

Code No. KMM-101, KMM-201 Code No. KMM-101X5, KMM-201X5 Code No. KMM-101X10, KMM-201X10

保存温度 -20℃

高速·高正確·高成功率 PCR Master Mix

KOD One® PCR Master Mix KOD One® PCR Master Mix -Blue-

KOD One® PCR Master Mix / KOD One® PCR Master Mix -Blue- は、改変型 KOD DNA polymerase(UKOD)を含んだ PCR 用 2×マスターミックスです。

高い正確性・増幅効率をもつ改変型 KOD DNA polymerase (UKOD) に、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、伸長時間 5 sec./ kb での高速 PCR を実現しました。高い成功率を併せ持ち、クルードサンプルからの増幅、イノシンやウラシルを含むプライマー・テンプレートを用いた増幅にもご利用できます。

本製品は 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、特異性の高い Hot start PCR を行うことができます。Loading Dye を含まないノーマルタイプの 2×マスターミックス(KOD One® PCR Master Mix; Code No. KMM-101)と Loading Dye(BPB)を含む 2×マスターミックス(KOD One® PCR Master Mix-Blue-; Code No. KMM-201)の 2 種類を用意しています。

特長

● 高速 PCR が可能

1 kb 以下のターゲットであれば伸長時間 1 sec.で増幅が可能です。1 ~10 kb のターゲットにおいても伸長時間 1 kb あたり 5 sec.での増幅が可能であり、PCR の反応時間を大幅に短縮することができます。伸長時間を長めに設定することもできるため、同一サイクルでさまざまな長さのターゲットを増幅することが可能です。

● 簡便

プライマー・テンプレート以外の成分があらかじめ混合されており、反応液調製が容易です。操作手順を減らすことで再現性の高い結果を得ることができます。また KOD One® PCR Master Mix -Blue- (Code No. KMM-201) は Loading Dye (BPB) が混合されており、反応終了後、そのままゲルにアプライすることが可能です。

● 高い正確性

Taq DNA polymerase の約80倍の正確性(KOD-Plus-シリーズと同等)を示します。ヒトゲノム DNA をテンプレートとして40kbの増幅が可能になっており、長いターゲットでも迅速に、かつ正確に増幅することができます。増幅産物はクローニングをはじめ、さまざまな用途に用いることが可能です。

● クルードサンプルからの増幅が可能

伸長アクセラレーターの添加により、確実性が向上しています。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)から核酸を精製することなく、目的遺伝子を増幅することが可能です。

● GC-rich、AT-rich なターゲットでもバイアスなく増幅が可能

ターゲットの配列に依存することなく、均一な増幅が可能です。次世代シークエンスではライブラリーの増幅バイアスがカバレッジに影響します。本製品は、低バイアスかつ、高速な増幅が可能なため、Short リードのライブラリー増幅だけでなく、Long リードのライブラリー増幅にも最適です。





● イノシン・ウラシルを含むプライマー・テンプレートに対応

KOD DNA polymerase をはじめ従来の高正確性 PCR 酵素は、イノシンやウラシルを塩基のエラーとして認識し、反応を停止させる機構があることが知られています。本製品は、イノシンやウラシルの影響を受けないよう改変を施した KOD DNA polymerase (UKOD) を用いており、従来の高正確性酵素では増幅ができなかったイノシン・ウラシルを含むプライマー・テンプレートを用いた増幅が可能です。

1. 内容物

品 名	KMM-101*	KMM-101X5	KMM-101X10
KOD One® PCR Master Mix	1 mL×5本	(1ml × 5 ★) × 5	(1mL×5本)×
		(1mL×5本)×5	10

品 名	KMM-201*	KMM-201X5	KMM-201X10
KOD One® PCR Master Mix -Blue-	1 mL×5本	(1ml × 5 ±) × 5	(1mL×5本)×
		(1mL×5本)×5	10

