

Code No. LDP-101
 Code No. LDP-101X5
 Code No. LDP-101X10
 保存温度 -20°C

高効率PCR酵素

KOD Dash

proof-reading 活性 (3'→5'エキソヌクレアーゼ活性) を有さない Taq DNA polymerase などの pol I 型ポリメラーゼに proof reading 活性を有する α 型ポリメラーゼを微量混合することによって、Long PCR などの性能が飛躍的に向上することが分かっています。(Barnes らの方法⁴⁾)

本製品は、proof-reading 活性を欠失させた KOD DNA polymerase をベースに、微量の KOD DNA polymerase が混合された混合型 PCR 用酵素です。この技術を用いることで、格段に PCR のパフォーマンスを向上させることができ、長いターゲット遺伝子などの増幅効率も格段に向上させることが可能です。また、本製品は、KOD DNA polymerase が有するポリメラーゼの優れた伸長性を生かしつつ汎用的に様々な PCR に用いることが可能です。

他の混合型 PCR 用 DNA polymerase が、Taq DNA polymerase と超好熱始原菌由来の DNA polymerase という至適条件が全く違う 2 種の酵素系なのに対し、KOD Dash は KOD DNA polymerase の単一酵素系で構成されることから、至適条件、保存安定性、熱安定性が同一であり、安定した性能を発揮することができるという利点があります。

- ・ **優れた DNA 増幅効率：** 微量の鋳型からも効率よく PCR ができるため、一般的な PCR の他コロニーダイレクト PCR やウイルス／細菌の検出などに適しています。
- ・ **速い DNA 合成速度：** Taq DNA polymerase の 2 倍、Pfu DNA polymerase の約 6 倍の合成速度を持つため、PCR の時間を短く設定することができます。
- ・ **優れた伸長性：** 本酵素は Barnes らの方法⁴⁾をベースに作られた酵素であり、PCR における伸長性が向上しています。

1. 内容物

KOD Dash は容量別に次の 3 種類をご用意しております。

	LDP-101 (250U × 1 本)	LDP-101X5	LDP-101X10
KOD Dash (2.5U/μL)	100 μL × 1 本	(LDP-101) × 5	(LDP-101) × 10
10 × Buffer	1200 μL × 1 本		
2mM dNTPs	1000 μL × 1 本		

(注) PCR 反応時の Mg^{2+} 最終濃度は 1.2mM となります。

2. 安全上の注意

本製品は、研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。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。

3. 性能・品質

KOD Dash は、各ロットにおいて、human genome β -globin 8.5kb の増幅と λ DNA 12kb の増幅を確認して、出荷しております。

4. PCR プロトコール

(1) PCR 反応液の調製

・凍結している試薬は完全に融解してからご使用ください。

※10×Buffer は沈殿が生じる場合があります。沈殿が生じた場合は、転倒混和するなどをし、完全に溶解してからご使用ください。底にある沈殿はタッピングなどで浮かせてから転倒混和すると溶解しやすくなります。沈殿が溶解しにくい場合は、50°Cで5分程度加温し、転倒混和する操作を繰り返してください。

反応液を調製する前に各試薬を十分混合してからご使用ください。

組成	Volume	Final Concentration
10× PCR Buffer	5 μ L	1×
KOD Dash (2.5U/ μ L)	0.5 μ L	1.25 U/reaction
テンプレート	{ 1-50 ng 1-50 ng 10-1000 ng	Plasmid
		cDNA
		Genomic DNA
各プライマー (10 μ M)	1 μ L	0.2 μ M each
2mM dNTPs	5 μ L	0.2mM
Autoclaved, distilled water	to 50 μ L	

全ての液を添加した後、反応液を十分混合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

ターゲットの長さによるサイクル条件例

Segment	Target			Number of Cycles
	~2kb	2kb ~ 4kb	4kb~	
1.Denaturation	94°C 30sec.	94°C 30sec.	94°C 30sec.	25~30
2.Annealing	Tm-5°C 2sec.	Tm-5°C 2sec.	—	
3.Extension	74°C 30sec.	74°C 1min./2kb PCR target	68~70°C 1min./2kb PCR target	

5. 使用上の注意

- (1) 反応液 50 μ L に対して 1.25U が標準です。それでも増幅し難い場合や、8kb 以上のターゲットでは 2.5U をお勧めします。
- (2) 4kb 以上のターゲットではプライマーの Tm は 72°C 以上に設計してください。
- (3) 8kb 以上のターゲットは dNTPs を 0.35mM にすることによりエキストラバンドが低減することがあります。
- (4) スメアーなバンドが見られる場合には酵素量を減らすことによって解消できる場合があります。
- (5) 伸長反応時間が必要時間以上に長くなると、スメアーなバンドが見られる場合があります。この場合、伸長時間を短くしてご使用ください。
- (6) コロニーダイレクト PCR を行う場合は菌体の持込が多ならないように気をつけてください。菌体の持込が多いときには、スメアーなバンドになる傾向があります。菌体は目視で見えない程度でも十分 PCR ができます。
- (7) 鑄型量及びサイクル数は、プラスミド及びファージは 2.5ng, 25cycle で、human genome DNA の場合は、100ng, 30cycle を基準としてください。
- (8) 本酵素を用いて増幅した PCR 産物のほとんどは 3'末端に A が 1 塩基付加されており、T-vector によるクローニング (TA クローニング) が可能です。

