

Code No. KOD-101
 Code No. KOD-101X5
 保存温度 -20℃

高正確性PCR酵素

KOD DNA Polymerase

KOD DNA Polymerase は、鹿児島県小宝島の硫気孔より単離された超好熱始原菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 株由来の高正確性 PCR 用酵素で、以下の特長があります。

- ・強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性（Proof-reading 活性）を有しており、Taq DNA Polymerase の約 50 倍の正確性を示します。
- ・伸長反応 1kb/30 秒で、Taq DNA Polymerase の約 2 倍、Pfu DNA Polymerase の約 6 倍の合成速度を示し、高速 PCR に用いることができます。
- ・Taq DNA Polymerase よりも耐熱性に優れ、100℃、1 時間の熱処理後も約 70%の活性を維持しています。そのため熱変性ステップの温度を高く設定でき、GC-rich な鋳型など特異的高次構造をとるようなターゲットに有利です。
- ・KOD DNA Polymerase は強い Proof-reading 活性を有するため、増幅産物の末端は平滑末端(blunt end)になります。専用の TA クローニングキット『TArget Clone™ -Plus』を用いることにより、TA クローニングを行なうことが可能です。
- ・さらに、KOD DNA Polymerase の強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を利用して、DNA 末端の平滑化処理にもご使用になれます。

1. 内容物

KOD DNA Polymerase は容量別に次の 2 種類をご用意しております。

| | KOD-101 (250U × 1 本) | KOD-101X5 |
|-------------------------------|-------------------------|---------------|
| KOD DNA Polymerase (2.5 U/μL) | 100 μL × 1 本 | (KOD-101) × 5 |
| 10x Buffer #1 | 1mL × 1 本 | |
| 10x Buffer #2 | 1mL × 1 本 | |
| 25mM MgCl ₂ | 1mL × 1 本 | |
| 2mM dNTPs | 1mL × 1 本 | |

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遵守し、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. PCR プロトコール

(1) 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からご使用ください。凍結している試薬は完全に融解してください。

| Components | Volume | Final Concentration |
|------------------------------------|------------------|---|
| 10xBuffer #1 または #2 (通常は#1) | 5 μ L | 1x |
| 2mM dNTPs | 5 μ L | 0.2mM each |
| 25mM MgCl ₂ | 2 μ L | 1.0mM |
| プライマー(10 μ M each) | 1.0~2.5 μ L | 0.2~0.5 μ M each |
| テンプレート DNA | \geq 1 μ L | Genomic DNA 100~1000 ng/50 μ L Plasmid DNA 10~50 ng/50 μ L cDNA 4. ⑧ の項参照 |
| KOD DNA Polymerase (2.5U/ μ L) | 1 μ L | 2.5 U/50 μ L |
| Autoclaved, distilled water | to 50 μ L | |

全ての液を添加した後、反応液をボルテックスなどで十分攪拌してからサーマルサイクラーにセットしてください。

(2) PCR サイクル条件

| | 3ステップ | 2ステップ |
|---------|----------------------------|-----------------|
| 変性: | 94°C, 15sec. | 94°C, 15sec. |
| アニーリング: | T _m -2°C, 2sec. | 68°C, 30sec./kb |
| 伸長: | 74°C, 30sec./kb | 30 cycles |

