Code No.　KFX-201
Code No.　KFX-201X5
Code No.　KFX-201X10
保存温度　－２０℃

高成功率 PCR 酵素

KOD FX Neo

KOD FX Neo は、KOD DNA Polymerase[1,2]をベースに開発された PCR 用酵素です。優れた伸長性を示し、特にクルードサンプルからの増幅に優れています。本酵素では、通常の PCR 酵素で増幅が困難な、PCR 阻害物質を多く含むクルードサンプルからの増幅や長鎖ターゲットの増幅が可能です。
本製品は高成功率 PCR 試薬 「KOD FX (Code No. KFX-101)」に、独自のエンハンサーを添加するなどの改良を加え、更にクルードサンプルからの増幅成功率や伸長性を向上させています。
本酵素には、Polymerase 活性と 3'→5'Exonuclease 活性を抑える 2 種類のモノクローナル抗体が混合されており、簡便に特異性の高い Hot start PCR を行うことができます。

特長

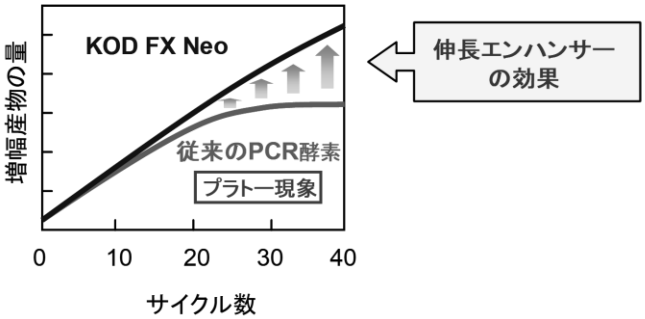
● **クルードサンプルに強い**

PCR 阻害物質を含むクルードなサンプル（生体試料、土壌、食品など）からの増幅に優れます。血液、動植物組織などでは、核酸を抽出することなく直接反応液に加えるだけで十分な増幅産物が得られます。

● **優れた伸長性**

独自の伸長エンハンサー*が添加されており、ヒトゲノム DNA をテンプレートとして 40 kb の増幅が可能になっています。精製されたテンプレートを用いる場合は、伸長時間を 30 sec./ kb で実施することができ、長いターゲットでも迅速に PCR を行うことができます。

*KOD DNA polymerase をはじめ高正確性 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>が出やすいと言われています。伸長エンハンサーはこの<プラトー現象>を抑える働きを有し、反応をより長く持続させます。そのため、微量なテンプレートからの増幅や長いターゲットの増幅で特に大きな効果を発揮します。



● **細胞壁を持つ微生物からの直接 PCR**

酵母、糸状菌、真菌など、従来、直接増幅が困難であったサンプルから直接 PCR を行うことができます。

● **高い正確性**

Taq DNA Polymerase の約 10 倍の正確性を示します〔p10 (4) ご参照〕。PCR 産物をベクターにクローニングして、シークエンス解析する場合などに有用です。

1.　内容物

	KFX-201	KFX-201X5	KFX-201X10
KOD FX Neo (1.0 U/μL)	200μL×1 本	(KFX-201)×5	(KFX-201)×10
2× PCR Buffer for KOD FX Neo	1.7 mL×3 本		
2 mM dNTPs	1 mL×2 本		

TOYOBO
＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

Ａ４４２１Ｋ

2. 安全上の注意

本製品は、研究用試薬です。診断および臨床検査用試薬として使用しないでください。また、本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。関係する実験において、人体に有害な試薬を扱う場合も予想されます。各試薬に添付されている注意書き、機器・器具に添付されている取扱説明書の指示を順守し、必要に応じて適切な保護具をご使用いただきますようお願いいたします。

3. 性能・品質

KOD FX Neo は、各ロットにおいて、ヒトゲノムDNA をテンプレートとしてβ-globin 遺伝子領域 32.0 kb の増幅ができることを確認して出荷しております。

4. PCR プロトコール

プライマー条件やサイクル条件は、従来の KOD FX とは若干異なりますのでご注意ください。

（1）プライマーの設計について

- プライマーは可能な限り、22~35mer 程度（Tm 値*＞63℃）のものをご使用ください。
- GC 含量を 45~60%で設計してください。また、GC の偏りを確認してください。GC が 3'端領域に偏っているものでは、スメア、エキストラバンドが出やすくなります。(5'側の半分は 60~70%, 3'側の半分は 40~50%の GC 含量で作製するのが理想です。)
- 3'末端を G か C で設計することでプライミング効率を高めることができます。ただし、前述したように 3'端領域に GC が偏りすぎるとスメア、エキストラバンドが出やすくなるので注意してください。
- 分子内二次構造や、プライマーダイマーの形成が起こらないように注意して設計してください。
- 長鎖ターゲットを増幅する場合は、25~35mer 程度で Tm 値が 65℃以上のプライマーをご使用ください。25mer 以上（Tm 値≧65℃）のプライマーを用いることで成功率が向上することがあります。
- イノシンを含むプライマーの使用は避けてください。

