

KOD One®

PCR Master Mix
PCR Master Mix -Blue-

実施例集





Contents

製品の概要および特長	p2
基本反応条件	p3
実施例：基礎データ	
■ 実施例 1 高速PCRによる200bp～10kbのターゲットの増幅	p4
■ 実施例 2 高速PCRによる17.5～40kbの長鎖ターゲットの増幅	p4
■ 実施例 3 GC含量70%以上の領域を含むターゲットの増幅	p5
■ 実施例 4 イノシンを含むプライマーを用いた増幅	p5
■ 実施例 5 プラスミドDNA、cDNAをテンプレートとした検出感度の比較	p6
■ 実施例 6 逆転写反応液の持ち込み可能量の確認	p6
実施例：クルードサンプルからの増幅	
■ 実施例 7 マウステールライセートからの増幅	p7
■ 実施例 8 植物ライセートからの増幅	p7
■ 実施例 9 血液のダイレクトPCR	p8
■ 実施例10 フミン酸耐性の確認	p8
■ 実施例11 糸状菌・酵母のダイレクトPCR	p9
■ 実施例12 酵母の遺伝子破壊の確認	p10
■ 実施例13 <i>A. fumigatus flbC</i> 欠損株のPCRジェノタイピング	p11
実施例：難配列の増幅	
■ 実施例14 高GC配列mouse c-Maf cDNA全長配列の増幅	p12
実施例：PCRによる組み換え	
■ 実施例15 遺伝子の発現ベクター間の移し替え	p13
実施例：PCRによる変異導入	
■ 実施例16 相補的なプライマーを用いる変異導入	p14
■ 実施例17 哺乳動物細胞用発現ベクターにクローニングされた 遺伝子配列への3塩基変異導入	p15
実施例：次世代シーケンサー (NGS)	
■ 実施例18 次世代シーケンサー (NGS) のライブラリー増幅	p16
■ 実施例19 次世代シーケンサー (NGS) を用いたSARS-CoV-2亜系統の分類	p17

保存温度：－20℃**

	(Dye-free 2×PCR Master Mix) KOD One® PCR Master Mix			(Dye-containing 2×PCR Master Mix) KOD One® PCR Master Mix -Blue-		
Code No.	KMM-101	KMM-101X5	KMM-101X10	KMM-201	KMM-201X5	KMM-201X10
包 装	1mL×5本*	(1mL×5本) ×5	(1mL×5本) ×10	1mL×5本*	(1mL×5本) ×5	(1mL×5本) ×10
価 格	¥38,000	¥152,000	¥285,000	¥38,000	¥152,000	¥285,000

* 50 µL反応系の場合、200回使用できます。

** 1ヶ月以内であれば、2～8℃で冷蔵保存することが可能です。



製品の概要および特長

高い正確性・増幅効率をもつ改変型KOD DNA Polymerase (UKOD) に、改良型伸長アクセラレーターを添加することで、高い正確性を維持したまま、高速 PCR を実現しています。本製品は2×Master Mixで、テンプレート・プライマーを混合するだけでご使用になれます。また、Loading Dye入りもご用意しております。従来のPCRをより簡便に、短時間で実施可能です。

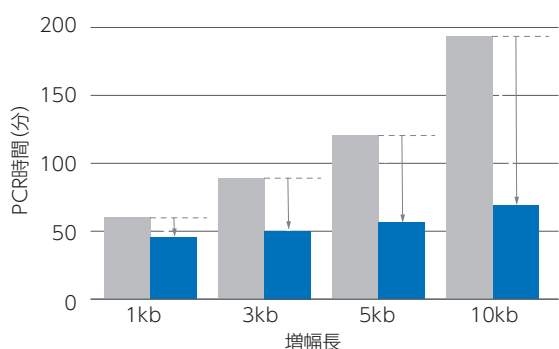


Dye-free 2×PCR Master Mix
KOD One® PCR Master Mix



Dye-containing 2×PCR Master Mix
KOD One® PCR Master Mix -Blue-

■ 伸長速度は最速1sec./kbを実現！

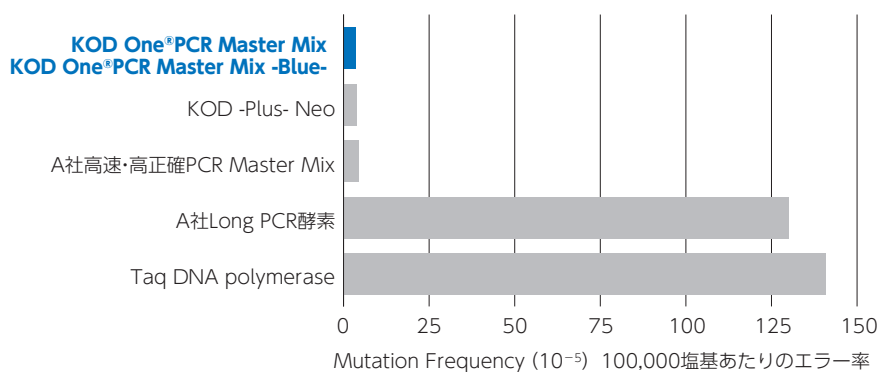


Applied Biosystems 9700の場合

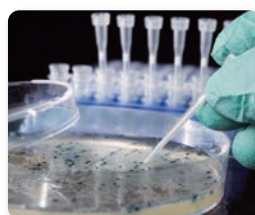
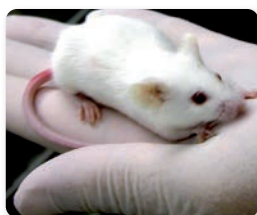
増幅長	伸長時間
～1kb	1sec.
1～10kb	5sec./kb
10kb～	10sec./kb

※ヒトゲノムDNAをテンプレートとして40kbの増幅を確認しています。

■ KODシリーズ最高レベルの正確性！



■ クロードサンプルも精製なしで効率よく増幅！



■ イノシン (dI)・ウラシル (dU) を含むプライマー・テンプレートに対応！

こちらからサンプルを
請求できます→





基本反応条件

1) 反応液の調製

反応液を調製する前に試薬を完全に融解し、十分に攪拌してからご使用ください。またすべての試薬を混合後、反応液をボルテックス等で十分に攪拌してサーマルサイクラーにセットしてください。

試 薬	容量 (μL)	終濃度
滅菌蒸留水	X	
KOD One® PCR Master Mix (2×)	25	1×
Primer (10 μM each)	1.5	0.3 μM* ¹ each
Template* ²	Y	
Total Volume	50	

*1: プライマー濃度は、0.3 μM (終濃度) を推奨しますが、10kb以上の長鎖を増幅する場合、プライマー濃度を0.15 μM (終濃度) に下げること増幅量が向上することがあります。また検出感度が悪い場合は、プライマー濃度を0.5 μMや1.0 μM (終濃度) に上げることで検出感度が改善する場合があります。

*2: テンプレートの添加量は以下を参照してください。

①精製されたテンプレート、cDNAをご使用の場合 (PCR反応液: 50 μL)

テンプレート例		添加可能範囲	標準添加量
ゲノムDNA	真核生物由来DNA	1～200ng	50ng
	原核生物由来DNA	0.1～200ng	10ng
プラスミドDNA		1pg～50ng	10ng
cDNA		1～750ng（RNA相当量）	50ng（RNA相当量）
λ DNA		10pg～10ng	1ng

②生体組織サンプルなど (PCR反応液: 50 μL)

