#### 実施例1 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。

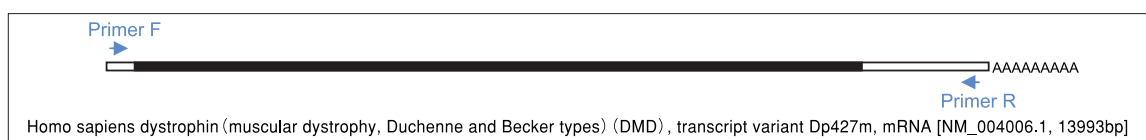


図1. ジストロフィン遺伝子の構造とPCR プライマーの位置

**逆転写反応** 1st Strand 合成キット: ReverTra Ace- $\alpha$ ® (Code No.: FSK-101)  
RNA: Human Adult Skeletal Muscle total RNA (Code No.: CA1H60) 1  $\mu$ g / 20  $\mu$ l Reaction  
逆転写Primer: Oligo (dT)<sub>20</sub> primer

#### KOD FXを用いたPCR

**【プライマー配列】** Primer F: GATGGCCTTGTTGGCCCTACTGGAGCAATAAAGTTTGAAGAAGCTTTTACCAGG  
Primer R: GACGGCCTATGTGGCCACAACACGAAATAATGTCCAAATTAATATATGC (下線部はSfiIサイト)

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

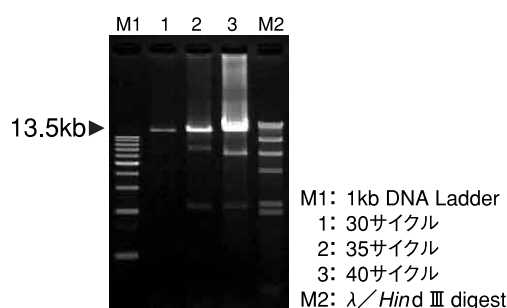
制限酵素部位を用いてベクターにクローニング後、シーケンス解析

#### 【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。

#### 【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。

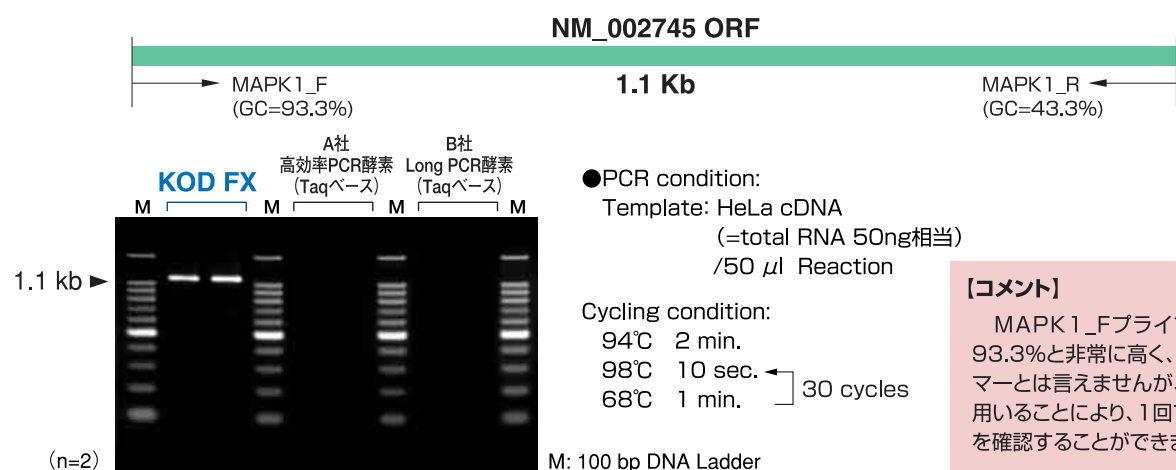


#### 実施例2 GC=93.3%のプライマーを用いたORF全長の増幅

配列情報が少なく、オープンリーディングフレーム (ORF) の末端にしかプライマーを設計できないような時など、必ずしも最適なプライマーペアを設計できるとは限りません。以下に、通常のプライマーの設計が困難なターゲットの例として、MAPK1 遺伝子 (下記参照) のORFの増幅を行った結果をお示しします。