*プライマーの Tm 値の計算には、最近接塩基対法（Nearest Neighbor method）をお使いください。本取扱説明書記載のプライマーの Tm 値は、50 mM Na^+濃度と 0.5μM オリゴヌクレオチド濃度で計算した値を利用しております。
弊社では、最近接塩基対法（Nearest Neighbor method）に基づく Tm 計算プログラムを公開しています。弊社のウェブページ (https://lifescience.toyobo.co.jp/user_data/pcr_tm.php) からダウンロードしてご利用になれます。

（2）PCR 反応液の調製

反応液を調製する前に各試薬を十分攪拌してご使用ください。凍結している試薬は完全に融解してください。

Components	Volume	Final Concentration
Autoclaved, distilled water	X μL	
2× PCR Buffer for KOD FX Neo	25 μL	1×
2 mM dNTPs	10 μL	0.4 mM each
プライマー (10μM each)	0.75～1.5 μL	0.15～0.3μM each
テンプレート	Y μL	Genomic DNA ~200 ng/50μL Plasmid DNA ~50 ng/50μL cDNA ~200 ng/50μL 生体試料・粗抽出液 ~5μL/50μL
KOD FX Neo (1 U/μL)	1 μL	1 U/50μL
Total	50 μL	

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

・全ての液を添加した後、反応液をボルテックス等で十分攪拌してサーマルサイクラーにセットしてください。
・プライマー濃度は、通常、0.3μM（終濃度）にてご利用ください。10 kb以上の長鎖を増幅する場合、プライマー濃度を0.15μM（終濃度）にすることで増幅量が向上することがあります。

（3）テンプレートについて

a. 精製されたテンプレート、cDNAを利用する場合、添加量は以下を参照してください（PCR反応液50μLの場合）。

			一般的なテンプレート量
Genomic DNA	真核生物由来DNA	5~200 ng	50 ng
	原核生物由来DNA	0.1~100 ng	10 ng
Plasmid DNA		10 pg~50 ng	1 ng
cDNA		~200 ng (RNA相当量)	50 ng (RNA相当量)
λDNA		10 pg~10 ng	1 ng

・テンプレートの長さや純度はPCRの結果に大きく影響します。テンプレートの量に余裕のある場合は、事前に電気泳動して品質を確認することをお勧めします。本酵素はRNAが多量に混入した場合、PCR反応が阻害を受ける場合があります。
・逆転写反応液をテンプレートとして用いる場合、逆転写反応液中の過剰のRNAがPCR反応を阻害することがあります。PCR反応液50μLに添加する逆転写反応液量は、RNA量として200 ng以下でお試しください。
・ウラシルを含むテンプレートは使用できません。

b. PCR反応液に生体組織などのサンプルを直接添加する場合、添加量は以下を参照してください（PCR反応液50μLの場合）。

	一般的なテンプレート量	備考
大腸菌	チップに付いた少量	
酵母	チップに付いた少量	
糸状菌	チップに付いた少量	安定した増幅が得られない場合は、50μLのTEに懸濁し、2〜5μLをテンプレートに使用すると安定した結果が得られます。
培養細胞	10^1~10^5cells	
血液	1~2μL	
爪	米粒1/3程度	抽出されるDNAが微量なため、×35~40サイクルでの増幅が必要です。
髪	1~2 cm	
植物葉	2 mm角	
精米	米粒1/5程度	
マウステール	1 mm程度	アガロース電気泳動でバンドがゲルのウェルに捕捉されることがあります。*

*マウステールなど動物組織を直接増幅した場合、アガロース電気泳動でDNA断片がウェルに捕捉され目的の位置に泳動されないことがあります。泳動する際は、PCR産物50μLに対し、20 mg/mL Proteinase K 10μLを添加してから泳動することをお勧めします。

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

c. 生体試料などのライセートを用いて増幅する場合は、以下の方法でライセートを調製し、PCR を実施してください。また、ライセートは 4℃で数週間は保存可能です（長期保存の場合は-20℃で保存してください）。サンプルを複数回検討したい場合などはライセートの調製をお勧めします。

生体試料によってはライセートの調製方法が異なります。以下を参照してください。
動物組織 ⇒ ①アルカリ溶解法 or ③Proteinase K 処理法
植物組織 ⇒ ②ワンステップ法 or ③Proteinase K 処理法

①アルカリ溶解法（動物組織のライセート調製）

生体試料（添加量は右図を参照ください）
↓←50 mM NaOH 180 μL
↓ Vortex にて良く攪拌
↓ 95℃, 10 min.インキュベート
↓←1 M Tris-HCl (pH 8.0) 20 μL
↓ Vortex にて良く攪拌
↓ 遠心 12,000 rpm, 5 min.
上清（テンプレート） ⇒ 0.5～2 μL を PCR 反応液 50 μL に添加

生体試料の例
マウステール ⇒ 3 mm 程度
爪 ⇒ 5 mg 程度

生体試料が微量な場合は、添加する NaOH 量を調整してください。
（例：髪の毛 1cm 程度であれば 50mM NaOH 18 μL、1M Tris-HCl (pH 8.0) 2 μL で実施してください。）