サンプルの調製方法は、取扱説明書および本実施例をご確認ください。

テンプレート例	標準添加量	テンプレート例	標準添加量
大腸菌	チップに付いた少量	髪	1~2cm
酵母	チップに付いた少量	植物葉	2mm角
糸状菌	チップに付いた少量	精米	米粒1/5程度
培養細胞	10 ¹ ~10 ⁵ cells	マウステール	1mm程度
血液 (EDTA採血管・クエン酸採血管)	1~2 μL	植物組織ライセート*	0.5~2 μL
爪	米粒1/3程度	動物組織ライセート*	0.5~2 μL

*動植物ライセートの調製方法は、実施例7、8をご確認ください。

2) サイクル条件

3 ステップサイクル

Denaturation	98℃,	10sec.	25~45cycles
Annealing	(T _m -5)℃,	5sec.	
Extension	68℃,	1~10sec./kb	

伸長時間は、ターゲット鎖長に応じて以下のように設定してください。

1kb以下: 1sec.
1~10kb: 5sec./kb
10kb~: 10sec./kb

PCR機器によって1sec.の制御ができない場合があります。増幅量が少ない場合は、5sec.に設定してください。

ターゲットのコピー数が少ない場合やクルードサンプルからの増幅の場合などで増幅量が少ない場合は、伸長時間を10~30sec./kbに伸ばすことで改善する場合があります。

エキストラバンドが認められる場合は、取扱説明書記載の2ステップ、ステップダウンサイクルをお試しください。

◆取扱説明書はこちらからダウンロードできます→



実施例

1

高速PCRによる200bp～10kbのターゲットの増幅

ヒトゲノムDNAをテンプレートとして伸長時間の短い高速PCRサイクルで増幅を実施しました。

その結果、本製品では1 kb以下のターゲットは伸長時間1 sec.で、1～10 kbのターゲットは、5 sec./ kbで明確なバンドを確認することができました。

反応液組成

	(μ L)
滅菌蒸留水	21
KOD One® PCR Master Mix	25
10pmol / μ L Primer F	1.5
10pmol / μ L Primer R	1.5
10ng/ μ L ヒトゲノムDNA	1
Total Volume	50

PCRサイクル

1kb以下のターゲット

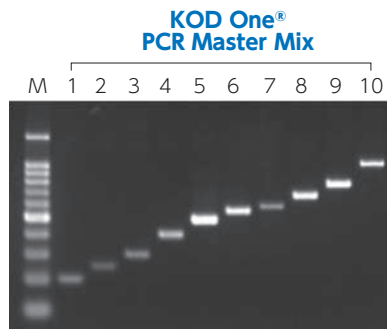
98°C, 10sec. ←
60°C, 5sec. } 30cycles
68°C, 1sec.

1～10kbのターゲット

98°C, 10sec. ←
60°C, 5sec. } 30cycles
68°C, 5sec./kb

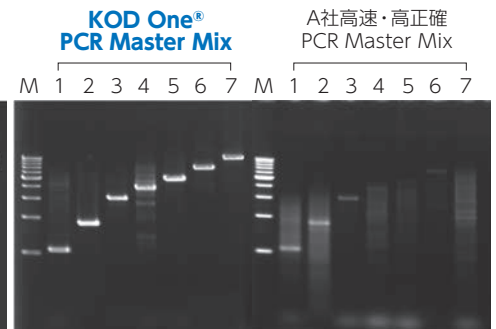
結果

[1kb以下：伸長時間1sec.]



M: 100bp DNA Ladder
1: DDB2 (200bp)
2: FANCG (250bp)
3: HBG (300bp)
4: CDH1 (400bp)
5: Chrom9 (500bp)
6: ERCC4 (550bp)
7: HRAS (600bp)
8: PRF1 (700bp)
9: BRCA (800bp)
10: CDK4 (1,000bp)

[1～10kb：伸長時間5sec./kb]



M: 1kb DNA Ladder
1: Chrom9 (1kb)
2: MSH6 (2kb)
3: FANCE (3kb)
4: RAD51D (4kb)
5: KRAS (5kb)
6: BRCA1 (7kb)
7: DDB2 (10kb)

実施例

2

高速PCRによる17.5～40kbの長鎖ターゲットの増幅

ヒトゲノムDNAをテンプレートとして長鎖ターゲットの増幅を行いました。KOD One® PCR Master Mixを用いた場合、17.5～40kbまで増幅が確認できました。

反応液組成

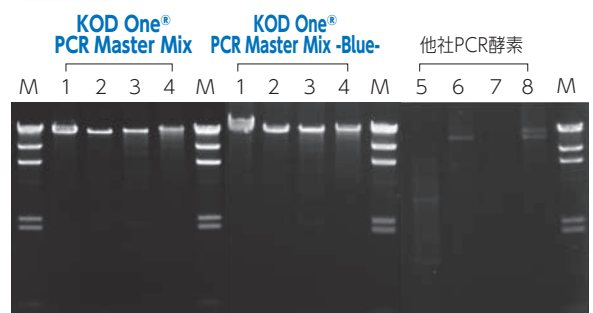
	(μ L)	(μ L)
	Lane 1-3	Lane 4-8
滅菌蒸留水	7.8	3.8
KOD One® PCR Master Mix	10	10
10pmol / μ L Primer F	0.6	0.6
10pmol / μ L Primer R	0.6	0.6
10ng/ μ L ヒトゲノムDNA	1	5
Total Volume	20	20

PCRサイクル

98°C, 10sec. ←
60°C, 5sec. } 30cycles
68°C, 10sec./kb

※他社PCR酵素は、メーカー推奨の条件にて実施しています。

結果



M: λ /Hind III
KOD One® PCR Master Mix
1: 17.5kb
2: 24kb
3: 32kb
4: 40kb
他社PCR酵素 (17.5kb)
5: A社 高速・高正確PCR Master Mix
6: D社 高正確PCR酵素
7: B社 高正確PCR酵素
8: C社 高正確PCR酵素

プライマー配列

ターゲット 17.5kb Hbg

Forward Primer : TGCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCACAGTC
Reverse Primer : ACATGATTAGCAAAAGGGCCTAGCTTGGACTCAGA

ターゲット 24kb tPA

Forward Primer : CCTTCACTGTCTGCCTAACTCCTTCGTGTGTTCC
Reverse Primer : TGTCTCCAGCACACAGCATGTTGTCGGTGAC

ターゲット 32kb Hbg

Forward Primer : AGACTTCACATGCTGCTCTGTGCATCCGAGTG
Reverse Primer : ACATGATTAGCAAAAGGGCCTAGCTTGGACTCAGA

ターゲット 40kb Hbg

Forward Primer : GTTCTCCTCTGCATATCTCCCCACCGCATCTCTTT
Reverse Primer : CCTTCAGTGCCCATGATGTAGGAAAGTGTGGCATA

実施例

3

GC含量70%以上の領域を含むターゲットの増幅

GC含量が多い領域を含む、TGFb、ACE、CASP3、ATCB、BRAFをターゲットとして増幅を行いました。KOD One® PCR Master Mixでは、いずれのターゲットにおいても増幅が見られましたが、A社 Long PCR酵素では増幅は確認できませんでした。

反応液組成

	(μ L)
滅菌蒸留水	21
KOD One® PCR Master Mix	25
10pmol / μ L Primer F	1.5
10pmol / μ L Primer R	1.5
10ng/ μ L ヒトゲノムDNA	1
Total Volume	50

PCRサイクル

98°C, 10sec.
 60°C, 5sec.
 68°C, 50sec.
 (5sec./kb)

30cycles

※A社Long PCR酵素は、メーカー推奨の条件にて実施しています。

プライマー配列

TGFb

Forward Primer : TCCACCTTGGTCAGTCTCCTATAAC
Reverse Primer : GCTGTGTGACTCTGCTTGAACCTG

ACE

Forward Primer : CCTCAGGCTCTTCTCCTCTCTACTC
Reverse Primer : GGTCATATTCTCCACAACTTGC

