10-04

高保真•高效率•高速 PCR 酶

KOD –Plus- Neo

(Code:KOD-401)

科研用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department

OSAKA JAPAN

目 录

【1】 简介 1
【2】 PCR 实验步骤 3
【3】 进行实验的注意事项 6
【4】 性能数据 7
【5】 实验例 9
【6】 常见问题 10
【7】 参考文献 11
【8】 相关产品 11

【 注意 】

该系列产品为科研用试剂。请勿作为诊断、临床试剂用。此外，对于本产品的有害性调查还不十分全面，因此，在使用时，请严格遵守实验室的一般注意事项，适当使用保护用品，安全操作。

【 保存 】

所有组分请均保存于-20℃条件下。

【1】 简介

KOD -Plus- Neo 是在来源于鹿儿岛县小宝岛的含硫气孔中分离出来的超嗜热原始菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株的 KOD DNA Polymerase[1,2]的基础上开发的 PCR 用酶。由于 KOD DNA Polymerase 具备强力的 3´→5´Exonuclease 活性（Proofreading 活性），可表现出很高的保真性，最适用于克隆目的的 PCR。而本产品通过在 KOD DNA Polymerase 中添加独有的延伸增强剂，在保持原产品 KOD -Plus-（Code No. KOD-201）、KOD -Plus- Ver.2（Code No. KOD-211）优良的保真性（约为 Taq 的 80 倍）的同时，扩增量和延伸性得到了显著的提升。

此外，延伸时间从原来的 1 min./ kb 缩短到 30 sec./ kb，大大缩短了 PCR 所需时间。

本酶混合了抑制 Polymerase 活性和 3'→5' Exonuclease 活性的两种单克隆抗体，可简便地进行高特异性的 Hot start PCR。

特征

● **可对微量模板进行高保真・高效率的扩增**

KOD -Plus- Neo 中添加了本公司独有的延伸增强剂*，即便是微量模板也可对目的基因进行高保真・高效率的扩增。本酶的保真性约为 Taq 的 80 倍，也可对低拷贝数模板的目的基因进行高保真性的扩增。

*KOD DNA polymerase 等高保真性 PCR 酶在 20～30 循环以后，很容易出现扩增无法持续的<停滞现象>。延伸增强剂可抑制该<停滞现象>，使反应更持久。因此，对微量模板、长片段的扩增可发挥显著的效果。

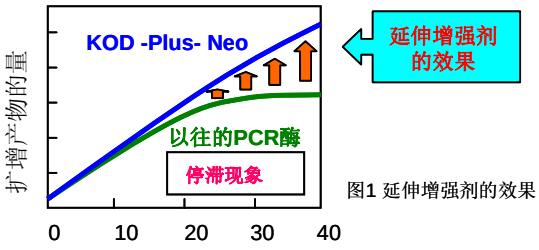
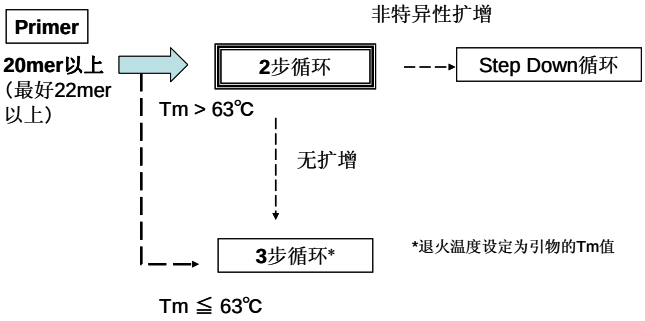


图1 延伸增强剂的效果

● **实现了各种引物同一循环条件**

无需摸索循环条件。20mer 以上的引物（Tm 值*＞63℃）可先尝试 2 步法。无需摸索条件非常简便。



*引物 Tm 值的计算请使用最邻近法（Nearest Neighbor method）。本说明书中记载的引物 Tm 值是在 50 mM Na^+ 浓度与 0.5 μM 寡核苷酸（Oligonucleotide）浓度条件下计算而得。

● **缩短了扩增时间（长目的片段更方便）**

延伸时间从原产品的 1 min./ kb 缩短到 30 sec./ kb。由于提高了延伸性，可更迅速地对长片段进行扩增。

● **可对各种目的片段进行扩增**

相比以往产品提高了延伸性，可扩增各种长目的片段。已确认可对 17.5 kb 的人基因组 DNA 模板进行扩增。此外，在反应液的 Mg^{2+}浓度为 2 mM 的条件下，可对 24.0 kb 的人基因组 DNA 模板进行扩增。

