

KOD One® PCR Master Mix

評価用サンプル有

KOD One® PCR Master Mix -Blue-

高速

高正確

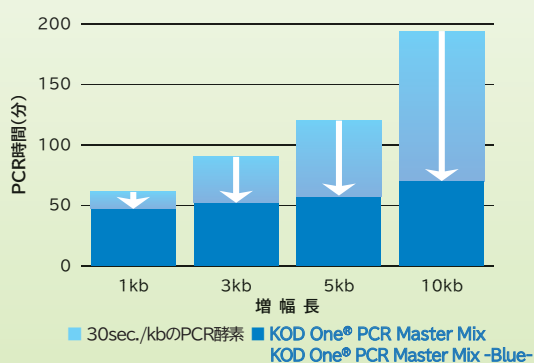
クルード
耐性

Master
Mix

各種PCRが高速で実施可能!

さらに「ホットスタート対応」+「dI, dUを含むプライマー・テンプレート対応」

●伸長速度は最速 1 sec./kbを実現!

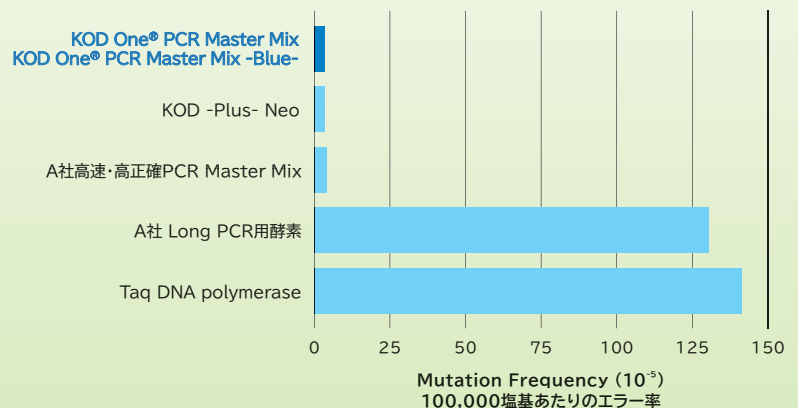


※Applied Biosystems 9700の場合

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!



●クル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!

製品概要

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-

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>

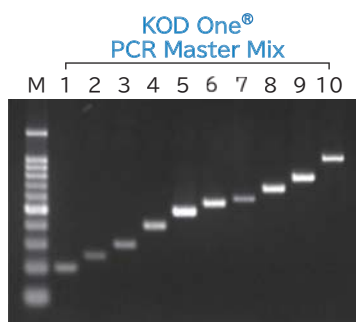
滅菌蒸留水	21μL
KOD One® PCR Master Mix	25μL
10pmol/μL Primer F	1.5μL
10pmol/μL Primer R	1.5μL
10ng/μL ヒトゲノムDNA	1μL
Total Volume	50μL

<PCRサイクル>

1 kb以下のターゲット	1～10 kbのターゲット
98℃ 10sec.	98℃ 10sec.
60℃ 5sec.	60℃ 5sec.
68℃ 1sec.	68℃ 5sec./kb
30 cycles	30 cycles

A社高速・高正確PCR Master Mixはメーカーの推奨条件に従って実施しています。

[1 kb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 : BRCA1 (800bp)
10 : CDK4 (1,000bp)

[1～10kb:伸長時間5sec./kb]



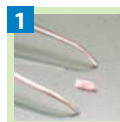
M : 1kb DNA Ladder
1 : Chrom9 (1kb)
2 : MSH6 (2kb)
3 : FANCE (3kb)
4 : RAD51D (4kb)
5 : KRAS (5kb)
6 : BRCA1 (7kb)
7 : DDB2 (10kb)

Template: ヒトゲノムDNA

実施例2

クルードサンプルからの増幅

マウステールライゼート(下記アルカリ溶解法)、ヒト全血を用いて、マウスThy-1 遺伝子、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い、伸長時間は5 sec./kb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。



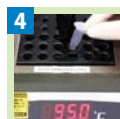
マウステール
(約3mm)



マイクロ
チューブに移す



50mM NaOH 180μL添加
ボルテックスにてよく攪拌



95℃ 10min.
1M Tris-HCl(pH8.0) 20μL添加
ボルテックスにてよく攪拌
12,000rpm, 5min.[optional]



上清 2μL
PCR(50μL)
(マウステールは完全には溶解しません。)

<反応液>

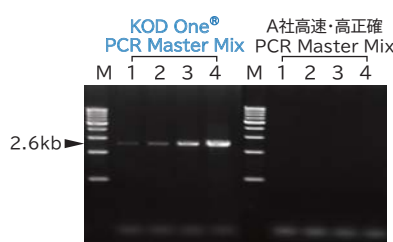
滅菌蒸留水	YμL
KOD One® PCR Master Mix	25μL
10pmol/μL Primer F	1.5μL
10pmol/μL Primer R	1.5μL
鑄型	XμL
Total Volume	50μL