CASP3

Forward Primer : CTGGCTTTGTCTCCCTTCTAGGTAC
Reverse Primer : TGACCTTCTCCACACTCTAGAAACC

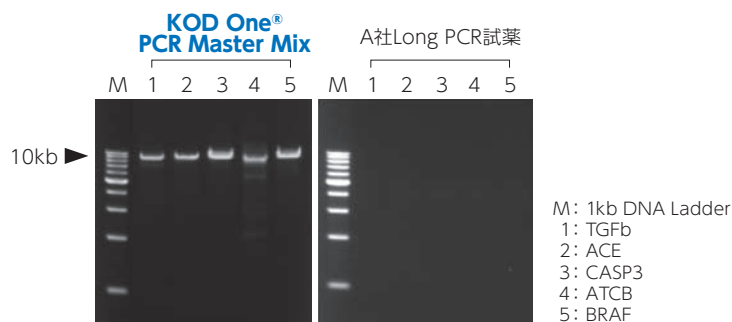
ATCB

Forward Primer : AACACCACACTCTACCTCTCAAGC
Reverse Primer : TTTAATTACAGGTGGCTCATACGTG

BRAF

Forward Primer : CCTTTACCTGAGAGTAAGCATCAGC
Reverse Primer : AACAAAAGTGAACGATACTCCTTG

結果



実施例

4

イノシンを含むプライマーを用いた増幅

イノシンを含む縮重プライマーを用いて、従来品との増幅を比較しました。その結果、KOD One® PCR Master Mix (色素なし、入り) でのみ明確なバンドを確認することができました。

反応液組成

	(μ L)
滅菌蒸留水	17
KOD One® PCR Master Mix/-Blue-	25
100pmol / μ L Primer F	1.5*
100pmol / μ L Primer R	1.5*
50ng/ μ L <i>E. coli</i> ゲノムDNA	5
Total Volume	50

*縮重プライマーを使用する場合、縮重度が高くなるとプライマー1種類あたりのモル濃度が少なくなります。縮重度に合わせてプライマー濃度を上げることで感度を向上させることができます。

PCRサイクル

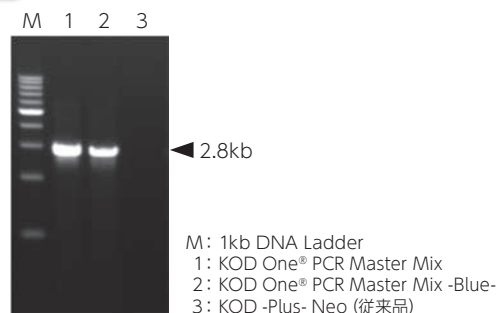
98°C, 10sec.
 60°C, 5sec.
 68°C, 15sec.
 (5sec./kb)

30cycles

プライマー配列

Forward Primer : ATGGTICARATHCCI CARAAY
Reverse Primer : RTGIGCYTGRGCCARTTYTC

結果



実施例

5

プラスミドDNA、cDNAをテンプレートとした検出感度の比較

プラスミドDNA、cDNAを用いて、約3.5kbのターゲットを伸長時間5sec./kbで増幅し、検出感度を比較しました。反応はそれぞれのPCR酵素の推奨条件に従って実施しました。

その結果、KOD One® PCR Master Mixは他社試薬と比較して、より低コピーの領域まで増幅することができました。

反応液組成

	(μL)
滅菌蒸留水	21
KOD One® PCR Master Mix	25
10pmol / μL Primer F	1.5
10pmol / μL Primer R	1.5
Template(プラスミド DNA, cDNA)	1
Total Volume	50

PCRサイクル

98°C, 10sec. →
60°C, 5sec. → 30cycles
68°C, 18sec. →
(5sec./kb)

※A社高速・高正確PCR Master Mixは、メーカー推奨条件に従って実施しています。

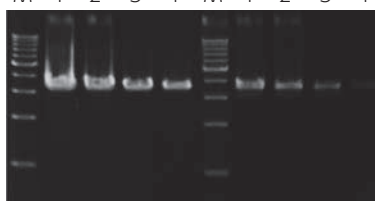
結果

【プラスミドDNA】

Template: プラスミドDNA
Target: Polymerase遺伝子

KOD One® PCR Master Mix A社高速・高正確 PCR Master Mix

M 1 2 3 4 M 1 2 3 4



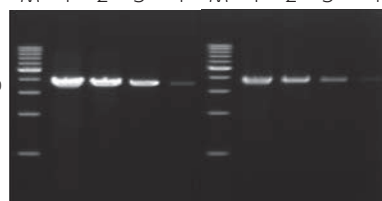
M: 1kb DNA Ladder
1: 25pg
2: 6.3pg
3: 1.6pg
4: 0.4pg

【cDNA】

Template: HeLa細胞 total RNA由来のcDNA
Target: TFR

KOD One® PCR Master Mix A社高速・高正確 PCR Master Mix

M 1 2 3 4 M 1 2 3 4



M: 1kb DNA Ladder
1: 25ng (RNA相当量)
2: 5ng (RNA相当量)
3: 1ng (RNA相当量)
4: 0.7ng (RNA相当量)

実施例

6

逆転写反応液の持ち込み可能量の確認

逆転写反応液（cDNA）に含まれるRNAはPCRに対して阻害的に働くため、大量のcDNAの添加は反応阻害につながります。そこで、cDNAの持ち込み可能量を確認するためcDNAの添加量をふり、TFR遺伝子の検出を行いました。

その結果、KOD One® PCR Master MixはRNAによる阻害を受けにくく、従来品や他社品では増幅困難な多量のcDNAを添加した条件においても良好な増幅を行うことができました。

反応液組成

	(μL)
滅菌蒸留水	17
KOD One® PCR Master Mix/-Blue-	25
10pmol / μL Primer F	1.5
10pmol / μL Primer R	1.5
cDNA	5
Total Volume	50

PCRサイクル

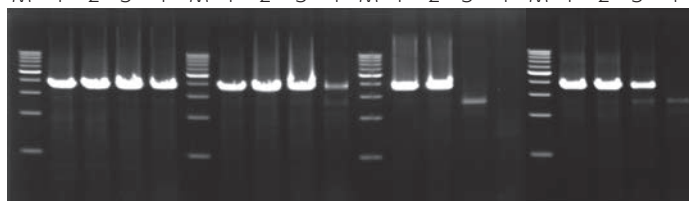
98°C, 10sec. →
60°C, 5sec. → 30cycles
68°C, 18sec. →
(5sec./kb)

※KOD One® PCR Master Mix以外のPCR酵素は、それぞれの推奨条件に従って実施しています。

結果

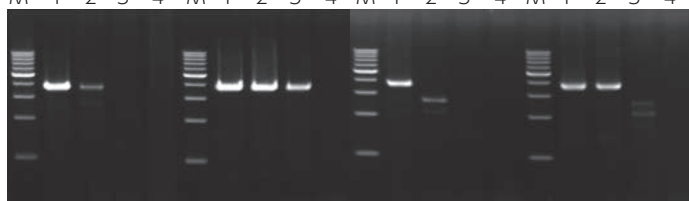
KOD One® PCR Master Mix KOD One® PCR Master Mix -Blue- KOD -Plus- Neo KOD FX Neo

M 1 2 3 4 M 1 2 3 4 M 1 2 3 4 M 1 2 3 4



A社高速・高正確 PCR Master Mix A社高正確・高効率 PCR酵素 B社高正確 PCR酵素 C社高正確 PCR酵素

M 1 2 3 4 M 1 2 3 4 M 1 2 3 4 M 1 2 3 4



M: 1kb DNA Ladder
1: 125ng (RNA相当量)
2: 250ng (RNA相当量)
3: 500ng (RNA相当量)
4: 1,000ng (RNA相当量)