②ワンステップ法（植物組織のライセート調製）

生体試料（添加量は右図を参照ください）
↓←溶解 Buffer 100 μL
↓ 100mM Tris-HCl (pH9.5)
↓ 1M KCl
↓ 10mM EDTA
↓ Vortex にて良く攪拌
↓ 95℃, 10 min.インキュベート
↓ Vortex にて良く攪拌
↓ 遠心 12,000 rpm, 5 min.
上清（テンプレート） ⇒ 0.5～2 μL を PCR 反応液 50 μL に添加

生体試料の例
タバコ葉 ⇒ 3 mm 角程度
精米 ⇒ 1 粒

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部 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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

③Proteinase K 処理法

生体試料（添加量は右図を参照ください）

↓←Proteinase K 溶解 Buffer 100~200 μL

↓ 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)

↓ 5 mM EDTA

↓ 400 mM NaCl

↓ 0.3% SDS

↓ 200 μg/ml Proteinase K

↓ Vortex にて良く攪拌

↓ 55℃, 60 min.以上インキュベート

↓ 95℃, 5 min.インキュベート

↓ （55℃, over night で行った場合、熱失活は必要がない場合があります）

↓ Vortex にて良く攪拌

↓ 遠心 12,000 rpm, 5 min.

上清（テンプレート） ⇒ 0.5～2 μL を PCR 反応液 50 μL に添加

生体試料の例
- マウステール ⇒ 3 mm 程度
- 爪 ⇒ 5 mg 程度
- タバコ葉 ⇒ 3 mm 角程度
- 精米 ⇒ 1 粒

ライセート調製は 96 穴プレートでも実施可能です。
一例としてマウステールを用いたライセート（アルカリ溶解法）の調製方法をお示しします。

マウステール（3 mm 程度）を 96 穴プレートに入れる

↓←50 mM NaOH 180 μL を加え、蓋をして Vortex にて良く攪拌する

↓スピンダウン（軽く振って液を下に落とす程度でも問題ありません）

↓95℃, 10 min.インキュベート（サーマルサイクラーを使用）

↓←1 M Tris-HCl (pH 8.0) 20 μL を加え、蓋をして Vortex にて良く攪拌する

↓スピンダウン（軽く振って液を下に落とす程度でも問題ありません）

上清（テンプレート） ⇒ 0.5～2 μL を PCR 反応液 50 μL に添加

※マウステール切片は、液に浸るようにカットしてください。
※熱アルカリにご注意ください。
※処理後、マウステールは完全には溶解しません。マウステールの表面が溶ける程度です。

（4）PCR サイクル条件

KOD FX Neo のサイクル条件は、2 ステップサイクルを基本サイクルとするため、条件の設定を簡便に行うことができます。プライマーの Tm 値が 68℃未満の場合、あるいは、2 ステップサイクルで増幅が見られない場合には、3 ステップサイクルをお試しください。また、10 kb 以上のターゲットを増幅する Long PCR やエキストラバンドあるいはスメアが認められた場合には、ステップダウンサイクルをお試しください。
（従来の KOD FX とは若干異なりますのでご注意ください。）

a. 2 ステップサイクル

	精製DNA･cDNAからの増幅		クルードサンプルからの増幅	
Predenature :	94℃, 2 min.		94℃, 2 min.	
Denature :	98℃, 10 sec.	25～45 cycles	98℃, 10 sec.	25～45 cycles
Extension :	68℃, 30 sec./ kb		68℃, 60 sec./ kb	

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部 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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

・クルードサンプルを増幅する場合、伸長（Extension）時間は、ターゲット鎖長1 kb あたり 60 sec.で設定してください。精製DNA、plasmidをテンプレートとする場合は、鎖長1 kb あたり 30 sec.で十分増幅可能です。
・ターゲットのコピー数が少ないと予想される場合や10 kbを超えるターゲットの場合もターゲット鎖長1 kb あたり 60 sec.で設定してください。増幅量が増加することがあります。また、サイクル数を30~45サイクルに増やすことで増幅が確認されることがあります。
・DNA変性（Denature）を94℃, 15 sec.で行うことによりターゲットの増幅量が増加することがあります。GC richターゲットでは、98℃, 10 sec.の変性条件としてください。

b. その他のサイクル

2 ステップサイクルで増幅が見られない場合は、3 ステップサイクルをお試しください。また、10 kb 以上のターゲットを増幅する Long PCR や増幅産物にエキストラバンドあるいはスメアが認められた場合は、ステップダウンサイクルをお試しください。

3 ステップサイクル

	精製DNA･cDNAからの増幅		クルードサンプルからの増幅	
Predenature :	94℃, 2 min.		94℃, 2 min.	
Denature :	98℃, 10 sec.	25～45 cycles	98℃, 10 sec.	25～45 cycles
Annealing :	(Tm)℃, 30 sec.		(Tm)℃, 30 sec.	
Extension :	68℃, 30 sec./ kb		68℃, 60 sec./ kb	

・アニーリング温度はプライマーのTm値に設定してください。

ステップダウンサイクル

	精製DNA･cDNAからの増幅		クルードサンプルからの増幅	
Predenature :	94℃, 2 min.		94℃, 2 min.	
Denature :	98℃, 10 sec.	5 cycles	98℃, 10 sec.	5 cycles
Extension :	74℃, 30 sec./ kb		74℃, 60 sec./ kb	
Denature :	98℃, 10 sec.	5 cycles	98℃, 10 sec.	5 cycles
Extension :	72℃, 30 sec./ kb		72℃, 60 sec./ kb	
Denature :	98℃, 10 sec.	5 cycles	98℃, 10 sec.	5 cycles
Extension :	70℃, 30 sec./ kb		70℃, 60 sec./ kb	
Denature :	98℃, 10 sec.	15 ～ 30 cycles	98℃, 10 sec.	15 ～ 30 cycles
Extension :	68℃, 30 sec./ kb		68℃, 60 sec./ kb	
Extension :	68℃, 7 min.		68℃, 7 min.	