^{*50} µL で反応を行った場合、200 回用としてご使用になれます。

- ・それぞれ、反応 Buffer、dNTPs、Mg²⁺、ポリメラーゼ及び抗ポリメラーゼ抗体を含む 2 × マスターミックスです。 KOD One® PCR Master Mix -Blue-には Loading Dye(BPB)が混合されており、反応終了後、そのままゲルにアプライすることができます。
- ・製品到着後は、-20°C で凍結保存してください。使用時は、融解後、ボルテックスミキサーなどでよく混和し溶液を完全に均質化した上でご使用ください。その後は、1ヶ月以内を目安として、2~8°Cで冷蔵保存することができます。長期間使用しない場合は、-20°Cで再度凍結保存してください。凍結融解の繰り返しは、20 回程度では品質に影響がないことが確認されています。

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になりますようお願いいたします。

3. 性能·品質

KOD One® PCR Master Mix / KOD One® PCR Master Mix -Blue- 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伸長時間 50 sec.で 10 kb の増幅ができることを確認しています。

本取扱説明書のデータは代表例であり、保証値ではありません。

4. PCR プロトコール

- (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*1>63°C) をご使用ください。
- ・GC 含量を 45~60%で設計してください。
- ・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 含量になるように設計することで特異性を高めることができます。
- ・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、上記のように 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°C以上のプライマーをご使用ください。 25mer 以上 (Tm 値≧65°C) 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。
- ・従来の高正確性 PCR 酵素では使用できなかったイノシン*2やウラシル*3を含むプライマーを用いた増幅、バイサルファイト処理済みのテンプレート*4の増幅が可能です。メタゲノム解析などの用途に使用いただけます。
 - *1 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、Na*濃度を50 mM、プライマー濃度を0.5 μMとして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。弊社ウェブページ(https://lifescience.toyobo.co.jp/detail/detail.php?product_detail_id=241)、本製品のワンポイントアドバイスのリンクからダウンロードしてご利用になれます。
 - *2 最近接塩基対法(Nearest Neighbor method)を用いてイノシンを含むプライマーのTm値を計算することはできません。 ミスマッチを含むプライマーと同様に、イノシンを除いた配列で大まかなTm値を求め、その値を参考に最適条件を検討してください。
 - *3 ウラシルを含むプライマーのTm値を計算する場合、ウラシル(U)をチミン(T)として計算してください。
 - *4 バイサルファイト変換後ではメチル化されていないシトシンがウラシルに変換されているため、プライマー設計が設計ソフトなしでは困難な場合があります。そのため、バイサルファイト処理後の配列に対するプライマー設計は上記(1)の設計に基づいて、専用の設計ツールを利用することを推奨します。フリーのオンラインツールとしては MethPrimer (https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi) などを推奨します。

(2) PCR 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。

Components	Volume	Final Concentration
Autoclaved, distilled water	ΧμL	
KOD One® PCR Master Mix	25 µL	1×
プライマー (10 μM each)	1.5 µL	0.3 μM each
テンプレート	ΥµL	Genomic DNA ~200 ng / 50 μL Plasmid DNA ~50 ng / 50 μL cDNA(RNA 相当量)~750 ng / 50 μL 生体試料・粗抽出液 ~5 μL / 50 μL
Total	50 µL	

- ・全ての液を混合した後、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、0.3 µM (終濃度)を推奨しますが、10 kb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)に下げることで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。

(3) PCR サイクル条件

KOD One® PCR Master Mix / KOD One® PCR Master Mix -Blue-では、プライマーのアニーリングを確実にさせるため、3 ステップサイクルを推奨します。3 ステップサイクルにおいて、エキストラバンドあるいはスメアが認められたときは2 ステップサイクルや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

Denaturation: 98°C, 10 sec.