Template: HeLa細胞 total RNA由来のcDNA
Target: TFR

プライマー配列

Forward Primer : CCACCATCTCGGTCATCAGGATTGCCT
Reverse Primer : TACTCCTTAACGAGAAGACATCTCAAGAC

実施例

7

マウステールライセートからの増幅

アルカリ溶解法にて調製したマウステールライセートを用いて、マウスThy-1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5sec./kbの伸長時間で実施しました。その結果、KOD One® PCR Master Mixのみ明確なバンドを確認することができました。

■アルカリ溶解法



反応液組成

	(μL)
滅菌蒸留水	Y
KOD One® PCR Master Mix	25
10pmol / μL Primer F	1.5
10pmol / μL Primer R	1.5
ライセート	X
Total Volume	50

PCRサイクル

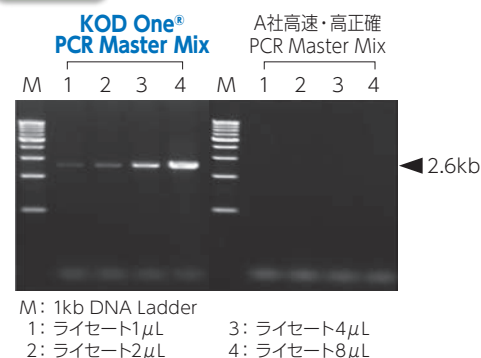
98°C, 10sec. →
60°C, 5sec. → 30cycles
68°C, 13sec. →
(5sec./kb)

※A社高速・高正確PCR Master Mixは、その推奨条件に従って実施しています。

プライマー配列

Forward Primer :
CCACAGAATCCAAGTCGGAACCTTG
Reverse Primer :
GTAGCAGTGGTGGTATTATACATGGTG

結果



実施例

8

植物ライセートからの増幅

ワンステップ法にて調製したタバコ葉ライセートを用いて、KOD One® PCR Master Mix (色素なし、入り) および従来品でrbcL遺伝子の増幅比較を行いました。KOD One® PCR Master Mixでは良好な増幅が得られました。KOD FX Neoでは、同様の増幅が見られましたが、KOD -Plus- Neoは、ライセート1 μLの場合は増幅が見られず、植物成分による阻害がかかったものと思われます。

■ワンステップ法



反応液組成

	(μL)
滅菌蒸留水	Y
KOD One® PCR Master Mix/-Blue-	10
10pmol / μL Primer F	0.6
10pmol / μL Primer R	0.6
ライセート	X
Total Volume	20

PCRサイクル

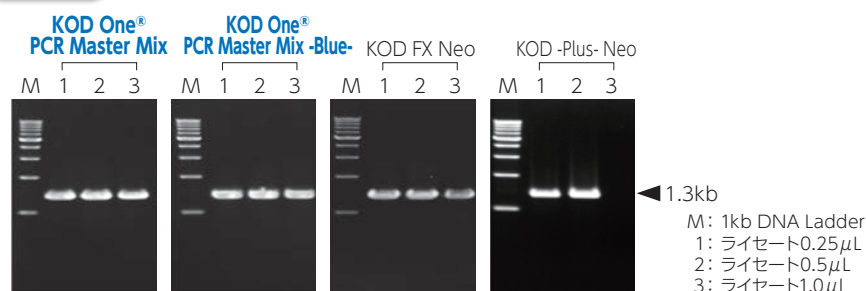
98°C, 10sec. →
60°C, 5sec. → 30cycles
68°C, 7sec. →
(5sec./kb)

※従来品PCR酵素は、それぞれの推奨の条件にて実施しています。

プライマー配列

Forward Primer : ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC
Reverse Primer : AAGCAGCAGCTAGTCCGGGCTCCA

結果



【参考文献】
Bio Techniques, 19: 394 (1995)

実施例

9

血液のダイレクトPCR

血液を精製せずにそのまま用いて、ヒト 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5sec./kbの伸長時間で実施しました。その結果、KOD One® PCR Master Mixのみ明確なバンドを確認することができました。

反応液組成

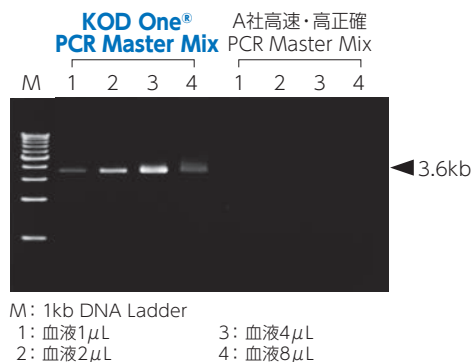
	(μ L)
滅菌蒸留水	Y
KOD One® PCR Master Mix	25
10pmol / μ L Primer F	1.5
10pmol / μ L Primer R	1.5
血液	X
Total Volume	50

PCRサイクル

98°C, 10sec.
 60°C, 5sec.
 68°C, 18sec.
 (5sec./kb)
 30cycles

※A社高速・高正確PCR Master Mixは、その推奨条件に従って実施しています。

結果



プライマー配列

Forward Primer : GGTGTTCCCTTGATGTAGACA
Reverse Primer : ACATGTATTTGCATGGAAAACAACCT

実施例

10

フミン酸耐性の確認

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。そこでKOD One® PCR Master Mixおよび各種PCR酵素を用い、フミン酸含有下でヒトゲノムからHBg遺伝子の増幅確認を行いました。

KOD One® PCR Master Mixを用いた場合は、フミン酸の量にかかわらず増幅が見られ、高速PCR条件下においても高いフミン酸耐性を示す結果となりました。

反応液組成

	(μ L)
滅菌蒸留水	Y
KOD One® PCR Master Mix	10
10pmol / μ L Primer F	0.6
10pmol / μ L Primer R	0.6
OD ₂₈₀ = 1 フミン酸	X
4ng / μ L ヒトゲノム DNA	1
Total Volume	20

PCRサイクル

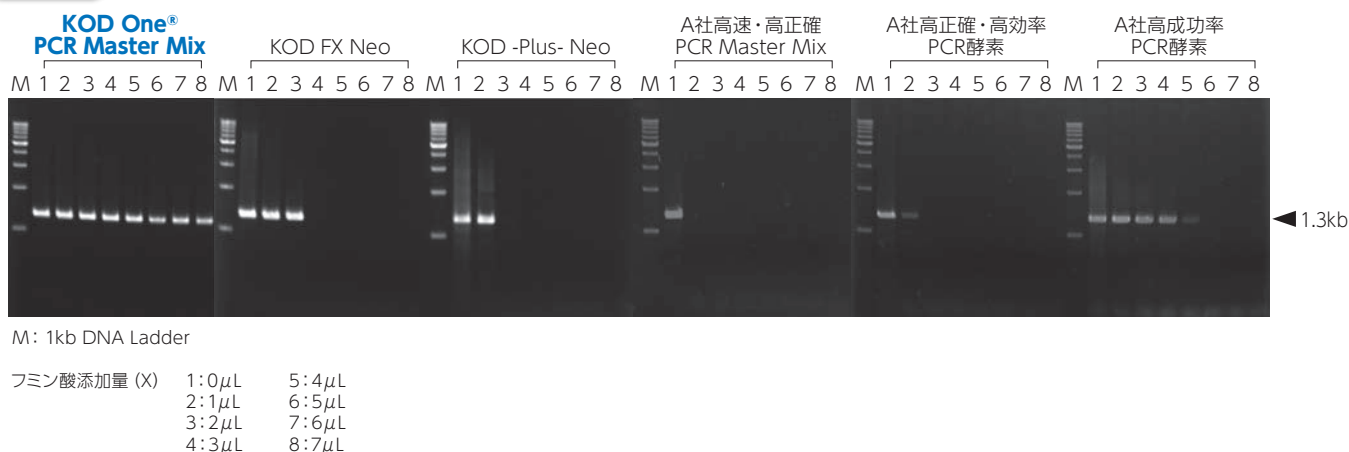
98°C, 10sec.
 60°C, 5sec.
 68°C, 7sec.
 (5sec./kb)
 30cycles