**【ターゲット】** NM\_002745 Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), transcript variant 1

**【プライマー配列】** 開始コドン (MAPK1\_F下線) から終止コドン (MAPK1\_R下線) を増幅するように設計  
MAPK1\_F: ATGGCGGGCGGCGGGCGGGCGGGCGGGCG (30mer) <GC=93.3%>  
MAPK1\_R: TTAAGATCTGTATCCTGGCTGGAATCTAGC (30mer) <GC=43.3%>



#### 【コメント】

MAPK1\_FプライマーはGCが93.3%と非常に高く、最適なプライマーとは言えませんが、KOD FXを用いることにより、1回で明瞭な増幅を確認することができました。

(保存・輸送温度: -20°C)

### KOD FXの正確性について

KOD FXは強い3'-5'エキソヌクレアーゼ活性 (校正活性) を示します。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、Taqや他社Long PCR用酵素の約11倍優れている値でした。 ※さらに、正確性良く増幅したい場合はKOD -Plus-シリーズをお薦めします。

**【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 $\beta$ -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。

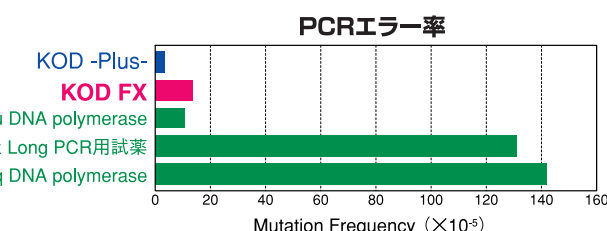


図 各酵素におけるPCRエラー率の比較

TOYOBO

### 実施例募集

KOD FXでは、今回紹介した以外に、様々な用途で使用されはじめています。そこで、KOD FXを用いた新事例を募集いたします。詳しくは、以下のサイトをご参照ください。過去の実施例もこのサイトでご覧いただけます。

- 1 弊社ウェブサイト [www.toyobo.co.jp/bio](http://www.toyobo.co.jp/bio)
- 2 KOD FXコーナー

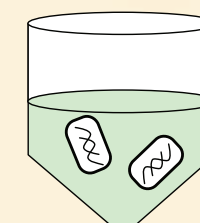
### 高成功率PCR酵素

# KOD FX 実施例集2

新テクノロジーが生み出す可能性をあなたの研究室でも。

Time is Money

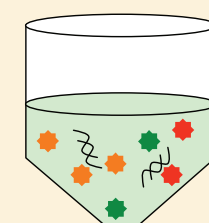
#### 直接



細胞壁を持つ微生物からの直接PCR

酵母 カビ 真菌  
プランクトン など

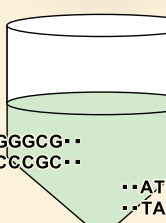
#### クルード



ヘムやクロロフィル、タンパク質、多糖等を含むサンプル (ライセート等) からの直接PCR

マウス睾丸 植物 血液  
固定組織 毛根 ショウジョウバエ など

#### 難配列



● GC含量の偏った遺伝子など、難配列の増幅  
● 糞便DNAなど、夾雑DNAが多いサンプルからの目的遺伝子の検出

サンプルを準備しております。代理店様へご依頼ください。

# 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-シリーズが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。

特に、KOD FXのその優れた「増幅成功率」は、クールドなサンプルを直接鋳型に用いる場合においても発揮さ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。