Annealing : $(Tm - 5)^{\circ}C$, 5 sec. Extension : $68^{\circ}C$, 1 ~10 sec./ kb ______ のように設定してください。 25~45 cycles 1 kb 以下 : 1 sec.*1,2 1~10 kb : 5 sec./ kb*2

10 kb ~ : 10 sec./ kb*2

伸長時間は、ターゲット鎖長に応じて以下

TOYOBO



- ・アニーリング(Annealing)は、プライマーの(Tm 5) $^{\circ}$ Cに設定ください。(Tm-5) $^{\circ}$ Cが68 $^{\circ}$ Cを上回る場合は 68℃に設定してください。
- ・DNA変性 (Denaturation) は、98℃, 10 sec.を推奨します。94℃で変性を行う場合は、15 sec.に設定してく
- ・本製品は抗体を用いたHot Start法を採用しています。初めのDNA変性(98 $^{\circ}$ C, 10 sec.)で抗体は失活するこ とを確認していますが、PCR機器によってはサイクルの初めに94°C, 2min.などのPredenaturationを入れた方 が増幅量が向上する場合がございます。
- *1 PCR機器によっては1 sec.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5 sec.に設定してください。
- *2 増幅量が少ない場合は伸長時間を鎖長1 kbあたり10 ~30 sec.に延ばすことで改善することがあります。ターゲットのコ ピー数が少ないと予想される場合やクルードサンプルからの増幅においては鎖長1 kbあたり10 sec.で設定してください。

3 ステップサイクルでエキストラバンドあるいはスメアが認められたときは、以下の 2 ステップサイクルをお 試しください。また2ステップサイクルでもエキストラバンドあるいはスメアが認められたときは、ステップ ダウンサイクルをお試しください。特異性が向上し、検出感度が上がる場合があります。

2ステップサイクル

Denaturation: 98°C, 10 sec. 25~45 cycles 68°C, 5~10 sec./kb Extension: ステップダウンサイクル Denaturation: 98°C, 10 sec. 5 cycles 74°C, 5~10 sec./kb Extension: 98°C, 10 sec. Denaturation: 5 cycles Extension: 72°C, 5~10sec./ kb 98°C, 10 sec. Denaturation: 5 cycles Extension: 70°C, 5~10 sec./kb Denaturation: 98°C, 10 sec. $15 \sim 30$ Extension: 68°C, 5~10 sec./kb cycles

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。

. 向几百万 ナンニー・・プロ・

1 kb 以下 : 5 sec.*3 1~ 10 kb : 5 sec./ kb*3 10 kb ~ : 10 sec./ kb*3

*3 ターゲット鎖長が1 kb以下の場合でも5 sec.程度を設定してください。 増幅量が少ない場合は伸長時間を鎖長1 kbあた り10~30 sec.に延ばすことで改善することがあります。 ターゲットのコピー数が少ないと予想される場合やクルードサ ンプルからの増幅においては、鎖長1 kbあたり10 sec.で設定してください。

(4) 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 50 µL場合)

			一般的なナンノレート重
Genomic DNA	─ 真核生物由来DNA	1~200 ng	50 ng
	└─ 原核生物由来DNA	0.1~200 ng	10 ng
Plasmid DNA		1 pg~50 ng	10 ng
cDNA		1ng~750 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。 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 50 µL 添加する逆転写反応液量は、RNA 量として 750 ng 以下でお試しください。 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50 µL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、50 µlのTE Buffer に懸濁し、2~5 µL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 ⁵ cells	
血液*1	1~2 µL	
Л	米粒1/3程度	
髪	1~2 cm	抽出されるDNAが微量なため、×35~45サイクルでの
		- 増幅が必要です。
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。*2

- *1 血液抗凝固剤がPCR を阻害することがあります。抗凝固剤を使用する場合はEDTA採血管、クエン酸採血管をご使用ください。
- *2 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 50 µL に対し、20 mg/mL Proteinase K 10 µL を添加してから泳動することをお勧めします。
- c. 生体試料など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。生体試料は、細かくつぶすことで抽出効率が上がります。組織や葉などの柔らかい試料は溶液中でペッスルなどを用いてホモジナイズすることをお勧めします。また<u>爪や種子などの硬い試料は事前にすり鉢やハンマーなどで砕いてから処理することをお勧めします。</u>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 ③ Proteinase K 処理法

植物組織 ⇒ ② ワンステップ法 or ③ Proteinase 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°C, 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.