※KOD One® PCR Master Mix以外のPCR酵素は、それぞれ推奨の条件にて実施しています。

プライマー配列

Forward Primer :
TTAGGCCTTAGCGGGCTTAGAC
Reverse Primer :
CCAGGATTTTGTATGGGACACG

結果



糸状菌・酵母のダイレクトPCR

実験の目的

糸状菌・酵母の菌体から抽出、精製なしでDNAを増幅する。

実験方法

サンプルの種類

Aspergillus oryzae および *Saccharomyces cerevisiae* 菌体

サンプルの調製方法

糸状菌・酵母を生育させたプレートから、爪楊枝で菌体を取り、以下をテンプレートとして用いました。

1. 50 μ Lの滅菌水に懸濁したうちの5 μ L
2. 20 μ Lの滅菌水に懸濁したうちの5 μ L
3. そのまま

ターゲット遺伝子名と長さ

18S rRNA内 ITS1領域

Aspergillus oryzae : 約180bp

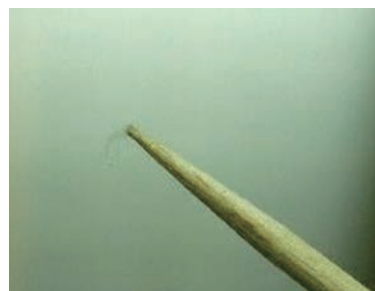
Saccharomyces cerevisiae : 約450bp

プライマー配列

ITS1 Forward Primer : GTAACAAGGTYTCCGT

ITS1 Reverse Primer : CGTTCTTCATCGATG

※ターゲット領域が短いため、この実験では推奨の長さ (22~35mer) よりも短いPrimerを用いました。



回収した*Aspergillus oryzae*の菌体

反応液組成

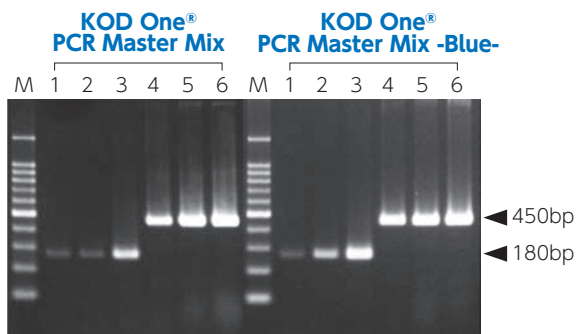
	(μ L)
滅菌蒸留水	3.8 または 8.8
KOD One® PCR Master Mix	10
10 μ M Primer F	0.6
10 μ M Primer R	0.6
菌体懸濁液または菌体	5 または 0
Total Volume	20

PCRサイクル

98℃, 10sec.	30cycles
45℃, 5sec.	
68℃, 10sec.	

結果・考察

*Saccharomyces cerevisiae*では、サンプル調製法による増幅量の差はそれほど見られませんでした。が、*Aspergillus oryzae*では、菌体をPCR反応液に直接懸濁した方がよく増幅しました。また、KOD One® PCR Master MixとKOD One® PCR Master Mix -Blue-では、結果に差はありませんでした。



M: 100bp DNA Ladder

Aspergillus oryzae

- 1: 菌体を50 μ L滅菌水に懸濁 5 μ L使用
- 2: 菌体を20 μ L滅菌水に懸濁 5 μ L使用
- 3: 菌体をdirect

Saccharomyces cerevisiae

- 4: 菌体を50 μ L滅菌水に懸濁 5 μ L使用
- 5: 菌体を20 μ L滅菌水に懸濁 5 μ L使用
- 6: 菌体をdirect

※菌体からのダイレクトPCRは、菌体量が多いと阻害がかかり増幅がうまくいかない場合がありますが、一方でカビなどは細胞が固いため、ある程度の量を入れないと増幅できないこともあります。あらかじめ、菌体量の検討をお勧めします。

菌体量を検討してうまく増幅できない場合は、伸長時間を10sec./kbに設定することで増幅できることがあります。

また、KOD One® PCR Master Mixは、推奨のPCRサイクルに初期変性のステップがないため、サンプル調製を行う際に、滅菌水に懸濁後、95℃, 5min.程度の熱処理を行うことで、菌種によってはPCR効率が改善される場合があります。

酵母の遺伝子破壊の確認

データご提供 大阪大学大学院 歯学研究科 口腔科学フロンティアセンター 先端口腔生物学教室 荒木 保弘 先生

実験の目的

染色体上の標的遺伝子をマーカー遺伝子により破壊できたことを確認する。

実験方法

サンプルの種類

酵母から抽出したゲノムDNA

サンプルの調製方法

イエローチップの先にマッチの頭ほどのコロニーをかき取り、0.02M NaOH 50μLへPCRチューブ内で懸濁した。
酵母懸濁液をPCRで95度10分熱処理した。

ターゲット遺伝子名と長さ

PIB2/ 2,345bp pib2::natNT2/ 1,783bp
GTR1/ 1,128bp gtr1::kanMX4/ 1,679bp

プライマー配列

PIB2

Forward Primer : CGGATGCTATGTCACGTTG
Reverse Primer : TCTTTACTGCTGTTGTGTC

GTR1

Forward Primer : ACCCTAAATTGTGATTATGG
Reverse Primer : TTCTTCCTCTTATGTTTCTC

反応液組成

	(μL)
滅菌蒸留水	3.9
KOD One® PCR Master Mix -Blue-	5
10μM Primer F	0.3
10μM Primer R	0.3
酵母懸濁液	0.5
Total Volume	10

PCR反応液の半量(5μL)を用いて、電気泳動を行った。

PCRサイクル

98℃, 10sec. ←
53℃, 5sec. 35cycles
68℃, 10sec. →

サイクラー機種

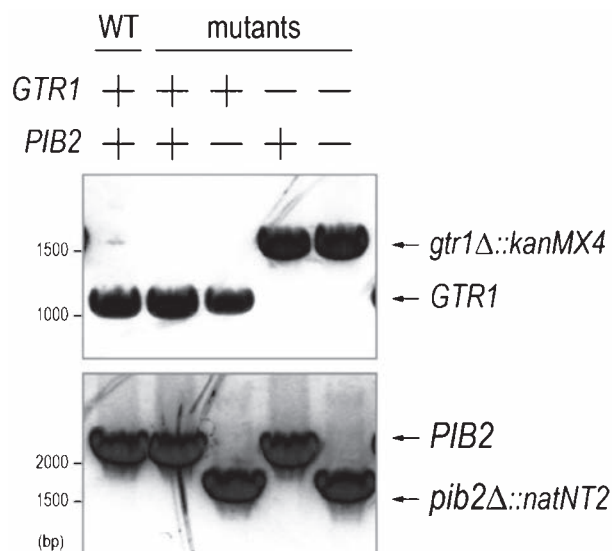
Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700

結果・考察

- ・PCRの時間が大幅に短縮された。
- ・目的遺伝子の増幅効率が改善された。
- ・All in oneなのでPCR反応液の調製が容易になった。

感想・ご意見等

普段から大量のPCRをやる機会が多く、負担となっていました。しかし、KOD One®を使うようになってから、この負担が大きく軽減しました。以前は御社のKOD製品を目的別に数種類使っていましたが、反応速度、正確性を鑑みて現在はKOD One®のみを用いており、経済的な観点からも助かっています。



