

# KOD -Plus- DNA Polymerase

## はじめに：

KOD -Plus-には、High Fidelity PCR用酵素としてご好評頂いているKOD DNA polymerase<sup>1,2)</sup>と、これに対する2種類のモノクローナル抗体<sup>3)</sup>が混合されています。

これら抗体が、常温下でDNA polymerase活性と3'-5'exonuclease活性（Proofreading活性）を完全に抑えることにより、primerの特異性が損なわれず、PCRでの反応性が格段に向上しました。

## 内容物：

200 $\mu$ l	KOD -Plus- (1.0 U/ $\mu$ l)
1ml	10x PCR buffer for KOD -Plus-
1ml	25mM MgSO <sub>4</sub>
1ml	2mM dNTPs

## 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良く攪拌してください。

Components	Volume	Final Concentration
10x PCR buffer for KOD -Plus-	5 $\mu$ l	1x
2mM dNTPs	5 $\mu$ l	0.2 mM each
25mM MgSO <sub>4</sub>	2 $\mu$ l	1 mM
Primer mix (10 $\mu$ M each)	1.5 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M each
Template DNA (10pg-200ng)	$\geq$ 1 $\mu$ l	genomic DNA 10~200 ng Plasmid DNA 1~50 ng
KOD -Plus- DNA Polymerase	1 $\mu$ l	1.0 unit
Autoclaved, distilled water	to 50 $\mu$ l	

\* KOD -Plus-の標準使用量はPCR反応液50  $\mu$ lあたり 1  $\mu$ l (1U)です。

弊社検討ではKOD -Plus- 1U使用で $\lambda$  DNAを鋳型とした場合 21kbp, genomic DNAを鋳型とした場合 12kbp, RT反応液を鋳型とした場合 7.0kbpのtargetが増幅できることを確認しています。

\* 全ての液を添加した後、反応液をボルテックスなどで良く攪拌してください。

## 2. PCRサイクル条件

サイクリング前に、94°C, 2min.のステップを加えてTemplate DNAの変性を行ってください。

3ステップ	2ステップ
Denature : 94°C, 15sec.	Denature : 94°C, 15sec.
Anneal : (T <sub>m</sub> -5)°C, 30sec.	Extend : 68°C, 1min. /kb
Extend : 68°C, 1min. /kb	
25~35 cycles	25~35 cycles

\* 伸長時間は 1kb = 1min. で設定してください。

\* 通常は3ステップのサイクルを行ってください。T<sub>m</sub>の高い(72°C以上)primer を用いたPCRでエキストラバンドが認められた場合は、2ステップのサイクルをお試しください。

### ご注意 :

1. KOD -Plus- のPCRには必ず添付の10x PCR buffer for KOD -Plus-, 25mM MgSO<sub>4</sub>, 2mM dNTPsをご使用ください。従来のKOD, KOD Dash添付のものとは組成が異なります。
2. PCR産物の末端形状はblunt endになっています。TAクローニングはお勧めできません。
3. RT反応液を鋳型DNAにする場合、RT反応液の持ち込み量が多いと増幅を阻害することがあります。通常、持ち込み量はPCR反応液の1/25量~1/10量にしてください (PCR反応液50 μl で2~5 μl程度)。また、この場合、Mg<sup>2+</sup>イオンとdNTPsの持ち込みを考慮する必要はありません。標準使用量でご使用してください (f.c. 1mM MgSO<sub>4</sub>, f.c. 0.2mM dNTPs)。
4. targetの増幅が全く認められない場合はMgSO<sub>4</sub>濃度を上げる方向でご検討ください (1mM→1.2mM)。スミアが認められる場合にはMgSO<sub>4</sub>濃度を下げる方向でご検討ください (1mM→0.8mM)。
5. プラスミドを鋳型にしたPCRで、増幅が認められない場合はMgSO<sub>4</sub>濃度を上げる方向でご検討ください (1mM→1.5 or 2mM)。結果が改善されることがあります。

### References :

- 1) Takagi, M., Nishioka, M., Kakihara, H., Kitabayashi, M., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M., and Imanaka, T. (1997) Appli. Environ. Microbiol., 63, 4504-4510.
- 2) Hashimoto, H., Matsumoto, T., Nishioka, M., Yuasa, T., Takeuchi, S., Inoue, T., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., and Kai, Y. (1999) J. Biochemistry (Tokyo), 25, 983-986.
- 3) Mizuguchi, H., Nakatsuji, M., Fujiwara, S., Takagi, M., and Imanaka, T. (1999) J. Biochemistry (Tokyo), 126, 762-768.

### 関連商品 :

品名	包装	保存温度	Code No.	価格
ReverTra Ace (100 U/ μl) (Reverse Transcriptase)	10,000 U 50,000 U	-20°C -20°C	TRT-101 TRT-102	¥ 15,000 ¥ 60,000