◆产品组成

	KOD-401 (200 U × 1)	KOD-401B
KOD -Plus- Neo (1.0 U/μl)	200 μl × 1	(KOD-401) × 5
10 × PCR Buffer for KOD -Plus- Neo	1 ml × 1	
25 mM $MgSO_4$	1 ml × 1	
2 mM dNTPs	1 ml × 1	

◆安全上的注意事项

本产品为科研用试剂。请勿作为诊断、临床检测试剂使用。使用本产品请严格遵守实验室的一般注意事项，注意安全。在相关实验中，有可能还会用到对人体有害的试剂。请务必注意各试剂添附的组分及其相关注意事项，并遵守各仪器·器具添附的使用说明书的指示，使用必要的保护用具，注意安全。

◆性能·品质

各批号的 KOD -Plus- Neo 均对人基因组 DNA 模板 β-globin 基因内 17.5 kb 片段进行扩增确认实验后再销售。

【2】 PCR 实验步骤

1. 引物设计

・请尽量使用 22~35mer（Tm 值*＞63℃）的引物。
・GC 含量请设计为 45~60%。并请确认 GC 的位置（偏向）。GC 如靠近 3'端，则容易出现弥散、杂带等现象。（按 5'端一侧的为 60~70%, 3'端一侧的为 40~50%制作比较理想。）
・3'末端设计为 G 或 C 可提高引物与模板结合效率。但如前所述，如果 GC 过于偏向 3'端，则容易出现弥散、杂带等现象，请注意。
・请注意不要使其形成分子内二级结构、引物二聚体等现象。
・扩增长片段时，请使用长度为 25~35mer 、Tm 值为 65℃以上的引物。使用 25mer 以上（Tm 值≧65℃）的引物成功率较高。
・请注意避免使用含次黄苷酸（inosine acid）的引物。

*引物 Tm 值的计算请使用最邻近法（Nearest Neighbor method）。本使用说明书中所记载的引物 Tm 值是在 50 mM Na^+浓度与 0.5 μM 寡核苷酸（Oligonucleotide）浓度条件下计算而得。

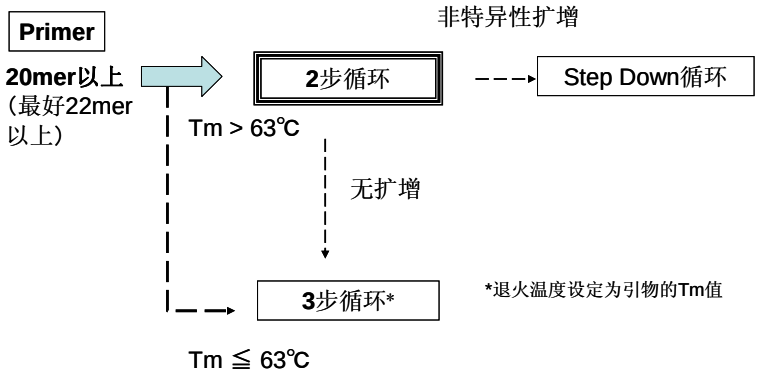
2. PCR 反应液的配制

配制反应液前，请充分混匀各试剂。冻结的试剂请完全解冻后再使用。

Components	Volume	Final Concentration
Autoclaved, distilled water	(33 - X) μl	
10× PCR Buffer for KOD -Plus- Neo	5 μl	1×
2 mM dNTPs	5 μl	0.2 mM each
25 mM $MgSO_4$	3 μl	1.5 mM
引物 (10 μM each)	1.5 μl	0.3 μM each
模板	X μl	Genomic DNA ~200 ng/50 μl Plasmid DNA ~50 ng/50 μl cDNA ~200 ng/50 μl
KOD -Plus- Neo (1 U/μl)	1 μl	1 U/50 μl
Total	50 μl	

・所有液体添加以后，请用Vortex等充分混匀，再进行PCR。
・一般情况下Mg^{2+}浓度请用1.5 mM（终浓度）。
・以逆转录反应液为模板的情况下，逆转录反应液中过量的RNA会抑制PCR反应。PCR反应体系为50 μl时添加的逆转录反应液量，首先请尝试RNA量为50 ng（用Total RNA1 μg，在20 μl容量下进行逆转录反应时，取反应液1 μl）左右。
・模板的详细说明请参照【3】1（p.6）。

