

高効率・高成功率 PCR Master Mix

KOD FLEX™ PCR Master Mix

KOD FLEX™ PCR Master Mix は、高効率・高成功率の PCR 用 2× マスターミックスです。改変型 KOD DNA polymerase(UKOD)、及び伸長アクセラレーター、独自の Buffer システムを応用し、増幅しにくいターゲットを高効率かつ低バイアスに増幅することが可能です。

増幅しにくい、高 GC/AT ターゲットや Long ターゲット、特異的に増幅しにくいターゲットでも効率的な増幅が可能です。生体サンプルなどクールドなサンプルからでも増幅が可能です。

Taq DNA polymerase の約 11 倍の正確性を示すため、得られた増幅産物はクローニングを介した従来のシーケンス解析にも用いることができるとともに、配列や増幅サイズなどによる 増幅バイアスを受けにくいという特長があり、次世代シーケンスにおけるライブラリー増幅に適しています。

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

● 高成功率・伸長性

独自の Buffer 組成を採用し、高い特異性を示します。また伸長アクセラレーターを添加したことで PCR 効率が向上し、伸長時間を最短で 15 sec./kb まで短縮することが可能です。※クールドサンプルを用いる場合や長鎖の PCR を行う場合は、効率を優先するため 30~60 sec./ kb を推奨する場合があります

● クールドサンプルに対応

PCR 阻害物質を含むクールドなサンプル（生体試料、土壌、食品など）からの増幅に優れ、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。

● 均一な増幅（低バイアス）

GC の偏りによる増幅への影響を最小限に抑えており、ターゲットに依存することなく、均一な増幅が可能です。低バイアスかつ、高伸長性であることから、short リードだけでなく、long リードの次世代シーケンサー向けライブラリー増幅に適しています。

● 高正確性

Taq DNA polymerase の約 11 倍の正確性（KOD FX Neo と同等）を示すため、長いターゲットでも正確に増幅することができます。増幅産物は次世代シーケンス解析をはじめ、クローニングなどさまざまな用途に用いることができます。

● ウラシル・イノシンを含む DNA・プライマー からの増幅

従来の高正確性 PCR 酵素では、ウラシルやイノシンを含む鋳型やプライマーを用いることが困難でしたが、KOD FLEX™ PCR Master Mix はウラシルやイノシンを含む DNA ・プライマーでも高い効率で増幅を行うことができます。パイサルファイト後の PCR や縮重プライマーの使用が可能です。

1. 内容物

品名	KMx-101*
KOD FLEX™ PCR Master Mix	1 mL × 5 本

*50 μ L で反応を行った場合、200 回用としてご使用になれます。

2. 安全上の注意

本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬、食品、化粧品として決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守するとともに SDS を参照し、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 FLEX™ PCR Master Mix は、各ロットにおいて、100bp ラダーをテンプレートとして、遺伝子増幅ができることを確認して出荷しております。

4. プライマーの準備

- ・プライマーは可能な限り、22~35mer 程度 (T_m 値^{*1} > 60°C) 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、スミア、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 が偏りすぎるとスミア、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 T_m 値が 65°C 以上のプライマーをご使用ください。25mer 以上 (T_m 値 $\geq$ 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使用することができます。

*1 プライマーの T_m 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 T_m 値は、Na⁺ 濃度を 50 mM、プライマー濃度を 0.5 μ M 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 T_m 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 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 T_m 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 T_m 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 T_m 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。

5. テンプレートについて

以下のようなテンプレートを使用することができます。一般的なテンプレート量は表を参照してください (PCR反応液50 μ L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)
クールドサンプル (血液、各種ライセート等)			下記参照

・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、事前に電気泳動解析を行い、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50 μ Lに対する逆転写反応液の添加量は、RNA量として200 ng以下でお試ください。

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 μ L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	安定した増幅が得られない場合は、50 μ LのTEに懸濁し、2~5 μ L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。
酵母	チップに付いた少量	
糸状菌	チップに付いた少量	
培養細胞	$10^1 \sim 10^5$ cells	抽出されるDNAが微量なため、 $\times 35 \sim 40$ サイクルでの増幅が必要です。
血液	1~2 μ L	
爪	米粒1/3程度	
髪	1~2 cm	
植物葉	2 mm角	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。*
精米	米粒1/5程度	
マウステール	1 mm程度	

*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 μ Lに対し、20 mg/mL Proteinase K 10 μ Lを添加してから泳動することをお勧めします。

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 μ L
- ↓ 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 μ L
- ↓ 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 μ L を PCR 反応液 50 μ L 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 μ L、1M Tris-HCl (pH 8.0) 2 μ L 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 μ L
- ↓ 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 μ L を PCR 反応液 50 μ L に添加

生体試料の例

タバコ葉 ⇒ 3 mm 角程度

精米 ⇒ 1 粒

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 μ L

↓ 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)

↓ 5 mM EDTA

↓ 400 mM NaCl

↓ 0.3% SDS

↓ 200 μ g/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） ⇒ 0.5~2 μ L を PCR 反応液 50 μ L 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 μ L を加え、蓋をして Vortex にて良く攪拌する