・クルードサンプルを増幅する場合、伸長（Extension）時間は、ターゲット鎖長1 kb あたり 60 sec.で設定してください。精製DNA、plasmidをテンプレートとする場合は、鎖長1 kb あたり 30 sec.で十分増幅可能です。
・ターゲットのコピー数が少ないと予想される場合や10 kbを超えるターゲットの場合、伸長時間を60 sec./kbに延長することで増幅量が増加することがあります。
・DNA変性（Denature）を94℃, 15 sec.で行うことによりターゲットの増幅量が増加することがあります。GC richターゲットでは、98℃, 10 sec.の変性条件としてください。

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

5. PCR をうまく行うために
   - 反応チューブはできるだけ thin-wall タイプのものをご使用ください。また、PCR 反応液量は total 50μL にすることをお勧めします。
   - 滅菌水、プライマーは事前に小分け分注を行って保存し、都度使い切りにすることをお勧めいたします。
   - dNTPs は必ず本製品添付のもの、あるいは弊社別売の「dNTPs Mixture（2 mM）（Code No. NTP-201）」をご使用ください。

6. PCR 産物のクローニングについて
   - 本製品で増幅した PCR 産物の末端形状は、blunt end（平滑末端）になっています。
     従って、PCR 産物をクローニングする場合には、あらかじめリン酸化したプライマーを用いるか、PCR 産物の末端をリン酸化した後、blunt end を利用したクローニングを行ってください。
     TA クローニングを行う場合には、弊社 KOD DNA Polymerase 用 TA クローニングキット「TArget Clone™ -Plus-（Code No. TAK-201）」を用いることにより、未精製 PCR 産物を用いて、簡便に TA クローニングを行うことができます。
     また、TArget Clone™ -Plus-のパーツ別売品である「10× A-attachment Mix（Code No. TAK-301）」を用いることで、PCR 産物の 3'末端に A を付加することができ、そのまま任意の T ベクターに PCR 産物をクローニングすることができます。その際のライゲーション試薬としては、TA クローニングに優れる「Ligation high Ver. 2 （Code No. LGK-201）」をお勧めします。
   - 本製品で増幅した PCR 産物を制限酵素にて処理し、その突出末端を利用してクローニングを行う場合には、制限酵素処理前に増幅産物の精製を行ってください。
     DNA Polymerase が残存している場合、本酵素の持つ 3'→5' Exonuclease 活性により制限酵素処理中に突出末端が削られる可能性があります。増幅産物の精製は、フェノール/クロロホルム処理を行った後、エタノール沈殿を行うか、弊社の磁性ビーズを利用した DNA 精製キット「MagExtractor™-PCR & Gel Clean up-（Code No. NPK-601）」を利用すると便利です。

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

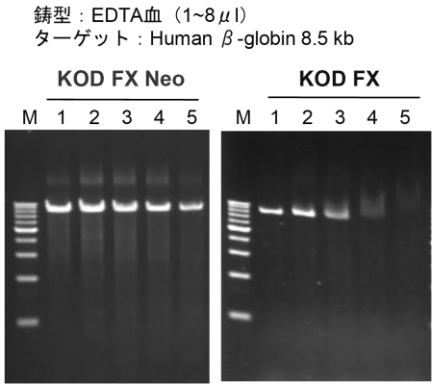
7. 性能データ

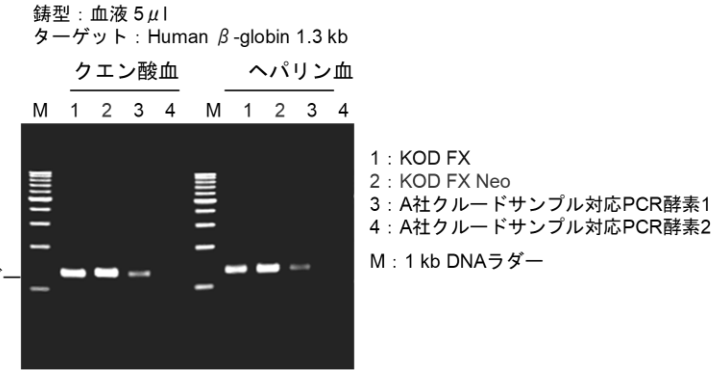
（1）クルードサンプルからの増幅比較

a. 血液

KOD FX Neo 及び KOD FX を用いて、50μL 反応液中に添加できる血液量（EDTA 血）を比較しました。増幅ターゲットにはβ-globin 遺伝子 8.5 kb を用い、反応はそれぞれの PCR 酵素の推奨条件に従って、30 サイクルにて実施しました。その結果、KOD FX では血液 4μL の添加で阻害がかかるのに対し、KOD FX Neo では 8μL 添加しても増幅が確認されました。また、増幅量においても KOD FX を大幅に上回る収量が得られました（下左図）。