生体試料の例 マウステール ⇒ 3 mm 程度

爪 ⇒ 5 mg 程度

上清(テンプレート) \Rightarrow 50 µLPCR 反応液に 0.5~2 µL テンプレートとしてご利用ください。





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50 mM NaOH 18 µL、1M Tris-HCl (pH 8.0) 2 µL で実施してください。)

生体試料の例

精米 ⇒ 1粒

種子 ⇒ 1粒

生体試料の例

爪 ⇒ 5 mg 程度

精米 ⇒ 1粒

タバコ葉 ⇒ 3 mm 角程度

マウステール ⇒ 3 mm 程度

タバコ葉 ⇒ 3 mm 角程度

* ホモジナイズで抽出効率が向上することがあります。

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*

100 mM Tris-HCl (pH9.5)

↓ 1 M KCI

1

↓ 10 mM EDTA

↓ Vortex にて良く攪拌

↓ 95°C, 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) ⇒ 50 µLの PCR 反応液に 0.5~2 µL をテンプレートとしてご利用ください。

③ Proteinase 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°C, 60 min.以上インキュベート

↓ 95°C, 5 min.インキュベート

↓ (55°C, 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) ⇒ 50 µLの PCR 反応液に 0.5~2 µL をテンプレートとしてご利用ください。

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°C, 10 min.インキュベート(サーマルサイクラーを使用)

↓←1 M Tris-HCI (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) ⇒ 50 µLのPCR 反応液に 0.5~2 µLをテンプレートとしてご利用ください。

※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。

TOYOBO



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。
- ・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。

6. PCR 産物の精製について

- ・本製品で増幅した PCR 産物の精製には、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)」 などが利用可能です。細かな粒子のビーズを用いて精製を行う場合、ビーズの凝集(ビーズがチューブの壁面 に吸着するような現象)が見られることがありますが、精製自体は可能です。また精製前に以下のような処理 を行うことで、ビーズの凝集を抑えることが可能です。
 - (1) Proteinase K 処理 PCR 産物 50 µL に対し、10~20 mg/ mL Proteinase K を 1 µL 添加し、室温で 1min 以上放置する。
 - (2) Tween 20 処理 PCR 産物 50 µL に対し、10% Tween 20 を 1 µL 添加する。

7. 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。





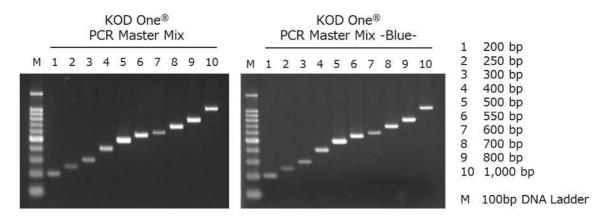
8. 性能データ

(1) 高速 PCR

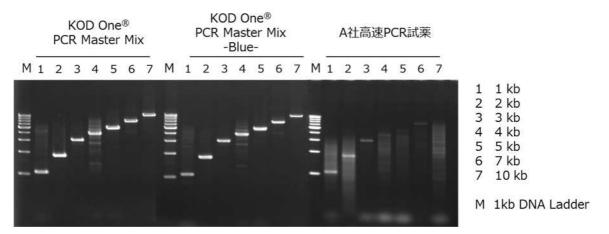
KOD One® PCR Master Mix、および KOD One® PCR Master Mix -Blue- を用いて、ヒトゲノム DNA をテンプレートに伸長時間の短い高速 PCR サイクルで増幅を実施しました。その結果、KOD One® PCR Master Mix、及び KOD One® PCR Master Mix -Blue-では 1 kb 以下のターゲットは伸長時間 1 sec.で、1~10 kb のターゲットは5 sec./kb で明確なバンドを確認することができました。

