

KOD-Plus-/ KOD-Plus- Ver.2

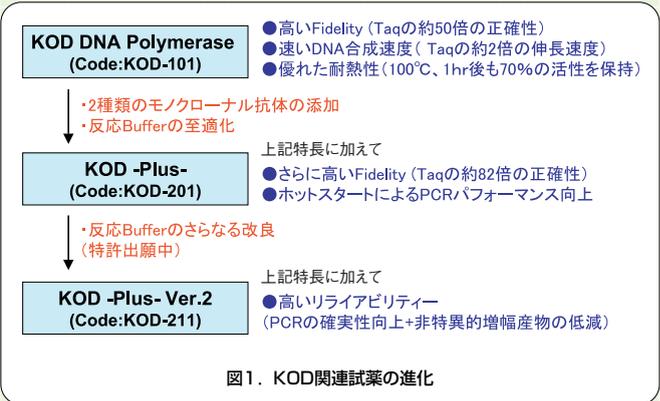
品名	包装	Code No.	価格
KOD-Plus-	200U× 1本	KOD-201	¥30,000
	200U× 5本	KOD-202	¥120,000
	200U×11本	KOD-203	¥230,000
KOD-Plus- Ver.2	200U× 1本	KOD-211	¥32,000

高正確性PCR酵素にありがちな「増えない」を解消。広いターゲットに対して確実な増幅をお約束します。



はじめに

KOD-Plus-は、最高水準のFidelity（正確性・忠実性）を持つKOD DNA Polymeraseをベースとして開発された高正確性PCR用酵素です。本酵素は、Taq DNA Polymeraseの約82倍の正確性を有し、クローニングなどの正確性を要する用途に適します。また、本酵素には2種類のモノクローナル中和抗体が混合されており、購入いただいた段階でKOD DNA PolymeraseのDNA Polymerase活性と3'→5'Exonuclease（Proofreading）活性は完全に抑えられた状態になっています。これらの抗体は最初の変性段階（94℃・2min）で失活し、PCRに影響は及ぼしません。この改善により、非特異反応の主要因である「PCRの適温に達するまでの副反応」を大幅に抑えることができ、その結果、高い特異性と優れたPCRパフォーマンスを実現することが可能



となります（ホットスタート）。

KOD-Plus-Ver.2は、KOD-Plus-の反応bufferをさらに改良することにより、KOD-Plus-の長所はそのままに、高いリライアビリティを付与したDNA polymeraseです。PCRの確実性・成功率は、KOD-Plus-に比べ確実に向上しており、更に様々な用途で力を発揮します。

今回は、本酵素を用いてRT-PCRを実施した実験例をもとに、本酵素をご使用いただく上でのコツ・注意点を紹介させていただきます。

方法

RT反応は、HeLa Total RNAの希釈系列（10、50、100、200、300、400、500ng/μl）をサンプルとして、弊社の1st ストランドcDNA合成キットReverTra Ace -α®（Code No: FSK-101）を用いて、以下のように実施しました。なお、本キットの取扱い説明書では、Total RNAの推奨使用量は1μg

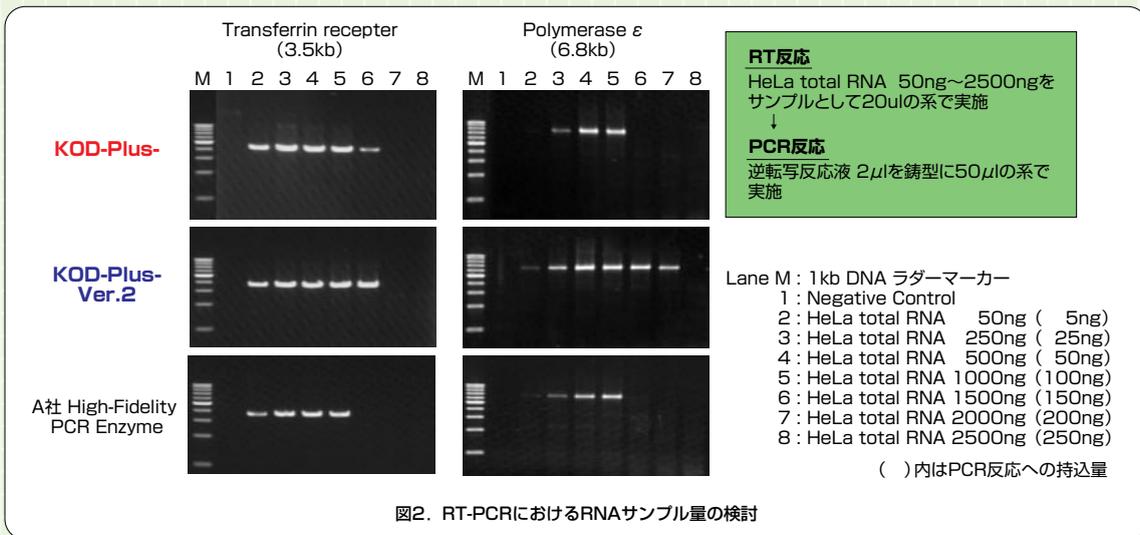
以下となっていますが、今回は、PCR反応におけるRNAの許容量をみるために50ng~2.5μgのRNAを使用しました。

PCR反応については、KOD-Plus-、KOD-Plus- Ver.2を以下の条件にて使用しました。また、PCR性能の比較のため、他社のHigh Fidelity PCR酵素を取扱い説明書に従って使用しました。