} 25 cycles

伸長の時間は、ターゲット鎖長1kb あたり 30sec. で設定します。

4. PCR 実験をうまく行うために

- ① 通常は Buffer#1 をご使用ください。4 kb 以上のターゲットや、#1 でスメアーになる場合は#2 をご使用ください。
- ② Cycling 条件は 3 ステップを基本とし、エキストラバンドが多いときやターゲットが増幅できないときはアニーリング温度を、T_m~T_m-10°Cの範囲で調整してください。またプライマーの T_m が 70°C以上の場合は、2 ステップをお試しください。
- ③ genomic PCR の場合は dNTPs の濃度を 0.3 mM にすることによりスメアーが抑えられることがあります。その場合、プライマーは 50 pmol (最終濃度 1 μ M) 使用してください。
- ④ 伸長反応時間が必要以上に長くなると電気泳動解析で増幅産物がスメアー状になることがあります。その場合、反応時間を短くしてご使用ください。2 kb 以下のターゲットでは通常上記の伸長時間で十分となっています。
- ⑤ スメアーが見られるときには酵素量を減らすことによってバックグラウンドが減少することがあります。その場合、酵素量を 2.5 U、1.3 U、0.6 U、0.3 U / 50 μ L のように減らしてご使用ください。
- ⑥ Long Distance PCR 用ではございません。高い Fidelity を要求する実験にご使用ください。
- ⑦ 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。PCR 産物をクローニングする場合には、blunt end を利用したクローニングを行ってください。また、弊社 KOD シリーズ用 TA クローニングキット TArget Clone™-Plus- (関連商品 参照) を用いることにより、簡便に TA クローニングができます。
- ⑧ 逆転写反応液をテンプレート DNA 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 に添加する逆転写反応液量は、RNA 量として 100ng 以下にすることをお勧めします。Total RNA 1 μ g を用いて 20 μ L の容量で逆転写反応を行った場合、PCR 反応への添加量は 2 μ L 以下になります。また、植物ゲノム DNA など、抽出方法によっては、多量の RNA が混入する可能性があります。RNA の混入を抑えるために、DNA サンプルの液量を少なくすることや DNA サンプルを RNase 処理することをお勧めいたします。

< 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/>

5. DNA 末端平滑化プロトコール

(1) 平滑化反応液の調製

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

| Components | Volume | Final Concentration |
|------------------------------------|---------------|---------------------|
| Sample DNA | X μ L | |
| 10x Buffer #1 | 1 μ L | 1x |
| 2mM dNTPs | 1 μ L | 0.2mM each |
| 25mM MgCl ₂ | 0.6 μ L | 1.5mM |
| KOD DNA Polymerase (2.5U/ μ L) | 1 μ L | 2.5 U/10 μ L |
| Autoclaved, distilled water | to 10 μ L | |

全ての液を添加した後、反応液をボルテックスなどで十分攪拌してからサーマルサイクラーにセットしてください。

- (2) 72°C、2min. インキュベートします。
- (3) 氷中で冷却します。
- (4) 反応液を そのまま Ligation 反応に使えます。

(Ligation 反応の例)

| Components | Volume |
|---------------------------------|--------------|
| 平滑化した Sample DNA | Y μ L |
| TE バッファー | 10-Y μ L |
| Ligation high (Code No.LGK-101) | 10 μ L |

16°C、1hr インキュベートします。

6. 平滑化処理をうまく行うために

- ① エタノール沈殿などで、TEバッファーに置換したDNAの使用を標準的な操作としていますが、次の方法でも可能です。
 - ・制限酵素処理したDNAの場合：H, M, L, TAバッファーを用いた反応液であれば、反応液をそのままDNA溶液として用い、上の反応組成で平滑化処理できます。
 - ・TaqでPCRした産物の場合：PCR後の反応液を一部取り、KODを添加し、72°C、2min. 処理します。このとき、KODは、Taqと同じUnit数を加えます。10x Buffer#1、25mM MgCl₂、2mM dNTPsの添加は必要ありません。dNTPsは、反応時の濃度で0.2mMが至適ですので、不足している場合は追加します。
- ② DNA末端10pmolesを処理できます。直鎖状pUC18 DNA 2.7kbであれば、約10 μ gに相当します。DNA溶液は、最高6.4 μ Lまで処理できます。
- ③ 反応液を調製するとき、KODを最後に加えてください。dNTPsが共存しない環境下ではKODの3'→5' exonucleaseが強く作用し、過剰にDNAを削ることがあります。
- ④ 72°C、2min. で十分な平滑化反応が行われます。また、標準の反応条件であれば、30min. まで時間を延長しても効率は変わりません。