<反応液>		<pcr th="" サ<=""><th>イクル></th><th></th><th></th><th></th><th></th><th></th></pcr>	イクル>					
滅菌水	21 µL	1 kb 以T	のターゲッ	<i>i</i>	1~10 kk	のターゲ	ット	
KOD One® PCR Master Mix	25 µL	98°C	10 sec. ←	1	98°C	10 sec.	←	1
10 µM 各プライマー	1.5 µL	60°C	5 sec.	×30 cycles	60°C	5 sec.		×30 cycles
<u>10 ng/ μL ヒトゲノム DNA</u>	1 µL	68°C	1 sec. —]	68°C	5 sec./ k	b —	l
Total Volume	50 µL							

1kb 以下のターゲットの増幅



1~10 kb のターゲットの増幅

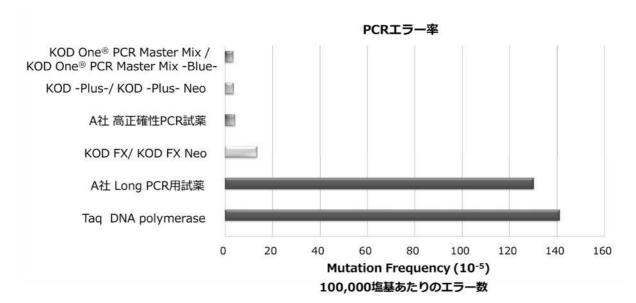






(2) 正確性

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 One® PCR Master Mix / KOD One® PCR Master Mix -Blue-の正確性は Taq DNA polymerase の約 80 倍優れた値が得られました。



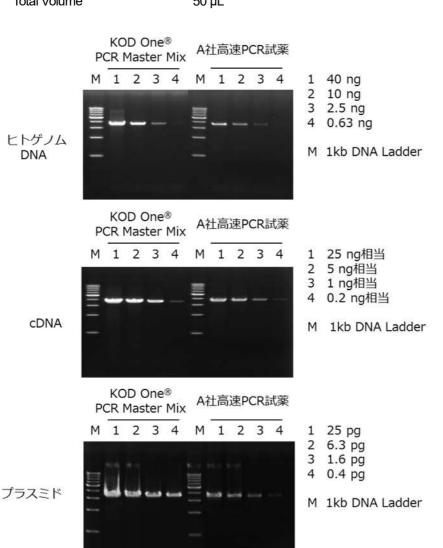




(3)検出感度

ヒトゲノム DNA、cDNA、プラスミドを用いて、約3.5kb 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。結果、KOD One® PCR Master Mix は 5 sec./kb でも増幅量が多く、他社試薬より、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>		<pcr サイクル=""></pcr>
滅菌水	21 µL	98°C 10 sec. ←
KOD One® PCR Master Mix	25 µL	98°C 10 sec. ← 60°C 5 sec. 68°C 18 sec. — ×30 cycles
10 µM 各プライマー	1.5 µL	68°C 18 sec. —
各テンプレート DNA	1 µL	
Total Volume	50 µL	





KOD One®



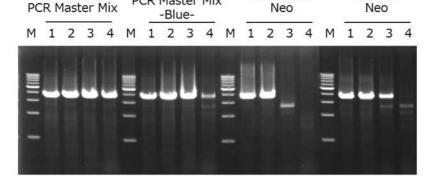
(4)逆転写反応液(cDNA)添加量

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。KOD One® PCR Master Mix は RNA による阻害を受けにくく、従来品や他社品より多くの 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。

KOD FX

<反応液>		<pcr サイクル=""></pcr>
滅菌水	17 µL	98°C 10 sec. ←
KOD One® PCR Master Mix	25 µL	60°C 5 sec. ×30 cycles
10 µM 各プライマー	1.5 µL	68°C 18 sec. —
各 cDNA	5 µL	
Total Volume	50 uL	