3. PCR 循环条件 **[重要事项]**



◆KOD -Plus- Neo 的循环条件，以两步法为基本循环，条件的设定非常简便。对于 Tm 值较低的引物，如果 Tm 值高于 63℃，一般退火温度都设计为 68℃，先尝试下面的两步法。

1) 两步法

引物的 Tm 值高于 63℃的情况下，请用两步法。

2步法		
Predenature :	94℃, 2 min.	
Denature :	98℃, 10 sec.	25～45 cycles
Extension :	68℃, 30 sec./ kb	

・如果目的片段的拷贝数较少，或扩增长片段时，请尝试30~45循环。

・延伸（Extension）时间请按照30 sec./ kb设定。

・目的片段的拷贝数较少，或目的片段超过10 kb的情况下，延伸时间延长为1 min./ kb。同时，如果把反应液的 Mg^{2+}浓度设为2 mM则可增加扩增量。

・把DNA变性（Denature）设为94℃･15 sec.，可增加目的片段的扩增量。GC rich 的目的片段的变性条件请设为98℃･10 sec.。

・添加DMSO时，请用三步法，或使用25~35mer、Tm值68℃以上的引物。引物的Tm值低于68℃的情况下，两步法时DMSO的添加量请在2%以下。

2) 其他循环

引物的 Tm 值在 63℃以下，或用两步法无法确认到扩增时，请尝试用三步法。此外，当扩增产物出现杂带或弥散时，请尝试 Step down。

三步法		
Predenature :	94℃, 2 min.	
Denature :	98℃, 10 sec.	25～45 cycles
Annealing :	(Tm)℃, 30 sec.	
Extension :	68℃, 30 sec./ kb	

・退火温度请设定为引物的Tm值。

Step down		
Predenature :	94℃, 2 min.	
Denature :	98℃, 10 sec.	5 cycles
Extension :	74℃, 30 sec./ kb	
Denature :	98℃, 10 sec.	5 cycles
Extension :	72℃, 30 sec./ kb	
Denature :	98℃, 10 sec.	5 cycles
Extension :	70℃, 30 sec./ kb	
Denature :	98℃, 10 sec.	15 ～ 30 cycles
Extension :	68℃, 30 sec./ kb	
Extension :	68℃, 7 min.	

◆三步法、Step down也适用如下说明。

・目的片段的拷贝数较少，或目的片段超过10 kb的情况下，延伸时间延长为1 min./ kb。同时，如果把反应液的 Mg^{2+}浓度设为2 mM则可增加扩增量。

・把DNA变性（Denature）设为94℃･15 sec.，可增加目的片段的扩增量。GC rich 的目的片段的变性条件请设为98℃･10 sec.。

【3】 进行实验的注意事项

1. 为了保证 PCR 顺利进行

◆关于模板

・模板量请参照如下（PCR反应体系为50μl时）。

			一般情况下模板量
Genomic DNA	真核细胞来源DNA	5~200 ng	50 ng
	原核细胞来源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)
λDNA		10 pg~10 ng	1 ng

・模板的长度与纯度对 PCR 的结果有很大的影响。模板量充裕的情况下，建议事先进行电泳以确认其品质。本酶中混入较多 RNA 时，会抑制 PCR 反应。

・以逆转录反应液为模板时，逆转录反应液中过量的 RNA 会抑制 PCR 反应。向 50μl PCR 反应液中添加逆转录反应液时，首先，请先尝试 50 ng 量的 RNA（用 Total RNA 1μg，在 20μl 反应体系下进行逆转录反应时，取反应液 1μl）。

・不要使用含尿嘧啶的模板。

◆关于添加剂

・引物是二级结构或对 GC rich 目的片段进行扩增时，按终浓度 2~5%添加 DMSO，可改善扩增结果。但众所周知 DMSO 会降低引物与模板结合的效率。如果添加 DMSO，请用能提高引物与模板结合效率的三步法，或使用 25~35mer、Tm 值为 68℃以上的引物。引物的 Tm 值低于 68℃的情况下，两步法时 DMSO 的添加量请在 2%以下。