本実施例集が、今まで確認実験に費やされてきた試薬コスト、そしてなによりも先生方の貴重な時間を節約するためのヒントになれば幸いです。



**KOD FX** ●クールドサンプルからのPCR増幅!! ●難配列ターゲットの増幅!!

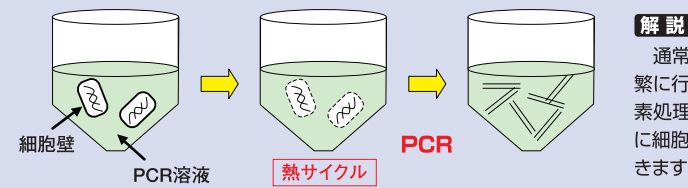
↑ 増幅成功率、増幅効率、伸長性を重視  
**KOD DNA polymerase**  
↓ 正確性を重視 (Taqの約80倍)

**KOD -Plus-シリーズ** ●高正確性PCR (クローニング用)

\*KOD FX、KOD -Plus-シリーズともに抗体を用いるホットスタート法を採用しています。

## 1 細胞壁をもつ微生物からの直接PCR

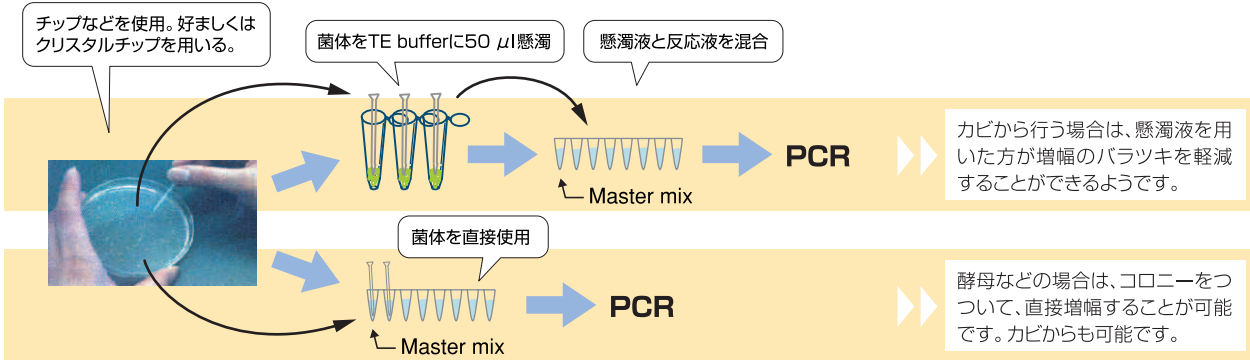
酵母 カビ 真菌 プラントン など



解説

通常、大腸菌などのグラム陰性菌からの直接PCRはプラスミドのインサート確認などで頻繁に行われますが、酵母やカビなどをサンプルとする場合、細胞壁が存在するため、通常酵素処理が行われます。KOD FXは、バッファーに特別な技術を使用しており、熱サイクル中に細胞壁を効率良く破壊するため、多くの微生物を直接サンプルとしてPCRを行うことができます。

### プロトコール 微生物からの直接PCR



#### 【PCR組成 (懸濁液を使用する場合)】

滅菌蒸留水	9 <math>\mu\text{l}</math>
2x PCR Buffer for KOD FX	25
2mM dNTPs	10 (0.4mM)
10 pmol/ $\mu\text{l}$ Forward Primer	1.5
10 pmol/ $\mu\text{l}$ Reverse Primer	1.5
KOD FX (1U/ $\mu\text{l}$ )	1
菌などの懸濁液*	5
Total	50 $\mu\text{l}$

#### 【サイクル】

94°C	2 min.
98°C	10 sec.
50°C	30 sec.
68°C	1 min.