KOD -Plus-



KOD One®

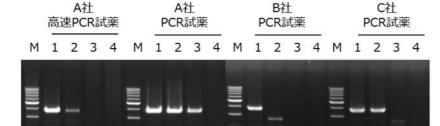
PCR Master Mix

1 125 ng (RNA相当量)

2 250 ng (RNA相当量) 3 500 ng (RNA相当量)

4 1000 ng (RNA相当量)

M 1kb DNA Ladder





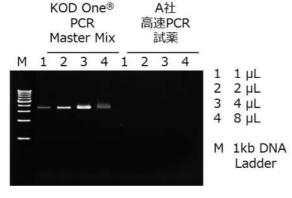


(5)クルードサンプルを用いた増幅

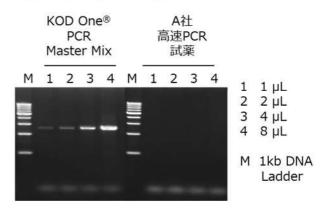
KOD One® PCR Master Mix を用いて、血液、マウスライセート(アルカリ溶解法)からの増幅を比較しました。反応はそれぞれの PCR 酵素の推奨条件に従って、5 sec./kb の伸長時間で実施しました。結果、KOD One® PCR Master Mix のみ明確なバンドを確認することができました。

<反応液>	<pcr サイクル=""></pcr>				
滅菌水	$22 - X \mu L$	98°C	10 sec.	←	1
KOD One® PCR Master Mix	25 µL		5 sec.		×30 cycles
10 µM 各プライマー	1.5 µL	68°C	5 sec./ k	b —]
各サンプル	ΧμL				
Total Volume	50 µL				

血液からの増幅



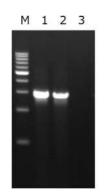
マウスライセートからの増幅



(6)イノシンを含むプライマーからの増幅

イノシンを含む縮重プライマーを用いて、KOD One® PCR Master Mix と KOD -Plus- Neo(従来品)で増幅を比較しました。結果、KOD One® PCR Master Mix でのみ明確なバンドを確認することができました。KOD One® PCR Master Mix を用いれば、従来の高正確性 PCR 酵素では使用できないイノシンを含む縮重プライマーから、正確に遺伝子を増幅することができます。

<反応液>		<pcr サイクル=""></pcr>
滅菌水	21 µL	98°C 10 sec. ←
KOD One® PCR Master Mix	25 µL	60°C 5 sec. ×30 cycles
100 µM 各プライマー	1.5 µL	68°C 15 sec. —
50 ng/ μL <i>E.coli</i> ゲノム DNA	1 μL	<primer 配列=""></primer>
Total Volume	50 µL	ALTITUEL HEADY
Total Volume	50 μL	Fwd: ATGGTICARATHCCICARAAY
		Rev: RTGIGCYTGRTCCCARTTYTC



- 1 KOD One® PCR Master Mix
- 2 KOD One® PCR Master Mix -Blue-
- 3 KOD -Plus- Neo
- M 1kb DNA Ladder
 - * 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 種類当たりのモル 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。





9. 実施例

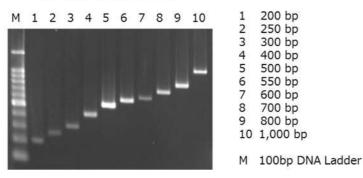
(1) dUTPを用いたキャリーオーバー対策への応用例

PCR は非常に感度が高い検出法であるため、検査用途など同じ PCR 反応を繰り返し行う場合、以前に行った PCR 増幅産物がキャリーオーバーし、偽陽性を生じさせることがあります。このようなキャリーオーバーを防ぐ対策として、PCR の基質に dUTP を用い、次の PCR を行う際に Uracil-N-Glycosylase (UNG)を作用させ、キャリーオーバーした増幅産物を分解する手法が有効です。