KOD FX Neo ではクエン酸血、ヘパリン血からでも増幅が可能です。50μL 反応系に 5μL の血液を添加し、β-globin 遺伝子 1.3 kb の増幅を比較した結果、KOD FX、他社 PCR 酵素では阻害が見られるのに対し、KOD FX Neo では十分な増幅が確認されました（下右図）。



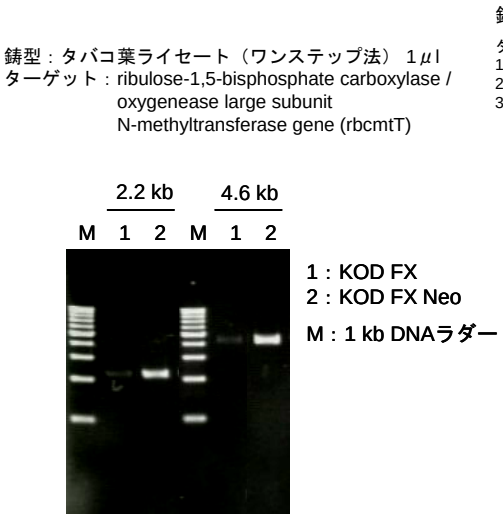


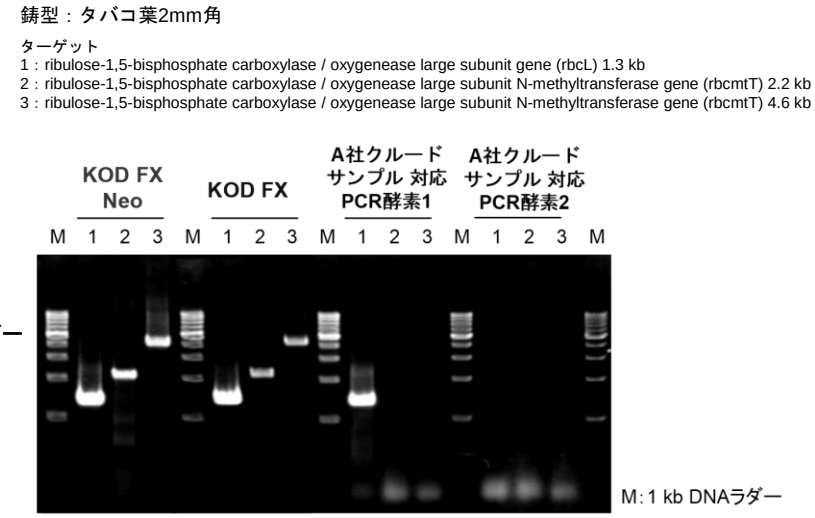
b. 植物葉

タバコ葉ライセートを用いて、KOD FX Neo 及び KOD FX 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、35 サイクルにて実施しました。結果、KOD FX で増幅が見られない条件でも、KOD FX Neo では明確なバンドが確認されました（下左図）。

KOD FX シリーズでは植物組織や動物組織を PCR 反応液に直接添加しても増幅が可能です。

KOD FX Neo 及び従来の PCR 酵素を用いて、50μL の反応液に 2mm 角のタバコ葉を添加し、様々な長さのターゲットの増幅を比較しました。その結果、他社 PCR 酵素では増幅が見られないのに対し、KOD FX、KOD FX Neo では十分な増幅が確認されました。なお、KOD FX Neo では、KOD FX に比べ増幅量が向上していることが示されました（下右図）。

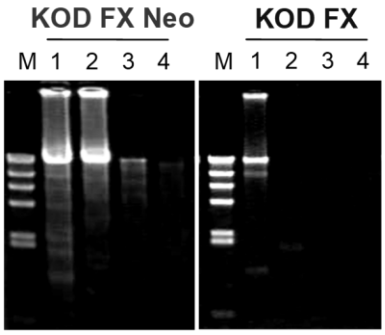




＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

（2）伸長性

KOD FX Neo 及び KOD FX を用いて、ヒトゲノム DNA をテンプレートに長鎖ターゲットの増幅を行いました。反応はステップダウンサイクルにて実施しました。その結果、KOD FX Neo では 40 kb まで増幅を確認することができました。



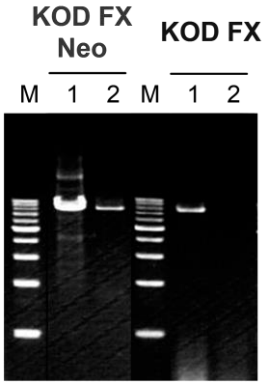
鋳型：ヒトゲノム 200 ng

1：Human tissue-type plasminogen activator (tPA) 24 kb
2：Human β-globin 32 kb
3：Human β-globin 40 kb
4：Human β-globin 50 kb