<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

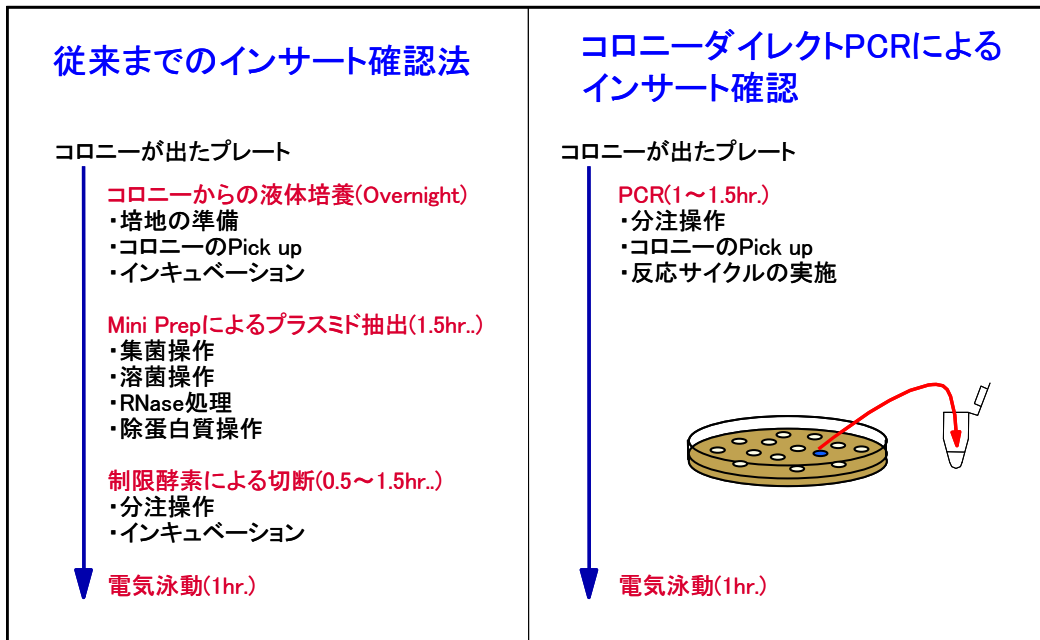
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土日祝日、休日を除く)

E-mail: tech_osaka@toyobo.jp

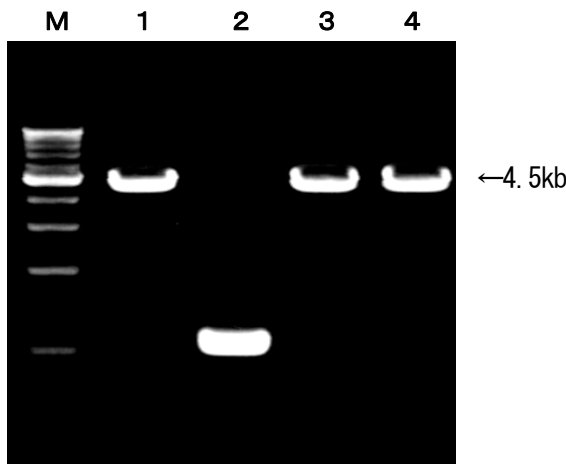
[URL] <https://lifescience.toyobo.co.jp/>

6. 実施例

【KOD Dash を用いたコロニーダイレクト PCR】



弊社 TA クローニングキット TArget Clone™ を用いて、pTA2 Vector に 4.5kb の PCR プロダクトをクローニングした後、KOD Dash を用いたコロニーダイレクト PCR を行って、インサートの有無を確認しました。なお、PCR Primer は、クローニングサイトを挟む位置にある Vector 上に設計した Primer を用いました。



M: 1kb Ladder Marker
 1~4: 各コロニー
 1% Agarose Gel

1 サンプル分の反応組成

滅菌水	23 μ L
10 \times Buffer	3 μ L
2mM dNTPs	3 μ L
Forward Primer (10 μ M)	0.35 μ L
Reverse Primer (10 μ M)	0.35 μ L
KOD Dash	0.3 μ L
Total 30 μ L	

(注意)

コロニーのピックアップにはクリスタルチップなどを用い、菌体を PCR 溶液に多く持ち込まないことが重要です。

サイクル条件

温度	時間	サイクル
94 $^{\circ}$ C	4 min.	1
94 $^{\circ}$ C	30 sec.	30
Tm~Tm-5 $^{\circ}$ C	5 sec.	
72 $^{\circ}$ C	1kb/30 sec.	

(注意)

コロニーダイレクト PCR なので、変性時間を長くしています。

1,3,4 にインサートが確認できました。

なお、データは示していませんが、PCR 産物を精製後、鋳型に用いた場合のシーケンス結果も良好でした。

※弊社ウェ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=162

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. 関連商品

	包装	Code.No.
KOD Dash 用 PCR Buffer	1mL	LDP-1B
dNTPs Mixture(2mM)	1 mL	NTP-201
<高効率 TA クローニングキット> TArget Clone™	10 回用	TAK-101
<ReverTra Ace®を用いた cDNA 合成キット> ReverTra Ace - α-®	100 回用	FSK-101
<PCR 産物の精製キット> MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-	200 回用	NPK-601

8. 参考文献

- 1) Imanaka T. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 4559-4566 (1994)
- 2) Imanaka T. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4504-4510 (1997)
- 3) Imanaka T. et al., *J. Biotechnology*, 88: 141-149 (2001)
- 4) Barnes W. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 2216-2220 (1994)
- 5) Kanzaki H. *J. Bone and Mineral Res.*, 17: 210-220 (2002)
- 6) Nakayashiki H. et al., *Genetics*, 153: 693-703 (1999)
- 7) Kikuchi A. et al., *Gene*, 236: 293-301 (1999)

【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