〈RT反応〉	
HeLa Total RNAの希釈系列	5 (μl)
Oligo (dT) ₂₀ primer (10 pmol/μl)	5
RNase Free H ₂ O	2
Total	12 μl
↓ 65℃, 5min後、on iceにて急冷	
↓ (以下の試薬を追加)	
5×RT Buffer	4 (μl)
10mM dNTPs	2
RNase Inhibitor	1
ReverTra Ace® (10U/μl) 〈逆転写酵素〉	1
Total	20 μl
↓ 42℃, 60min → 85℃, 5min → (4℃, ∞)	
↓	

〈PCR反応〉	KOD-Plus-	KOD-Plus- Ver.2
D.W.	32 (μl)	31 (μl)
10×Buffer for KOD-Plus-	5	
10×Buffer for KOD-Plus- Ver.2		5
2mM dNTPs	5	5
25mM MgSO ₄	2	3
Primer F (10μM)	1.5	1.5
Primer R (10μM)	1.5	1.5
逆転写反応溶液	2	2
KOD-Plus- (1.0U/μl)	1	1
Total	50 μl	50 μl
(サイクルは、KOD-Plus-、KOD-Plus-Ver.2共通で実施)		
94℃, 2min.		
98℃, 10sec. ←		
(Tm-5)℃, 30sec. ×25~35cycles		
68℃, Xmin (X: ターゲット鎖長1kbあたり1min. で設定)		

結果及び考察



今回、3.5kbと6.8kbの2種類の遺伝子をターゲットとしてRT-PCRを試みました。その結果、KOD-Plus-、及びKOD-Plus- Ver.2のいずれにおいても、エキストラバンドのない明瞭なバンドを得ることができました。特に、KOD-Plus- Ver.2では、より広いRNAの濃度幅で増幅が得られており、PCRが‘かかる’範囲が確実に広がっていることが確認できました(図2)。

一方、本結果から、過剰のRNAを用いて合成したcDNA溶液を鑄型とした場合、増幅産物が得られにくくなることも明らかとなりました。ターゲットにより若干の差はありますが、KOD-Plus-では~100ng、KOD-Plus- Ver.2では~150ng相当以下のRNAから得られたcDNA溶液を鑄型にした場合にのみ良好な増幅が得られました。この原因としては、PCR反応に持ち越された過剰のRNAによるPCR反応の阻害が疑われました(逆転写反応が阻害されていないことは別途確認済みです)。

図3は、ヒトゲノムDNAを鑄型としたPCRにおいて様々な濃度のTotal RNAを添加した場合の影響を示しています。この結果から、cDNA合成溶液に含まれる過剰のRNAはPCR効率に明らかに影響することが示唆されます。

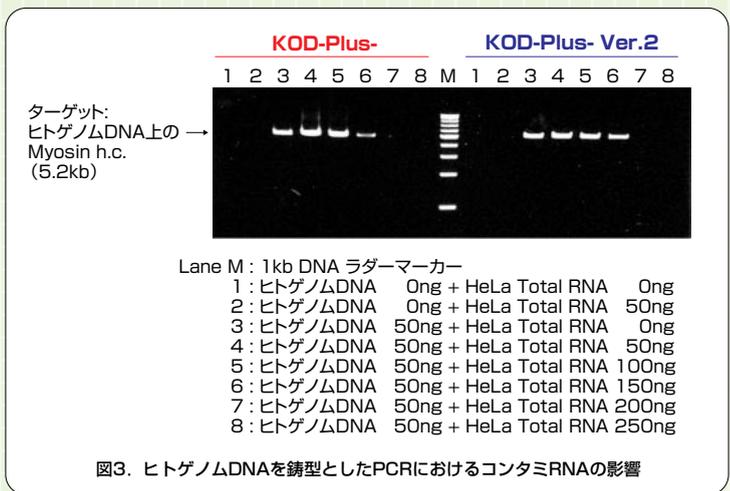
過剰なRNAによるPCR阻害の原因としては、RNAがPCR反応に必要なMg²⁺をキレートするためと考えられます(RT反応は比較的高濃度のMg²⁺を含むbufferが使用されるため阻害は受けません)。

RT-PCR時に増幅が見られないことは良く見かけるトラブルの一つです。今回の結果から、そのような場合には、RNA濃度やcDNA溶液の持ち込み量を増やすより、むしろ、RT反応液の添加量を減らすか、Mg濃度を上げること

が有効な対策であると考えられます。また、発現量の少ない遺伝子をターゲットとする場合や、cDNAライブラリーの調製等で、やむを得ず大量のRNAを使用しなければならない場合には、Total RNAではなくpoly(A)⁺RNAを使用する、もしくはRT反応後に過剰の鑄型RNAをアルカリ加水分解等により除去することが有効であると思われます。

また、RNAによるPCR阻害は、図3の例のように、DNA鑄型に大量のRNAが混入している場合にも起こり得ますので、ゲノムDNAを鑄型とする場合においても、同様の注意が必要です。

クローニング用のRT-PCRも、コツさえつかめばそれほど難しい実験ではありません。これを機に、一度プロトコルを見直されてみてはいかがでしょうか？



関連商品

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
逆転写酵素 ReverTra Ace® (100U/μl)	10,000U 50,000U	-20℃	TRT-101 TRT-102	¥15,000 ¥60,000
1stストランドcDNA合成キット ReverTra Ace-α®	100回用	-20℃	FSK-101	¥53,000
High-Fidelity RT-PCRキット ReverTra -Plus™	20回用 100回用	-20℃	PCR-501T PCR-501	¥19,000 ¥70,000
KOD/KOD-Plus-用TAクローニングキット TArget Clone™ -Plus-	10回用	-20℃	TAK-201	¥16,000