KOD One® PCR Master Mix はイノシンやウラシルの影響を受けないよう改変を施した KOD DNA polymerase (UKOD) を用いており、反応液に dUTP を添加することで、上記キャリーオーバー対策に応用できます。以下に KOD One® PCR Master Mix の dUTP の添加例を紹介します。

<反応液>		<pcr サイクル=""></pcr>
滅菌水	16µL	98°C 10 sec. ←
KOD One® PCR Master Mix	25µL	98°C 10 sec. ← 60°C 5 sec. ← 68°C 1 sec. ← 30 cycles
2 mM dUTP	5µL	68°C 1 sec. —
10 µM 各プライマー	1.5µL	
10 ng/ μL ヒトゲノム DNA	1µL	
Total Volume	50 μL	

dUTP添加(終濃度0.2 mM)



検討の結果、KOD One® PCR Master Mix を用いることで、dUTP が含まれる条件でも伸長時間 1 sec.の設定で 1 kb 以下のターゲット (200 ~ 1,000 bp) を均一に増幅できることが分かりました。KOD One® PCR Master Mix の組成は UNG の反応を阻害しないため、dUTP / UNG を用いたキャリーオーバー対策に使用できます。食品や環境検査など、繰り返し同じ PCR を行う際に非常に有用です。





次世代シークエンサー(NGS)のライブラリー増幅例 (2)

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、様々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、シークエンス後のデータを比較しました。シークエンスには Illumina MiSeq を使用しました。

<反応液>	
滅菌水	14 µL
KOD One® PCR Master Mix	25 µL
10 µM 各プライマー	5 µL
1 ng/ µL NGS ライブラリー	1 µL
Total Volume	50 µL

<PCR サイクル> 98°C 10 sec. ◀ 60°C 5 sec. ×14 cycles 68°C 1 sec.

<Primer 配列 (TruSeq 用プライマー)> Fwd: AATGATACGGCGACCACCGAGATC Rev: CAAGCAGAAGACGGCATACGAG

GC バイアス比較

Coverage 比較 KOD One® PCR Master Mix B社 PCR試薬 105 All Reads Level: All Reads GC Bias Plot All Reads Level: All Reads GC Bias Plot 100 Normalized Coverage Windows at GC% Base Quality at GC% 0 Normalized Coverage covered Windows at GC% Base Quality at GC% genome 1.5 30 ò 9 0 entage Mean 85 0.5 5. 0 9 Per 80 0.0 1X 3X 6X 1X 3X 6X 60 60 KOD One® B社 PCR試薬 PCR Master Mix

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 (左図: O) 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、バイアスが少な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 一だけでなく、Long リードのライブラリー増幅にも応用が期待できます。

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 μg	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





(3) プラスミドへの変異導入例

相補的なプライマーを用いる変異導入法を用いて、約5kb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。

プライマー設計例 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 欠損例 ATGを除去 挿入例 ATGの前にAAA 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'- TGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCAT-3' 置換用Fwd Primer 12~20bp 12~20bp 5'- TGCATGCATGCATGCCATGCATGCATGCAT-3' 欠損用Fwd Primer 12~20bp 12~20bp 5'- TGCATGCATGCATGCATGCATGCATG-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'- TGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCAT-3' 3'- ACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTA-5' 置換用Rev Primer 5'- TGCATGCATGCATGCCATGCATGCATGCAT-3' 3'- ACGTACGTACGTACGTACGTACGTACGTA-5' 欠損用Rev Primer 5'- TGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATG-3' 挿入用Rev Primer 3'- ACGTACGTACGTACGTACGTACGTAC-5'

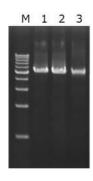
<反応液>	<変異導入サイクル>		
滅菌水	21 µL	98°C 10 sec. ←	
KOD One® PCR Master Mix	25 µL	98°C 10 sec. ← 60°C 5 sec. ×15 cycles 68°C 25 sec. —	
10 µM 各プライマー	1.5 µL	68°C 25 sec. —	
50 ng/ μL プラスミド	1 µL		
Total Volume	50 µL		