↓ スピンドアウン（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-HCl (pH 8.0) 20 μ L を加え、蓋をして Vortex にて良く攪拌する

↓ スピンドアウン（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 μ L を PCR 反応液 50 μ L 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。

6. PCR プロトコール

a. 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 μ L	
KOD FLEX™ PCR Master Mix(2×)	25 μ L	1×
Primer	Y μ L	0.3 μ M each
テンプレート	Z μ L	Genomic DNA ~200 ng/50 μL Plasmid DNA ~50 ng/50 μL cDNA ~200 ng/50 μL 生体試料・粗抽出液 ~5 μL/50 μL
Total	50 μ L	

・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。

・非特異増幅あるいはスメアが生じる場合、プライマー濃度を0.1 μ M（終濃度）まで段階的に減らして検討してください。

・長鎖のターゲットを増幅する場合は、プライマー濃度を0.1 μ M（終濃度）などに下げること、増幅量が向上することがあります。

b. PCR サイクル条件

PCR のサイクル条件は、プライマーの Tm 値によって異なります。プライマーの Tm 値が 65°C 以下の場合、3 ステップサイクルをお試しください。プライマーの Tm 値が 65°C を超える場合、2 ステップサイクルをお試しください。

3 ステップサイクル [プライマーの Tm 値が 65°C 以下の場合]

Predenature :	94°C, 2 min.	
Denature :	98°C, 10 sec.	
Annealing :	Tm°C* ¹ , 10 sec.	30 cycles* ²
Extension :	68°C, 時間は表1を参照	

2 ステップサイクル [プライマーの Tm 値が 65°C を超える場合]

Predenature :	94°C, 2 min.	
Denature :	98°C, 10 sec.	
Extension :	68°C, 時間は表1を参照	30 cycles* ²

表1 伸長時間の目安

	精製DNA (Genomic DNA・Plasmid DNA・cDNA)		クールドサンプル (生体試料・粗抽出液)
	GCクラスター* ¹ を含まない ターゲット	GCクラスター* ² を含む ターゲット	
Extension	15 sec./ kb* ⁴	30 sec./ kb	60 sec./ kb

*¹ GCクラスターはGC含量70%以上の領域が400 bp以上ある領域を意味します。

*² 2ステップサイクルではプライマーのアニーリングを十分に行うために、ターゲット鎖長にかかわらず

<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/>

伸長時間を30 sec.以上に設定してください。

また、縮重プライマーを用いる場合は、アニーリングを十分に行うためにアニーリング時間を30 sec.に設定した方が良好な結果が得られることがあります。

オプション(一般)

- ・ 非特異増幅あるいはスメアが認められた場合は、Tm値が65℃以下でも2ステップをお試しください。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種類あたりのモル数が少なくなります。縮重度の割合に合わせて濃度を最大3.0 μM (終濃度) まで上げることにより感度を向上させることができます。
- ・ 増幅が弱い場合はTm~Tm-5℃までの間で検討してください。
- ・ 通常は30 cyclesで十分な増幅が得られます。増幅量が少ない場合は40 cyclesまで増やすことができます。
- ・ 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。

(例) Tm値とターゲット鎖長を考慮したサイクル条件設定の仕方

プライマーTm値 ≤ 65℃: 3ステップサイクル

ターゲット鎖長: 500 bp

94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ← 30 cycles
60℃, 10 sec.
68℃, 8 sec.
4℃, hold

ターゲット鎖長: 1 kb

94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ← 30 cycles
60℃, 10 sec.
68℃, 15 sec.
4℃, hold

ターゲット鎖長: 5 kb

94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ← 30 cycles
60℃, 10 sec.
68℃, 75 sec.
4℃, hold

プライマーTm値 > 65℃: 2ステップサイクル

ターゲット鎖長: 500 bp

94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ← 30 cycles
68℃, 30 sec.
4℃, hold

ターゲット鎖長: 1 kb

94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ← 30 cycles
68℃, 30 sec.
4℃, hold

ターゲット鎖長: 5 kb

94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ← 30 cycles
68℃, 75 sec.
4℃, hold

オプション(マルチプレックス)

- ・他のターゲットと比較し増幅効率の低いターゲットに対してプライマー濃度を高めることで均一性が改善されることがあります。また、増幅効率の高いターゲットに対してプライマー濃度を下げることで均一性が改善されることがあります。
- ・市販のマルチターゲット用プライマーセットを用いる場合は取扱説明書に従ってください。
- ・増幅が確認できないターゲットがある場合は、基準とした $T_m \sim T_m - 5^\circ\text{C}$ の範囲で検討してください。
- ・マルチプレックスPCRの伸長時間は表2を参考に設定してください。

表2 伸長時間の目安

ターゲット数	短鎖ターゲット($\leq 1\text{ kb}$)		長鎖ターゲット($1\text{ kb} \sim 10\text{ kb}$)	
	10未満	10以上	10未満	10以上
Extension 3ステップサイクル	15~30 sec.	30~60 sec.	30 sec./ kb 最も長いターゲットを 基準	30~60 sec./ kb 最も長いターゲットを 基準
Extension 2ステップサイクル	30 sec.	30~60 sec.	30 sec./ kb 最も長いターゲットを 基準	30~60 sec./ kb 最も長いターゲットを 基準