A. fumigatus flbC欠損株のPCRジェノタイピング

データご提供 東北医科薬科大学 薬学科 感染生体防御学教室 田中 大 様

実験の目的

PCR法を用いてA. fumigatus flbC遺伝子組換え体を選別する。

実験方法**サンプルの種類**

Aspergillus fumigatus 孢子

サンプルの調製方法極微量（チップの先に付いたか付かないくらい）のAspergillus fumigatus 孢子をTE buffer 100 μ Lに懸濁し、電子レンジ処理（500W、2分）して上清を得た。**ターゲット遺伝子名と長さ**

flbC (Afu2g13770) 1,500bp
ptrA 2,600bp

プライマー配列

Forward Primer : TCTCATCTGCTCCCTTCATCT
Reverse Primer : ATTGTACAAGGGACGAGAGCC

サイクラー機種

T100 サーマルサイクラー (Bio-Rad)

●KOD One® PCR Master Mix**反応液組成**

	(μ L)
滅菌蒸留水	8.8
KOD One® PCR Master Mix	10
10 μ M Forward / Reverse Primer	各 0.1
電子レンジ処理 孢子懸濁液	1
Total Volume	20

PCRサイクル

98°C, 10sec. $\leftarrow$ 40cycles
68°C, 20sec.

●KOD FX Neo**反応液組成**

	(μ L)
滅菌蒸留水	7.4
2 $\times$ PCR Buffer	10
10 μ M Forward / Reverse Primer	各 0.1
KOD FX Neo	0.4
電子レンジ処理 孢子懸濁液	1
Total Volume	20

PCRサイクル

98°C, 10sec. $\leftarrow$ 40cycles
68°C, 240sec.

結果・考察

Aspergillus fumigatus A1159株を親株とし、flbC遺伝子のコード領域上流・下流にそれぞれ相同な配列、及びピリチアミン耐性遺伝子ptrAの配列を含むDNA断片を挿入した組換え体（flbC遺伝子欠損株 #1～3）を取得した。

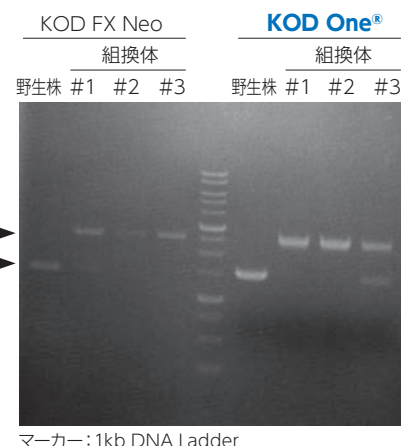
これら組換え体および親株の孢子を電子レンジ処理して得られた溶液を鋳型とし、KOD One®とKOD FX Neoをそれぞれ用いてコロニーPCRを行った。その後、アガロース電気泳動法にて遺伝子組換えの成否および両酵素の性能比較を行った。

その結果、いずれの酵素を用いた場合でも、遺伝子組換え体・親株のどちらでも問題なくPCR生成物が得られた。すなわち、どちらの酵素も、コロニーPCR法による遺伝子組換えの成否観察に用いることができた。一方、PCRに要した時間は、KOD One®はおおよそ55分、KOD FX Neoは200分であった。

これらのことから、KOD One®はフルードサンプルに強い酵素でありながら、コロニーPCRに要する時間を短縮できる「使える酵素」であることが分かった。

感想・ご意見等

同僚に「カビ孢子のコロニーPCRにはKOD FX Neoを使うといいよ」と教わって以来、遺伝子組換えカビのジェノタイピングにはKOD FX Neoばかり使ってきました。しかしこのKOD One®は、伸長に要する時間が大幅に短縮されているにも関わらず、KOD FX Neo並みにフルードサンプルに強いということで驚かされました。今後もKOD One®を使い続けたいと思います。



マーカー：1kb DNA Ladder

高GC配列mouse c-Maf cDNA全長配列の増幅

データご提供 福島県立医科大学 医学部 放射性同位元素研究施設 関亦 正幸 先生

実験の目的

動物細胞発現ベクター構築のための mouse c-Maf cDNA全長配列を増幅する。

実験方法

サンプルの種類

マウスT細胞から抽出したtotal RNA

サンプルの調製方法

ISOGEN (ニッポンジーン) によりtotal RNAを調製し、その後PrimeScript RT Master mix (Perfect Real Time) (タカラバイオ) にてcDNA合成したものを鋳型に用いた。

ターゲット遺伝子名と長さ

mouse c-Maf cDNA / 1.2 kb

プライマー配列

Forward Primer : GGGATCCGATGGCTTCAGAACTGGCAA

長さ : 27mer Tm : 65.1℃

Reverse Primer : GGTCGACCATGAAAAATTCGGGAGAGG

長さ : 27mer Tm : 63.5℃

●KOD One® PCR Master Mix -Blue-、A社高速・高正確 PCR Master Mix 共通

反応液組成

	(μL)
各 PCR Master Mix	3
10 μM Primer F	1
10 μM Primer R	1
cDNA	1
Total Volume	6

PCRサイクル

94℃, 2min.	
98℃, 10sec.	30cycles
55℃, 5sec.	
68℃, 15sec.	

※A社 高速・高正確 PCR Master Mixの条件でPCRを行っています。

サイクラー機種

Bioer Technology LifeECO ver 2.0

結果・考察

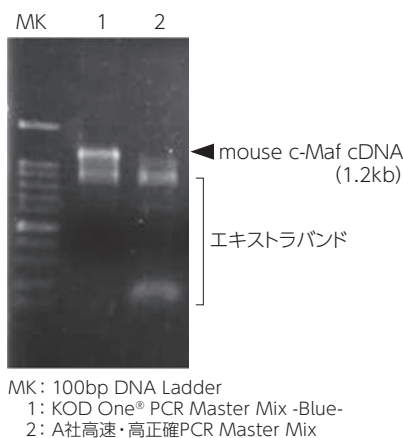
KOD One®はGC含量の多いc-Maf cDNAの1.2 kbを増幅することができた。A社高速・高正確PCR Master Mixは増幅できるがGC含量の多い領域を欠失した産物ができる。

感想・ご意見等

増幅配列はGC含量が70%と高く、局所的に94%を超えてGCが連続する配列が存在している。そのため、通常のTaqポリメラーゼでは増幅できないか、できたとしても高連続GC配列を欠失した短鎖として増幅されてしまう。DMSOを添加することでPCR反応が改善されることはあるが、常に安定した結果が得られるかは不明である。

比較のA社高速・高正確PCR Master Mixも、その中においては増幅能力の高い正確性の高い酵素であるが、図 (レーン2) にあるように高連続GC配列を欠失した短鎖として増幅されている。これに対して、KOD One® PCR Master Mix -Blue- (レーン1) では、全長の1.2kbの増幅がメインのバンドとして検出されている。このメインバンドをクローニングし、シークエンスしたところ塩基配列が正しいことが確認できた。

このことから、KOD One® PCR Master Mix -Blue-は、高連続GC配列の正確な増幅にも適していることが判明した。



遺伝子の発現ベクター間の移し替え

データご提供 慶應義塾大学 理工学部 生命分子工学研究室 藤原 慶 様

実験の目的

別々にクローン化した遺伝子を、別の発現ベクターに移し替える。

実験方法

サンプルの種類

プラスミドDNA

サンプルの調製方法

キットで精製したDNA

ターゲット遺伝子名と長さ

ベクターA (pET15由来) 6,050bp
大腸菌遺伝子A-H 1,000~2,000bp

プライマー配列

ベクター用 Forward Primer : 長さ : 20nt Tm : 55.4℃
Reverse Primer : 長さ : 18nt Tm : 56.9℃