30 cycles

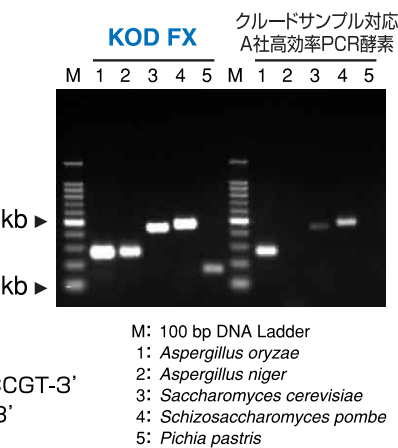
#### 【ターゲット】

ITS-1 (150~470bp)

#### 【プライマー配列】

Primer F: 5'-GTAACAAGGT (T/C) TCCGT-3'  
Primer R: 5'-CGTTCTTCATCGATC-3'

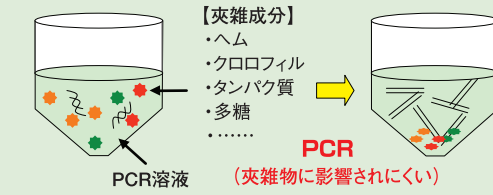
#### 【結果】



\*コロニーから直接行う場合はこの分だけ滅菌蒸留水を増やします。

## 2 クールドサンプル等からの増幅

ライセート マウステール 植物 ホルマリン固定組織 ショウジョウバエ 毛根 / 直接 血液 体液 濾紙血 哺乳類培養細胞 など

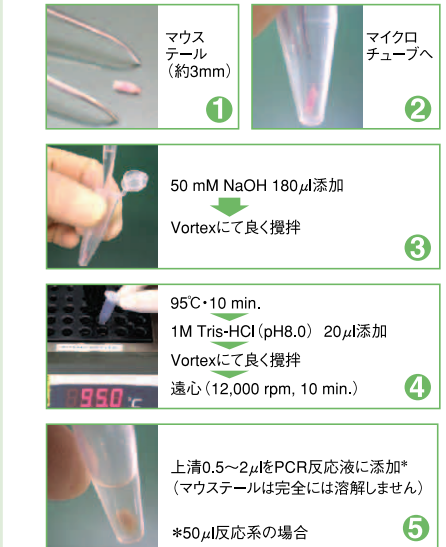


解説

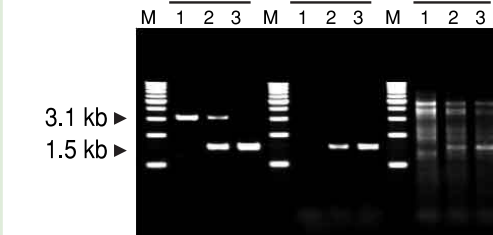
生体由来する、ヘムやクロロフィル、タンパク質成分、多糖などはPCRを阻害することが知られています。KOD FXには、それらの成分の阻害を抑える成分が添加されており、マウステールや植物組織を簡単に処理したライセートなどを用いて、高効率なPCRを行うことができます。特に、トランスジェニックマウスや植物などのジェノタイピングに有用です。また、血液や哺乳類培養細胞などからも直接増幅可能です。

### プロトコール マウステール①

#### 【アルカリ溶解法 (高速プロトコール)】



【結果】 クールドサンプル対応A社高効率PCR酵素  
**KOD FX** 2ステップサイクル 3ステップサイクル (推奨条件)



マウステールライセート (アルカリ溶解法) を用いた直接PCR

### プロトコール マウステール②

#### 【Proteinase K法】



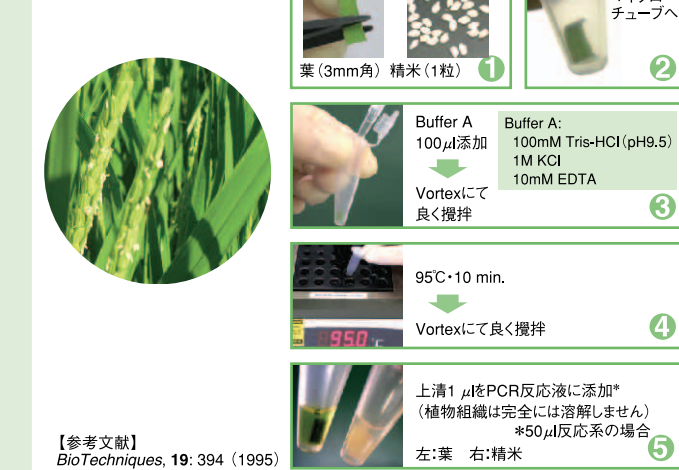
【結果】 クールドサンプル対応A社高効率PCR酵素  
**KOD FX** 2ステップサイクル 3ステップサイクル (推奨条件)