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。

7. 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 | MgCl ₂ 濃度を上げる。 | 標準 1.0mM を 1.2mM に上げる。 プラスミドの場合は 1.5~2.0mM に上げる。 |
| | アニーリング温度を下げる。 | Tm-10°Cまで下げる。 |
| | サイクル数を増やす。 | +2~5 サイクル増やす。 |
| | 使用しているテンプレート DNA, プライマーの品質を確認する。 | テンプレートDNAにRNA等がコンタミしていないか確認する。 |
| | サンプル中に大量の RNA 成分が混在している。 | サンプルを希釈して使用する。 RNA を分解もしくは除去する。 |
| 非特異的増幅産物が見られる | アニーリング温度を上げる。 | プライマーの (Tm-2~Tm)°C に上げる。 |
| | MgCl ₂ 濃度を下げる。 | 標準 1.0mM を 0.8mM に下げる。 |
| | 新しいプライマーセットを設計する。 | |
| バックグラウンドにスミア、エキストラバンドが見られる | サイクル数を減らす。 | 2~5 サイクル程度減らす。 |
| | テンプレート DNA の量を確認する。 | テンプレートの量を減らす。 |
| | MgCl ₂ 濃度を下げる。 | 標準 1.0mM を 0.8mM に下げる。 |
| | 使用酵素量を下げる。 | 標準 2.5U を 1.25~2.0U に下げる。 |
| TA クローニングができない | 専用のキットを用いる。 | TArget Clone™ -Plus-を用いる。 |

8. 実施例

弊社のウェブページで実施例をご覧になれます。

https://lifescience.toyobo.co.jp/detail/detail.php?product_detail_id=166

9. 参考文献

- (1) Imanaka T. et al., *Appl Environ. Microbiol.*, **63**: 4504-4510 (1997)
- (2) Thomas A. Kunkel. *J. Biol. Chem.*, **260**: 5787-5796 (1985)
- (3) Imanaka T. et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, **125**: 983-986 (1999)
- (4) Imanaka T. et al., *J. Mol. Biol.*, **306**: 469-477 (2001)
- (5) Ohki Y. et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, **132**: 713-718 (2002)
- (6) Okuno K.. et al., *Biotchnol. Appi. Biochem.*, **36**: 77-84 (2002)
- (7) Karaya K.. et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, **129**: 769-775 (2001)

10. 関連商品

| 品名 | 包装 | Code.No. |
|--|--|------------------------------------|
| <M-MLV 変型逆転写酵素> ReverTra Ace [®] (100 U/ μ L) | 10,000 U \times 1 本 (10,000 U \times 1 本) \times 5 (10,000 U \times 1 本) \times 10 | TRT-101 TRT-101X5 TRT-101X10 |
| <高正確性 PCR 酵素> KOD -Plus- | 200 U \times 1 本 (200 U \times 1 本) \times 5 (200 U \times 1 本) \times 10 | KOD-201 KOD-201X5 KOD-201X10 |
| <信頼性を向上させた高正確性 PCR 酵素> KOD -Plus- Ver.2 | 200 U \times 1 本 (200 U \times 1 本) \times 5 | KOD-211 KOD-211X5 |
| <高正確・高効率・高速 PCR 酵素> KOD -Plus- Neo | 200 U \times 1 本 (200 U \times 1 本) \times 5 (200 U \times 1 本) \times 10 | KOD-401 KOD-401X5 KOD-401X10 |
| < KOD シリーズ用高効率 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> 10 \times A-attachment Mix | 25 μ L (25 回用) | TAK-301 |
| 高効率ライゲーション試薬 Ligation high | 375 μ L \times 2 本 | LGK-101 |
| 25mM MgCl ₂ | 1 mL \times 1 本 | TAP-2S |
| dNTPs Mixture (2mM) | 1 mL \times 1 本 | NTP-201 |

<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】

—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