M：λ/*Hind*Ⅲ digest

（3）増幅効率・検出感度

KOD FX Neo には、独自の伸長エンハンサーが添加されており、反応をより長く持続させることができます。そのため、サイクル数を増やすことにより微量なテンプレートからの増幅が可能になっています。β-globin 遺伝子 8.5 kb の増幅を様々な量のヒトゲノムから 40 サイクルにて実施し、KOD FX Neo 及び KOD FX の増幅量を比較しました。その結果、KOD FX Neo は KOD FX を上回る増幅量を示し、より少ない鋳型で増幅が可能でした。

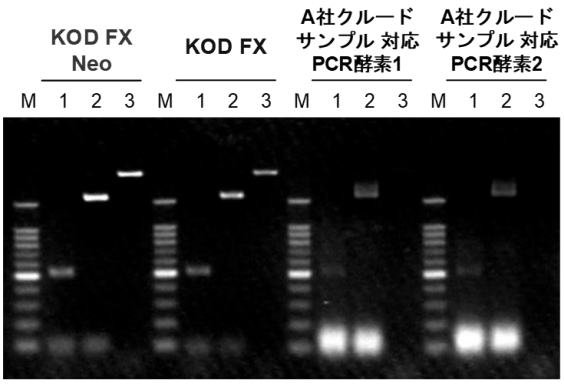


鋳型：ヒトゲノム
ターゲット：Human β-globin 8.5 kb

1：0.1 ng
2：0.01 ng

M：1 kb DNAラダー

クルードサンプルを用いても同様な結果が期待できます。KOD FX Neo 及び従来の PCR 酵素を用いて、マウステールライセートから様々な長さのターゲットを増幅し比較しました。その結果、KOD FX Neo では KOD FX を上回る増幅量を示し、他社 PCR 酵素では増幅できない微量な鋳型量からも明確なバンドが確認されました。



鋳型：マウステールライセート（アルカリ溶解法） 0.25 μl

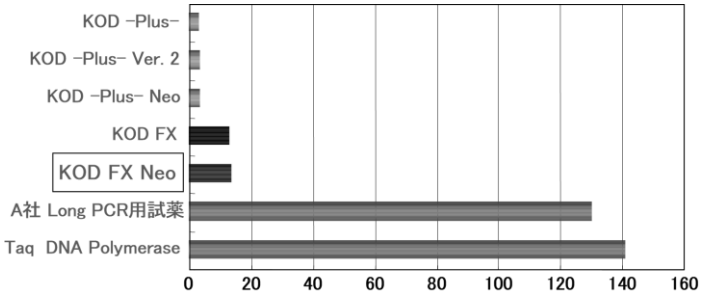
1：Mouse TATA box binding protein (TBP) 0.5 kb
2：Mouse transferrin receptor (Tfr) 1.5 kb
3：Mouse membrane glycoprotein (Thy-1) 2.6 kb

M：100 bp DNAラダー

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

（4）正確性

ヒトゲノムDNAをテンプレートにβ-globin遺伝子の増幅を行い、PCR産物を「TArget Clone™ -Plus-（Code No. TAK-201）」を用いてTAクローニングを行いました。その後、各クローンからplasmidを精製しシーケンシングを行い、配列を確認しました。その結果、KOD FX NeoはKOD FXと同等の正確性を示しました。この正確性はTaq DNA Polymeraseの約10倍優れている値です。



100,000塩基あたりのエラー数

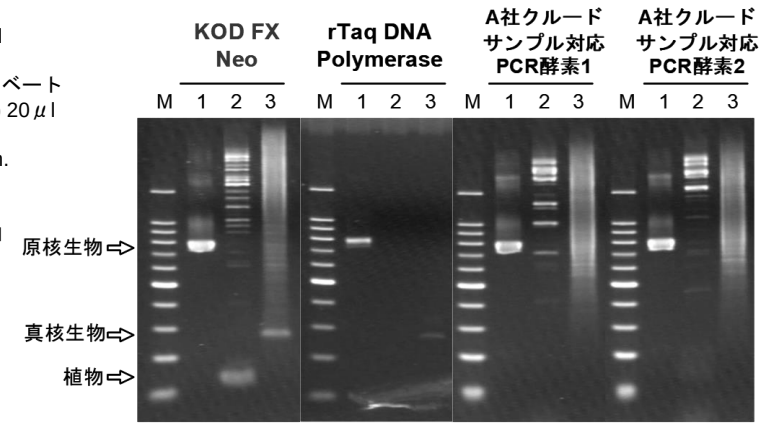
8. 実施例

【実施例 1】土壌からの増幅

土壌の処理方法にはProteinase Kを用いる方法など様々な方法が報告されています。ここでは、生体組織の前処理などで有効であったアルカリ溶解法を応用した一例を紹介します。