マウステールライセート (Proteinase K法) を用いた直接PCR

### プロトコール 植物 (トランスジェニック植物)

#### 【ワンステップ法】



【参考文献】 BioTechniques, 19: 394 (1995)

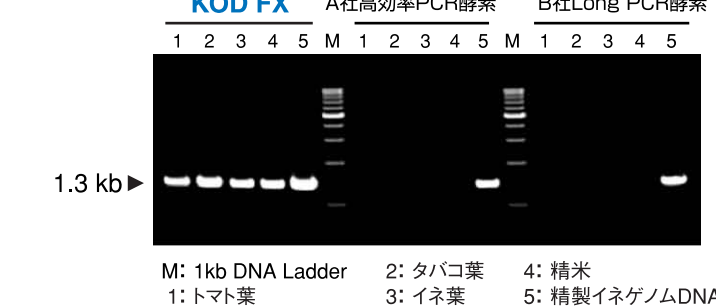
#### 【ターゲット】

rbcl (1.3kb)

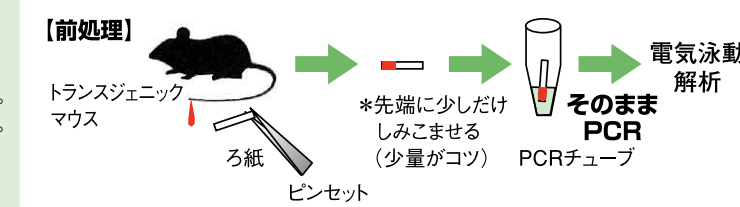
#### 【サイクル】

2ステップサイクル (30サイクル)

#### 【結果】



### プロトコール マウステール③



【データご提供】名古屋市立大学 医科学研究科 細胞分子生物 金澤智先生

#### 【先生からのコメント】

KOD FXは、短時間の反応時間で効率よくトランスジーンを検出した。また、positive control (Lane 4,9) およびnegative control (Lane 5,10) でも検出感度が良好で、false posiも出なかった。今後、トランスジェニックマウスの管理の際のトランスジーン検出に使用することにします。

#### 【基本反応条件】

滅菌蒸留水	X $\mu\text{l}$
2x PCR buffer for KOD FX	25 $\mu\text{l}$
2mM dNTPs	10 $\mu\text{l}$ (0.4mM)
10pmol / $\mu\text{l}$ Primer F	1.5 $\mu\text{l}$ (0.3 $\mu\text{M}$ )
10pmol / $\mu\text{l}$ Primer R	1.5 $\mu\text{l}$ (0.3 $\mu\text{M}$ )
KOD FX (1.0U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$ (1U)
Genomic DNA	~200ng
Plasmid DNA	~50ng
cDNA	~200ng (RNA相当)
クールドサンプル	0.5~2 $\mu\text{l}$ *
Total	50 $\mu\text{l}$

#### 【注意】

\*この量は初めて実験する際の目安です。ワンステップ法の植物ライセートは~1 $\mu\text{l}$ 、血液は~4 $\mu\text{l}$ 、哺乳類培養細胞は~2x10<sup>4</sup>細胞が適量であることが分かっています。  
\*\*プライマーのTm値が73°C未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

#### 【2ステップサイクル】\*\*

94°C	2 min.
98°C	10 sec.
68°C	1 min./kb

25~40 cycles

#### 【ステップダウンサイクル】\*\*

94°C	2 min.
98°C	10 sec.
74°C	1 min./kb
98°C	10 sec.
72°C	1 min./kb
98°C	10 sec.
70°C	1 min./kb
98°C	10 sec.
68°C	1 min./kb
68°C	7 min.