遺伝子用 Forward Primer : 長さ : 23nt Tm : 58.8℃
Reverse Primer : 長さ : 21nt Tm : 53.8℃

相同領域

Forward側 : 81nt
Reverse側 : 117nt

※今回の実験では、移し替えるplasmid
自体に相同配列があるため、相同領域
にプライマー配列が含まれます。

反応液組成

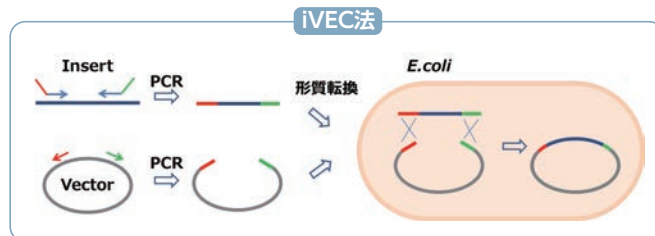
	(μ L)
滅菌蒸留水	1.4
KOD One® PCR Master Mix	2.5
3 μ M Primer F	0.5
3 μ M Primer R	0.5
50ng/ μ L Template	0.1
Total Volume	5.0

PCRサイクル

98℃, 1min.
96℃, 10sec. ← 25cycles
55℃, 10sec.
72℃, 10-35sec.

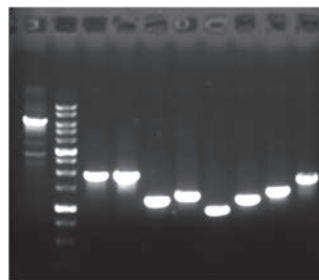
測定機器

ChemiDoc MP (Bio-Rad)



PCR後、反応液5 μ L に対しDpn I (NEB) を0.1 μ L添加
↓
37℃ 40分 (この間に電気泳動)

1 M 2 3 4 5 6 7 8 9



1: vector (約6kbp)
M: 1kbpラダーマーカー
2~9: insert (8種類の大腸菌
遺伝子, 1kbp~2kbp)
1 μ Lを泳動

↓
Vector 1.5 μ L、遺伝子 1 μ Lを混合し、12 μ LのiVEC3株のコ
ンピテントセルと混合
(資源研より供与された株を凍結保存プロトコールによりコ
ンピテントセル化したものを使用)

On ice 20分

↓
LB培地400 μ Lを添加し、37℃で60分静置↓
遠心 (12,000xg 30秒) により菌体を回収し、上清を捨てる↓
10 μ Lの10mM Tris-HCl (pH8.0) で懸濁し、即座にプレー
トへまく↓
翌日、生えたコロニーに対するコロニーPCRもKOD One®で
行った (1サンプルあたり合計3 μ Lの系)

結果・考察

各遺伝子につき1コロニーをつついたところ、8コロニー中7コロニーが当たり。

感想・ご意見等

他社の高速PCR酵素から切り替えたところ、ベクターの増幅効率が倍以上になり、なおかつベクターPCRの失敗がほとん
どなくなりました。また、iVEC3法での形質転換を活用することで、PCRからプレーティングまで2時間で終わることがで
きるようになりました。

哺乳動物細胞用発現ベクターにクローニングされた遺伝子配列への3塩基変異導入

データご提供 広島大学大学院 医歯薬保健学研究院 産科婦人科教室 助教 杉本 潤 様

実験の目的

哺乳動物細胞用発現ベクターにクローニングされた遺伝子Aに対しアミノ酸置換を誘発する3塩基の変異導入を行う。

実験方法

サンプルの種類

プラスミド：哺乳動物細胞用発現ベクター（約7.1kb）に遺伝子A（約1.8kb）をクローニングしたプラスミド

サンプルの調製方法

Qiagen midi kit で抽出、精製したプラスミド
DNA

ターゲット遺伝子名と長さ

遺伝子A：1.8kb、ベクター：7.1kb

プライマー配列

変異導入用プライマーForward（31base）

変異導入用プライマーReverse（31base）

反応液組成

	(μ L)
滅菌蒸留水	10.5
KOD One® PCR Master Mix	12.5
10 μ M Primer F	0.5
10 μ M Primer R	0.5
50pg/ μ LプラスミドDNA	1
Total Volume	25

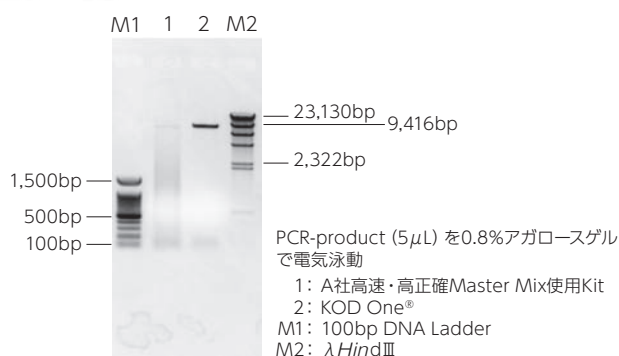
PCRサイクル

98°C, 10sec.	30cycles
55°C, 15sec.	
72°C, 40sec.	

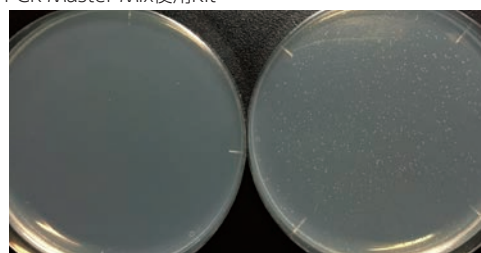
測定機器

GeneAmp PCR system 9700

結果・考察

A社高速・高正確
PCR Master Mix使用Kit

KOD One®

PCR-product 2 μ Lを直接大腸菌DH5 α に形質転換後のLBプレート像

感想・ご意見等

当研究室で使用している哺乳動物細胞用発現ベクターは、その大きさと特徴的な配列により、クローニングされた遺伝子配列への直接的な変異導入が困難であった。このことから、違うベクター（pGEM-Tなど）にクローニングした遺伝子配列へ変異を導入後、この変異を含むDNA断片を切り出し、哺乳動物細胞用発現ベクターに再クローニングする必要があった。しかし、KOD One®を用いることにより直接変異を導入することが可能となり、時間、労力の短縮につながった。

また、変異の導入効率は調べた数クローン中100%であり、近傍の配列にPCRエラーは確認されなかった。

次世代シーケンサー (NGS) のライブラリー増幅

NGSライブラリーの増幅においては、配列による増幅バイアスがないことが重要となります。KOD One® PCR Master Mixは、さまざまな配列を偏りなく増幅することが可能で、NGS分野にも応用できます。ここではKOD One® PCR Master Mixを用いて、GC率70%の *Thermus thermophilus* 由来のライブラリーを増幅し、シーケンス後のデータを比較しました。増幅に用いたライブラリーは、断片化した *Thermus thermophilus* ゲノムにイルミナ社のP5、P7配列を持つアダプターを付加したものを使用し、シーケンスにはイルミナ社 MiSeq®を使用しました。

反応液組成

	(μ L)
滅菌蒸留水	14
KOD One® PCR Master Mix	25
10pmol / μ L Primer F	5
10pmol / μ L Primer R	5
1ng/ μ L NGS library	1
Total	50