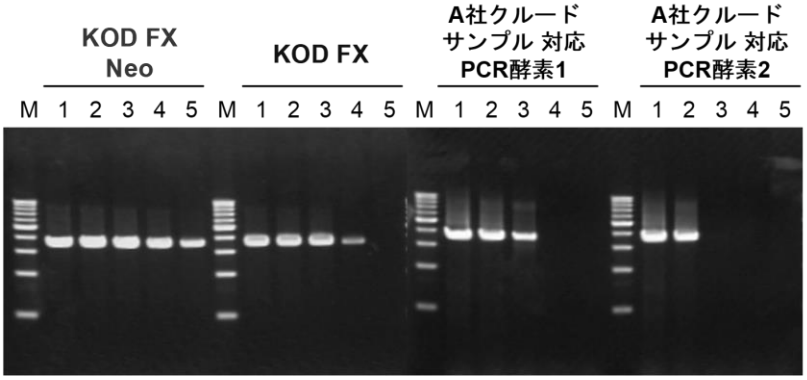
土壌100 mgをアルカリ溶解法にて処理し、上清1 μLを用いて、土壌に含まれている微生物、植物ゲノムの検出を実施しました。結果、KOD FX Neoのみ、すべてにおいて増幅が確認されました。

土壌100 mg
↓←50 mM NaOH 180 μl
↓ Vortexにて良く攪拌
↓ 95℃, 10 min.インキュベート
↓←1 M Tris-HCl (pH8.0) 20 μl
↓ Vortexにて良く攪拌
↓ 遠心12,000 rpm, 5 min.
上清（ライセート）
↓
1 μlをPCR反応液50 μlに添加



1：原核生物共通 (790 bp程度)
2：植物共通 (124 bp)
3：真核生物共通 (280 bp程度)
M：100 bp DNAラダー

土壌にはフミン酸と呼ばれるPCR阻害物質が存在していることが知られています。このフミン酸は通常のDNA抽出では除くことができません。KOD FX Neoはフミン酸に対する耐性が従来のPCR酵素と比べ高く、土壌などのクルードサンプルからでも増幅ができる可能性があります。



鋳型：ヒトゲノム 10 ng
ターゲット：Human β-globin 3.6 kb

1：フミン酸添加なし
2：OD280 = 1のフミン酸 2 μl添加
3：OD280 = 1のフミン酸 3 μl添加
4：OD280 = 1のフミン酸 4 μl添加
5：OD280 = 1のフミン酸 5 μl添加

M：1 kb DNAラダー

* フミン酸は土壌よりアルカリで溶出し、酸で沈殿させたものを再び、アルカリに溶解し調製した

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

9. トラブルシューティング

問題	対策	具体例･目安
増幅産物が見られない。 増幅産物が少ない。	サイクル条件を変更する。	伸長時間を 60 sec./ kb に延長する。 〔検討例 1 ご参照〕
		サイクル数を 2~5 サイクル増やす。
		3 ステップサイクルで行う。 3 ステップサイクルでアニーリング温度を Tm-5~Tm-10℃に下げる。
		ステップダウンサイクルで行う(特に 10 kb 以上の長鎖ターゲットで有効な場合がある)。
	使用しているテンプレートの量、品質を確認する（特に、テンプレートに RNA 等がコンタミしてないか確認する)。	テンプレートの量を増やす。
		阻害物質の影響を減らすため、テンプレート量を減らす。
		テンプレートの調製法を検討する。 〔検討例 2 ご参照〕
		テンプレートを精製する。
		RNA による阻害をなくすため、cDNA サンプル量を減らす。
		RNA を分解もしくは除去する。
	使用しているプライマーの量、品質を確認する。	プライマー濃度を 0.3μM から 0.15μM（終濃度）にする（特に 10 kb 以上の長鎖ターゲットで有効な場合がある)。
		プライマーを再調製、再合成する。
		プライマーを設計し直す。
	使用酵素量を増やす。	標準 1 U を 1.5~2.0 U に増やす。
スメア、エキストラバンドが見られる。	サイクル条件を変更する。	3 ステップサイクルで行っている場合、2 ステップサイクルに変更する。
		2 ステップサイクルで行っている場合、ステップダウンのサイクルで行う。
		サイクル数を 2~5 サイクル程度減らす。
	使用しているテンプレートの量を確認する。	テンプレートの量を減らす。
	使用しているプライマーの品質を確認する。	プライマーを再調製、再合成する。
		プライマーを設計し直す（長めのプライマーを設計するとスメア、エキストラバンドが解消する場合がある)。
	使用酵素量を減らす。	標準 1 U を 0.5~0.8 U に下げる。
TA クローニングできない。	専用のキットを用いる。	専用 TA クローニングキット「TArget Clone™ -Plus-（Code No. TAK-201)」を用いる。 （KOD FX Neo の増幅産物の末端は平滑化されています。）

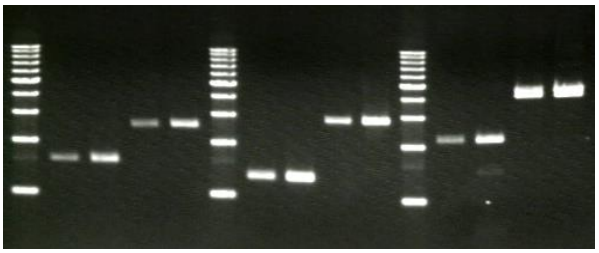
＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