上記反応液に *Dpn* I (10 U/ µL Code No. DPN-101) 2 µL 加 37°C1 時間反応 JM109 などのコンピテントセルを上記 *Dpn* I 反応液で形質転換





変異導入サイクル後の電気泳動確認



- 1 3塩基置換
- 2 3塩基欠損3 3塩基挿入

M 1kb DNA Ladder

各8クローンの変異導入率及び、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 (100%)	O個	
3塩基欠損	8/ 8クローン (100%)	O個	
3塩基挿入	7/ 8クローン (87.5%)	O個	

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(2 nd- 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。

※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=241





10. トラブルシューティング

問題	対策	具体例·目安
		伸長時間を 10~30 sec./kb に延長する。
		サイクル数を 2~5 サイクル増やす。
	サイクル条件を変更する。	3 ステップサイクルでアニーリング温度を
		Tm-7~Tm-10°Cに下げる。
	使用しているテンプレートの量、 品質を確認する。	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。
増幅産物が見られない。		テンプレートを精製する。
増幅産物が少ない。	<u>'</u>	RNA を分解もしくは除去する。
		プライマー濃度を 0.3 µM から 0.15 µM(終濃
		度)に下げる(特に 10 kb 以上の長鎖ターゲ
		ットで有効な場合がある)。
	使用しているプライマーの量、	プライマー濃度を 0.3 µM から 0.5 µM や 1.0
	品質を確認する。	μM(終濃度)に上げる(特に低コピーから
		の検出で有効な場合がある)。
		プライマーを再調製、再合成する。
		プライマーを再設計する。
		3ステップサイクルで行っている場合、アニー
	サイクル条件を変更する。	リング温度を上げる。もしくは 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、伸長温
		度を 72℃にする。もしくはステップダウンの
スメア、エキストラバンドが 見られる。		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。
		プライマーを再調製、再合成する。
	使用しているプライマーの品質 を確認する。	プライマーを再設計する(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)。
TA クローニングが できない。		専用 TA クローニングキット「TArget Clone™
		-Plus- (Code No. TAK-201)」を用いる。
	専用のキットを用いる。	(KOD One® PCR Master Mix /
		KOD One® PCR Master Mix -Blue-の増幅産
		物の末端は平滑化されています。)





11. 関連商品

品 名	包装	Code No.	
<高正確・高効率・高速 PCR 酵素> KOD -Plus- Neo	200 U×1本	KOD-401	
	(200 U×1本)×5	KOD-401X5	
	(200 U×1 本)×10	KOD-401X10	
<高効率・高成功率 PCR 酵素> KOD FX Neo	200 U×1本	KFX-201	
	(200 U×1本)×5	KFX-201X5	
	(200 U×1 本)×10	KFX-201X10	
<マルチプレックス PCR・バイサルファイト処理 DNA 用高正確性 PCR 酵素 > KOD -Multi & Epi-®	200 U×1本	KME-101	
	(200 U×1本)×5	KME-101X5	
	(200 U×1 本)×10	KME-101X10	
<kod dna="" polymerase="" ta="" クローニングキット="" 用高効率=""></kod>	40 🗆 🖽	TAK-201	
TArget Clone™ -Plus-	10 回用 		
<ta a="" クローニング用="" 付加試薬(kod="" 用)=""></ta>	25 µL1 本	TAIC 204	
10 × A-attachment Mix	(25 回用) TAK-301		
<高効率ライゲーションキット>	750 µL1 本	I CK 204	
Ligation high Ver.2	(100 回用)	LGK-201	
<磁性ビーズを利用した DNA fragment 精製キット>	200 🖂 🖽	NPK-601	
MagExtractor® -PCR & Gel Clean up-	200 回用		
<制限酵素(変異導入時のプラスミド除去)>	1,000U×1本	DPN-101	
Dpn I	(1,000U×1本)×5	DPN-101X5	

【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