- ・クールドサンプルから増幅する場合、すべての場合において60 sec./ kbで設定してください。
- ・クールドサンプルから増幅する場合、ターゲット数が増えると効率が落ちることがあります。その場合、精製したDNAをご使用ください。

7. 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 50 μL 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。

8. PCR 産物の次世代シーケンサー (NGS) への対応について

- ・PCR 産物を次世代シーケンサー (NGS) に使用する際はライブラリー調製キットの取扱説明書に従って精製などを行い、テンプレートの調製を行ってください。

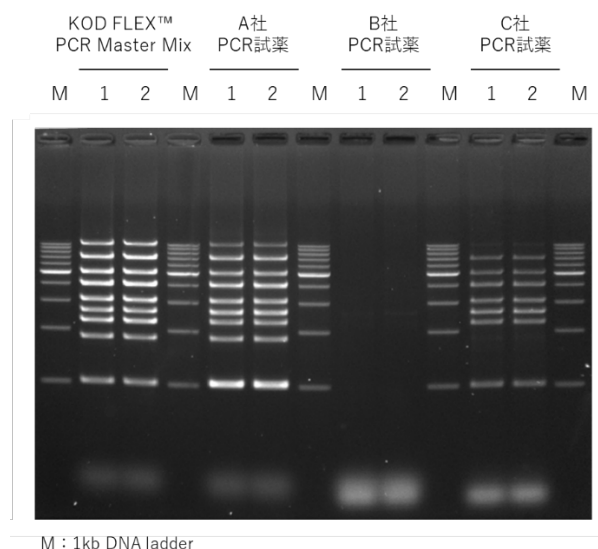
9. PCR 産物のクローニングについて

- 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。

10. 実施例について

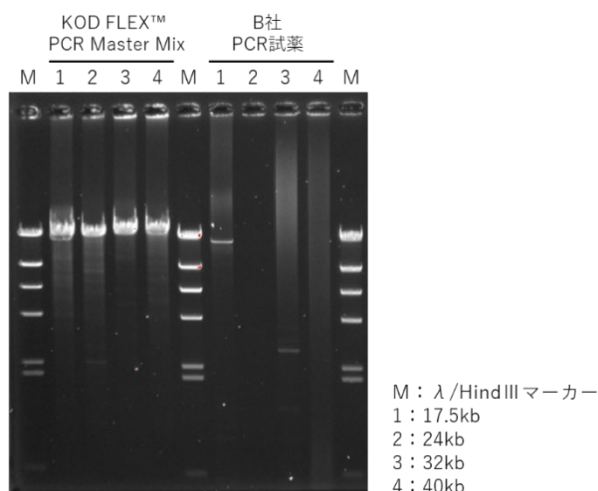
(1) 高成功率・低バイアス

複数ターゲット(Chrome9 (1.0kb), MSH6 (1.8kb), BRCA2 (2.3kb), WT-1 (2.5kb), FANCE (3.0kb), RAD51D (4.0kb), KRAS (5.0kb), BRCA1 (7.0kb), DDB2 (10.0kb))をさまざまな増幅試薬でマルチプレックス PCR を行い、性能を比較しました(50 μ L 反応系、N=2)。その結果、KOD FLEX™ PCR Master Mix を用いた場合に、バイアスが少なく良好な増幅を行うことができました。



(2) 伸長性

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。その結果、KOD FLEX™ PCR Master Mix では 40 kb まで増幅を確認することができました。



11. トラブルシューティング

問題	対策	具体例・目安
増幅が見られない。 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。
		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。 アニーリング温度を下げて Tm から Tm-5°C の間で検討する。
		縮重プライマーを使用している場合、アニーリング時間を 10 sec. から 30 sec. に伸ばす。
	使用しているテンプレートの量、品質を確認する（特に、テンプレートに過剰の RNA 等がコンタミしていないか確認する）。	テンプレートの量を増やす。
		テンプレートの調製法を検討する。
		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 0.3 μM から 0.1 μM（終濃度）まで段階的に減らして検討する（特に 10 kb 以上の長鎖ターゲットで有効な場合がある）。
		縮重プライマーを使用している場合はプライマー濃度を上げる。[p4 オプション参照]
		プライマーを再調製、再合成する。
	プライマー配列を変更する。	プライマーを再設計する。[3. (1) 参照]

<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/>

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。 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量、品質を確認する。	プライマーを再調製、再合成する。 プライマー濃度を $0.1\mu\text{M}$ (終濃度) まで段階的に減らして検討する。
	プライマー配列を変更する。	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)。[p2 参照]
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 (本製品 の増幅産物の末端は平滑化されている)。

12. 関連商品

品 名	包装	Code.No.
<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	25 μL × 1 本 (25 回用)	TAK-301
<高効率ライゲーションキット> Ligation high Ver.2	750 μL × 1 本 (100 回用)	LGK-201

【製造・販売元】

—価格・在庫に関するお問い合わせ—

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