5 cycles  
5 cycles  
5 cycles  
15~25 cycles

#### 【3ステップサイクル】

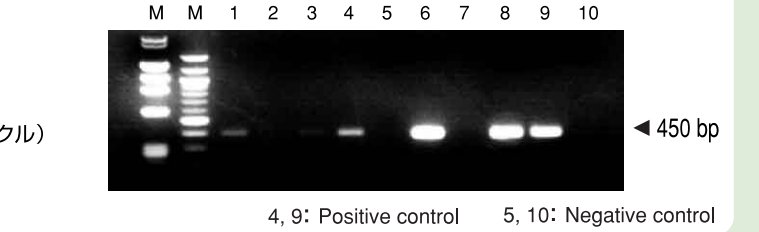
94°C	2 min.
98°C	10 sec.
68°C	1 min./kb

25~40 cycles

#### 【ターゲット】

CIITA 450bp

#### 【結果】

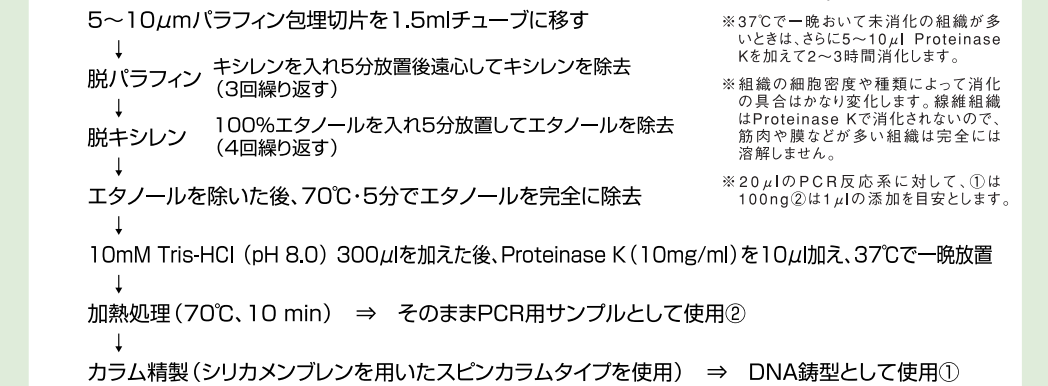


### プロトコール ホルマリン固定組織

#### 【サンプル】

ホルマリン固定パラフィン包埋材料 (ヒト)  
(今回使用した切片は厚さ約10 $\mu\text{m}$ で、大きさは1cmx2cm程度)

#### 【前処理】



#### 【サイクル】

94°C	15 min*
98°C	10 sec
57°C	30sec
68°C	30sec

38 cycles

\*ホルマリン固定組織から得られたDNAの増幅では、**最初の变性ステップを7~15分程度に設定**することで良好な結果を得ることができます。

【データご提供】福岡大学 医学部 病理学講座 石黒晶子先生、竹下盛重先生、福重智子先生

#### 【先生からのコメント】

他社のポリメラーゼを用いた場合、精製DNAを用いても増幅できない検体が多かった。一方、KOD FXを用いることで精製DNA及び、Proteinase K処理後のパラフィン包埋材料のライセートから高効率にPCR産物を得ることができた。小さな組織の場合、精製するとDNAがより少なくなるので、精製しないでPCRに使えるのが良い。

## 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** クールドサンプルからのPCRには2ステップもしくはステップダウンPCRが特に有効な場合があります。その場合、プライマーのTm値は72°C以上に設定してください。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ミ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。

**Q2** 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?

**A2** 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。