■検討例１：伸長時間の検討

伸長時間 30 sec./ kb と 60 sec./ kb で、クルードサンプルから様々な遺伝子を増幅しました。結果、60 sec./ kb で増幅した方が増幅量が多いことがわかります。クルードサンプルでは伸長時間を 60 sec./ kb で実施することをお勧めします。

①マウステール　②爪　③タバコ葉

M 1 2 1 2 M 1 2 1 2 M 1 2 1 2



1：30 sec./ kb
2：60 sec./ kb

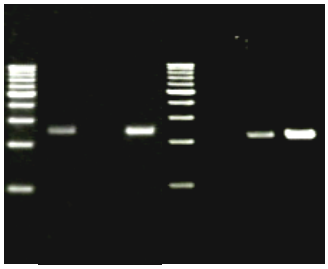
①鋳型：マウステールライセート（アルカリ溶解法）
　ターゲット：Mouse TBP 0.5 kb
　　Mouse Tfr 1.5 kb
②鋳型：爪ライセート（アルカリ溶解法）
　ターゲット：Human β-globin 1.3 kb
　　Human β-globin 2.8 kb
③鋳型：タバコ葉ライセート（ワンステップ法）
　ターゲット：rbcmtT 2.2 kb
　　rbcmtT 4.6 kb
M：1 kb DNAラダー

■検討例２：ライセート調製方法の検討

マウステール、タバコ葉を用いて、様々なライセート調製法を比較しました。結果、マウステールライセートはアルカリ溶解法、Proteinase K 処理法が適しており、タバコ葉はワンステップ法、Proteinase K 処理法が適していることが示されました。動物組織のライセート調製にはアルカリ溶解法か Proteinase K 処理法を、植物組織のライセート調製にはワンステップ法か Proteinase K 処理法を用いることをお勧めします。特に、アルカリ溶解法とワンステップ法は迅速法として優れた方法です。増幅量が少ない場合は、サイクル数を増やすことにより改善することができます。

マウステール　タバコ葉

M 1 2 3 M 1 2 3



マウステールターゲット：Mouse Thy-1 2.6 kb
タバコ葉ターゲット：rbcmtT 2.2 kb

1：アルカリ溶解法
2：ワンステップ法
3：Proteinase K処理法

M：1 kb DNAラダー

10. 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**, 4504-4510 (1997)
(2) Hashimoto, H., Matsumoto, T., Nishioka, M., Yuasa, T., Takeuchi, S., Inoue, T., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., and Kai, Y., *J. Biochem.* (Tokyo), **125**, 983-986 (1999)
(3) Mizuguchi, H., Nakatsuji, M., Fujiwara, S., Takagi, M., and Imanaka, T., *J. Biochem.* (Tokyo), **126**, 762-768 (1999)
(4) Nishioka, M., Mizuguchi, H., Fujiwara S., Komatsubara, S., Kitabayashi, M., Uemura, H., Takagi, M., and Imanaka, T., *J. Biotechnol.* **88**, 141-149 (2001).
(5) Hashimoto, H., Nishioka, M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., Inoue, T., and Kai. Y., *J. Mol. Biol.*, **306**, 469-77 (2001).
(6) Imanaka, T., and Takagi, M., *J. Chin. Inst. Chem. Engrs.*, **32**, 277-288 (2001).

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

11. 関連商品

品　名	包装	Code.No.
<KOD FX Neo 用 PCR Buffer> 2× PCR Buffer for KOD FX Neo	1.7 mL×3 本 (200 回用)	KFX-2B
<高成功率 PCR 酵素> KOD FX	200 U×1 本 (200 U×1 本)×5 (200 U×1 本)×10	KFX-101 KFX-101X5 KFX-101X10
<高正確性 PCR 酵素> KOD -Plus-	200 U×1 本 (200 U×1 本)×5 (200 U×1 本)×10	KOD-201 KOD-201X5 KOD-201X10
<高正確性 PCR 酵素(正確性をそのままに PCR 成功率 UP)> KOD -Plus- Ver.2	200 U×1 本 (200 U×1 本)×5	KOD-211 KOD-211X5
<高正確・高効率・高速 PCR 酵素> KOD -Plus- Neo	200 U×1 本 (200 U×1 本)×5 (200 U×1 本)×10	KOD-401 KOD-401X5 KOD-401X10
<KOD DNA Polymerase 用高効率 TA クローニングキット> TArget Clone™ -Plus-	10 回用	TAK-201
<TA クローニング用 A 付加試薬(KOD 用)> 10× A-attachment Mix	25μL×1 本 (25 回用)	TAK-301
<高効率ライゲーションキット> Ligation high Ver.2	750μL×1 本 (100 回用)	LGK-201
<磁性ビーズを利用した DNA fragment 精製キット> MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-	200 回用	NPK-601

.

. ※弊社ウエブサイトの製品ページに本製品の実施例を掲載しております。ご確認ください。

https://lifescience.toyobo.co.jp/detail/detail.php?product_detail_id=165

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）バイオプロダクト営業部　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 (土日祝日、休日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] https://lifescience.toyobo.co.jp/

【製造･販売元】

ー価格・在庫に関するお問合わせー

TOYOBO

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

東洋紡株式会社　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