PCRサイクル

98°C, 10sec. ←
60°C, 5sec. — 14cycles
68°C, 1sec. —

プライマー配列

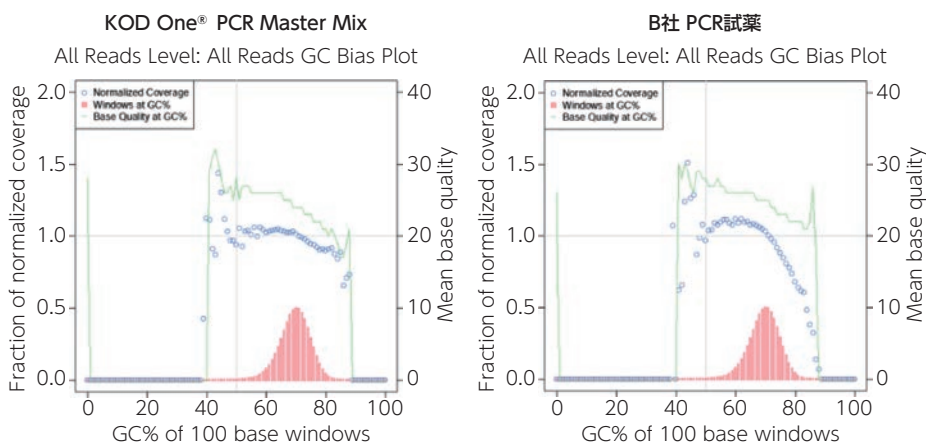
(TusSeq®用プライマー)

Forward Primer:AATGATACGGCGACCACCGACATC
Reverse Primer:CAAGCAGAAGACGGCATACGAG

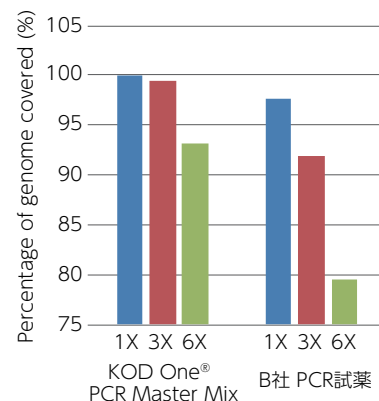
結果

ライブラリーのGC率に対して、ノーマライズされたカバレッジ(GCバイアス比較図:青色○)が1に近いほど低バイアスであることが示されます。KOD One® PCR Master Mixで増幅したライブラリーはGC率が高くてもノーマライズされたカバレッジが1に近く、バイアスが小さい結果となりました。また、同じリード数でカバレッジを比較した結果も、KOD One® PCR Master Mixの方が良好な結果となり、少ないリードでも高いカバー率を示しました。KOD One® PCR Master Mixは長鎖ターゲットの増幅にも強みがあり、Shortリードのライブラリーだけでなく、Longリードのライブラリー増幅にも応用が期待できます。

[GCバイアス比較]



[Coverage比較]



サンプル種、鋳型のサイズ分布によって、最適なサイクル数は1〜3サイクル前後する場合がありますが、ライブラリーのインプット量とサイクル数に関しては、以下をご参照ください。

インプット量	サイクル数
1 μ g	0 - 1
500 ng	1 - 2
100 ng	4 - 5
50 ng	5 - 6
10 ng	8 - 10
1 ng	13 - 15
0.25 ng	16 - 18

次世代シーケンサー(NGS)を用いたSARS-CoV-2亜系統の分類

データご提供 塩野義製薬株式会社 ワクチン開発研究所 ワクチン基盤研究1グループ 黒岩 美帆 様

実験の目的

NGSを用いた、下水に含まれるSARS-CoV-2亜系統を正確な組成比で検出するための技術開発。その精度確認のため、最大7種類の亜系統由来RNAを混合し、正確な組成比で検出できることを実験的に確認した。

(KOD One®はSARS-CoV-2cDNAの増幅・イルミナのオーバーハング配列付与のためNested PCRに使用)

サンプルの種類

SARS-CoV-2のRNA

鋳型の調製方法

既知の割合でSARS-CoV-2亜系統のRNAを混合し、混合RNA 1,000コピーをReliance Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad社) にて、下記S008プライマーでcDNA合成したものを鋳型に用いた。

ターゲット遺伝子名と長さ

1st PCR : SARS-CoV-2スパイクタンパクのRBD領域 (368-535aa)

2nd PCR : SARS-CoV-2スパイクタンパクのRBD領域 (398-504aa)

プライマー配列

1st PCR

S006:AACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCC

S008:AGTTGAAATTGACACATTTG

2nd PCR

S007:TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCTCTGCTTTACTAATGTCTATGCA

S009:GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACTACYACTCTRTATGGTTGGT

PCR条件

・1st PCR反応液組成

	(μ L)
KOD One® PCR Master Mix	20.6
40 μ M S006 Primer	0.3
40 μ M S008 Primer	0.3
cDNA溶液	20
Total Volume	41.2

・1st PCRサイクル

98°C, 3sec.
 98°C, 10sec. $\leftarrow$ 10cycles
 55°C, 5sec.
 68°C, 2sec.

・2nd PCR反応液組成

	(μ L)
KOD One® PCR Master Mix	10
20 μ M S013 Primer	0.5
20 μ M S009 Primer	0.5
1st PCR溶液	3.4
滅菌水	5.6
Total Volume	20.0

・2nd PCRサイクル

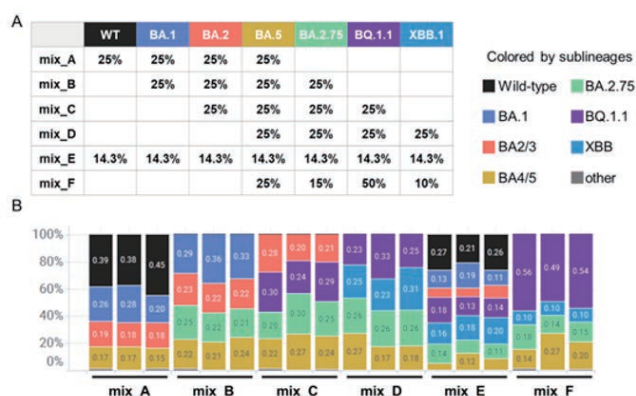
98°C, 3sec.
 98°C, 10sec. $\leftarrow$ 45cycles
 61°C, 5sec.
 68°C, 2sec.

NGSまでの処理方法

PCR増幅産物をAgencourt® AMPure® XP beads (ベックマンコールター社)で精製し、10mM Tris-HCl(pH8.5)で溶出した。溶出した増幅産物をNextera® XT Index Kit v2(イルミナ社)にて処理し、再度、Agencourt® AMPure® XP beadsで精製を行い、MiSeq®に供した。

結果・考察

得られたシーケンスリードから、亜系統の割合を計算した。



KOD One®を使用したアンプリコンシーケンスの結果、理論値に近い亜系統の割合が算出されました。KOD One®は増幅バイアスが少なく、変異率も低いいため、シーケンスターゲットの増幅にも最適であると考えます。

<文献>

Miho Kuroiwa, M. et al., Targeted amplicon sequencing of wastewater samples for detecting SARS-CoV-2 variants with high sensitivity and resolution. Science of The Total Environment. Volume 893, 1 October 2023, 164766
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164766>

MEMO

[illegible]

MEMO



TOYOBO公式X

東洋紡株式会社

バイオプロダクト営業部(大阪)
〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス

TEL.06-6348-3786 FAX.06-6348-3833
(E-mail) order_lifescience@toyobo.jp

バイオプロダクト営業部(東京)
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号
住友商事京橋ビル

TEL.03-6887-8819 FAX.03-6887-8951
(E-mail) order_lifescience@toyobo.jp

Toyoboテクニカルライン
TEL.06-6348-3888 FAX.06-6348-3833
(9:00~12:00 13:00~17:00[土日祝日、休日を除く])
(E-mail) tech_osaka@toyobo.jp

Toyobo Web Site
[<https://lifescience.toyobo.co.jp/>]