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

<PCRサイクル>

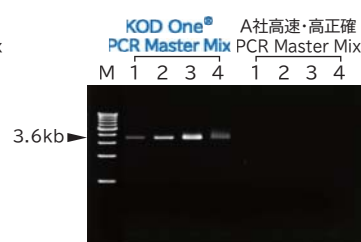
98℃ 10sec.	30 cycles
60℃ 5sec.	
68℃ 5sec./kb	

[マウステールライゼートからの増幅]



M : 1kb DNA Ladder
1 : 1μL 2 : 2μL 3 : 4μL 4 : 8μL
Template : マウスゲノムDNA
Target : Thy-1

[ヒト全血からの増幅]



M : 1kb DNA Ladder
1 : 1μL 2 : 2μL 3 : 4μL 4 : 8μL
Template : ヒトゲノムDNA
Target : HBB



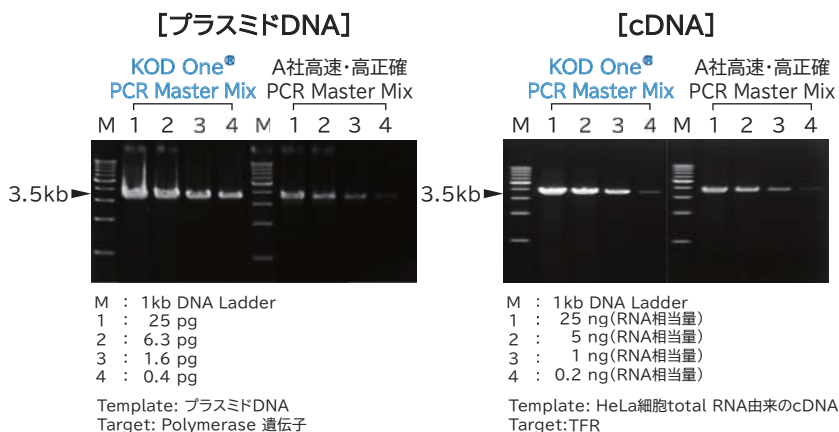
実施例3

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3.5 kbのターゲットを伸長時間5 sec./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>	
滅菌蒸留水	21μL
KOD One® PCR Master Mix	25μL
10pmol/μL Primer F	1.5μL
10pmol/μL Primer R	1.5μL
鋳型	1μL
Total Volume	50μL
<PCRサイクル>	
98°C 10sec.	30 cycles
60°C 5sec.	
68°C 18sec. (5sec./kb)	

A社高速・高正確PCR Master Mixはメーカーの推奨条件に従って実施しています。

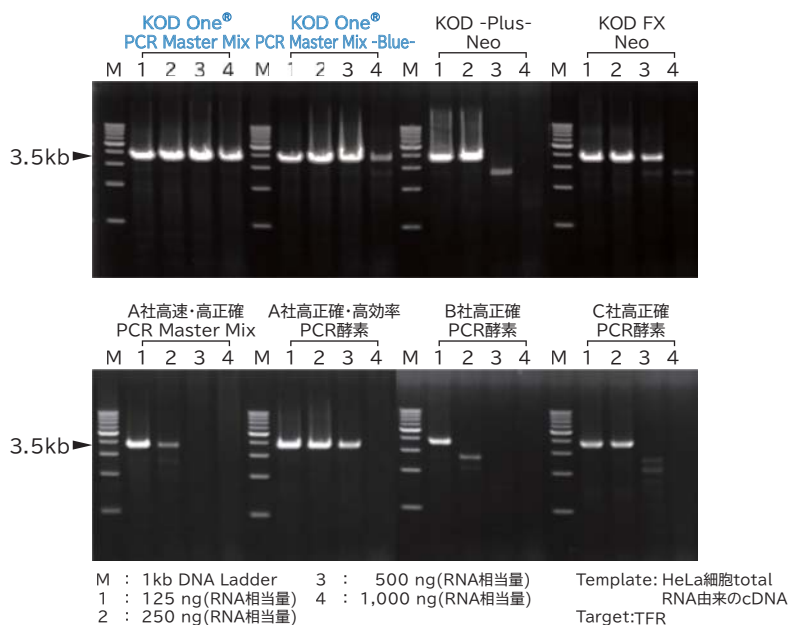


実施例4

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シリーズは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>	
滅菌蒸留水	17μL
KOD One® PCR Master Mix /-Blue-	25μL
10pmol/μL Primer F	1.5μL
10pmol/μL Primer R	1.5μL
cDNA	5μL
Total Volume	50μL
<PCRサイクル>	
98°C 10sec.	30 cycles
60°C 5sec.	
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。	

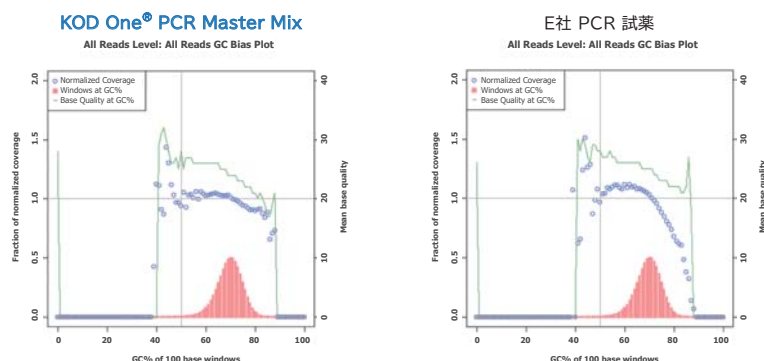


実施例5

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。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。シーケンスには イルミナ社 MiSeq®を使用しました。その結果、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、バイアスが少い結果となりました。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。

<反応液>	
滅菌蒸留水	14μL
KOD One® PCR Master Mix	25μL
10pmol/μL Primer F	5μL
10pmol/μL Primer R	5μL
1ng/μL NGS library	1μL
Total Volume	50μL
<PCRサイクル>	
98℃ 10sec.	14 cycles
60℃ 5sec.	
68℃ 1sec.	
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。	





実施例6

相補的なプライマーを用いる変異導入 (Site-Directed Mutagenesis)

相補的なプライマーを用いた変異導入法による、約5 kbのプラスミドへの変異導入(3塩基置換、3塩基欠損、3塩基挿入)を実施しました。KOD One® PCR Master Mixを使用することで、5 kbのプラスミドでも伸長時間25 sec.の高速サイクルで変異導入ができました。得られたコロニーのほとんどで変異導入が確認され、目的外変異(2nd-site mutation)は確認されませんでした。KOD One® PCR Master Mixを用いることで、迅速かつ正確に変異導入が可能です。

プライマー設計例

* Forward : Fwd, Reverse : Rev

①導入したい変異、位置を決定する

プラスミド配列

導入したい変異
置換例 ATG→TGC 5'-ATGTCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'
欠損例 ATGを除去 5'-ATGTCATGCATGCATGCATGCATGC.....CATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'
挿入例 ATGの前にAAA 5'-ATGTCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'

②Fwdプライマーの設計

変異部位を中心に5'側、3'側それぞれに12~20 bpのプラスミドにハイブリダイズする領域をつける

プラスミド配列

5'-ATGTCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'
5'-TGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3' ⇨ 置換用Fwd Primer
12~20bp 12~20bp
5'-TGCATGCATGCATGC.....CATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3' ⇨ 欠損用Fwd Primer
12~20bp 12~20bp
5'-TGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3' ⇨ 挿入用Fwd Primer
12~20bp 12~20bp

③Revプライマーの設計

上記で設計したFwdプライマーと逆相補鎖のプライマーを設計する

5'-TGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'
3'-ACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTAC-5' ⇨ 置換用Rev Primer
5'-TGCATGCATGCATGC.....CATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'
3'-ACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTAC-5' ⇨ 欠損用Rev Primer
5'-TGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'
3'-ACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTAC-5' ⇨ 挿入用Rev Primer

<反応液>

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

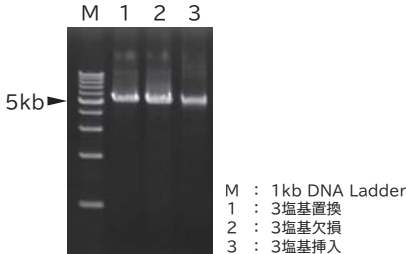
<変異導入サイクル>

98℃ 10sec.
60℃ 5sec.
68℃ 25sec.(5sec./kb) 15 cycles

上記反応液

↓ ← Dpn I [10U/μL ; Code No. DPN-101] 2μL
37℃, 1hr.
↓
JM109 [Code No. DNA-900F] を形質転換

○変異導入サイクル後の電気泳動確認



○各8クローンの変異導入率および、目的外変異数

	変異導入率	目的外変異数
3塩基置換	8/ 8クローン	0個
3塩基欠損	8/ 8クローン	0個
3塩基挿入	7/ 8クローン	0個

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



サンプル請求

【サンプル】 無償の
評価用サンプルを
ご用意しています。



実施例集

本製品を使用した
多数の実施例を
ご紹介しています。

*50μLで反応を行った場合、200回用としてご使用になれます。
1ヶ月以内を目安として2~8℃で冷蔵保存することができます。

保存温度 -20℃

※本資料に記載している会社名および商品名・ロゴマークなどは、各社の商号、商標
または登録商標です。

TOYOBO 東洋紡株式会社

バイオプロダクト営業部

(E-mail) order_lifescience@toyobo.jp

(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

(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

テクニカルライン

(E-mail) tech_osaka@toyobo.jp

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])

WEBサイト

[<https://lifescience.toyoobo.co.jp/>]



toyobo 公式 X