◆其他注意事项

・反应用离心管请尽量使用薄壁管。同时，推荐 PCR 反应液为 total 50μl。

・灭菌水、引物请事先分装成小份保存，建议每次实验都用完。

・dNTPs 请务必使用本品中添附的组分，或用本公司单独销售的。

2. PCR 产物的克隆

・用本酶扩增的 PCR 产物的末端为平滑末端。因此，对该 PCR 产物进行克隆时，需要使用事先磷酸化的引物，或将 PCR 产物的末端磷酸化后再进行平滑末端的克隆。进行 TA 克隆时，如果用本公司的 KOD DNA Polymerase 专用 TA 克隆试剂盒「TArget Clone -Plus-（Code No. TAK-201）」，则可对未经纯化的 PCR 产物进行简便的 TA 克隆。

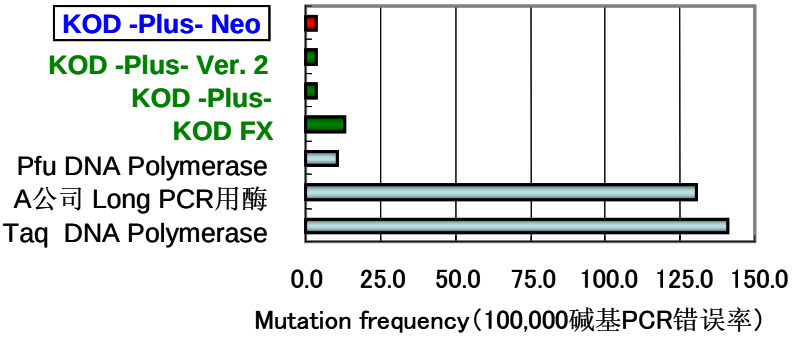
・对于用本酶扩增的 PCR 产物，用限制性内切酶处理，再利用该突出末端进行克隆时，请在限制性内切酶处理前对扩增产物进行纯化。

DNA Polymerase 有残留的情况下，本酶所具有的 3'→5' Exonuclease 活性会将限制性内切酶处理中的突出末端削去。扩增产物的纯化，在苯酚/氯仿处理后，进行乙醇沉淀，或用本公司生产的利用磁珠的 DNA 纯化试剂盒「MagExtractor -PCR & Gel Clean up-（Code No. NPK-601）」。

【4】 性能数据

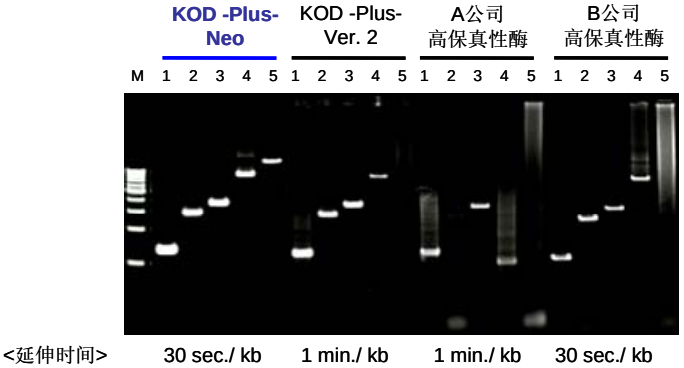
1. 保真性

以人基因组 DNA 为模板，对β-globin 基因（2.7 kb）进行扩增，PCR 产物用 TArget Clone -Plus-（Code No. TAK-201）进行 TA 克隆。然后，选择 96 个克隆测序，确认序列。结果可见，KOD -Plus- Neo 具有与 KOD -Plus-、KOD -Plus- Ver.2 同等的保真性。该保真性约为 Taq DNA Polymerase 的 80 倍，几乎没有因 PCR 扩增而混入的错配的碱基。



2. 扩增效率・延伸性

用 KOD -Plus- Neo 及以往的 PCR 酶，以人基因组 DNA 为模板，对各种长度的β-globin 基因进行扩增。反应按各 PCR 酶的推荐条件，进行了 30 个循环。结果显示，只有用 KOD -Plus- Neo 的情况下，17.5 kb 的片段能确认得到明亮的条带。而且，17.5 kb 以下的片段，用 KOD -Plus- Neo 的得率要高得多。



<延伸时间> 30 sec./ kb　1 min./ kb　1 min./ kb　30 sec./ kb

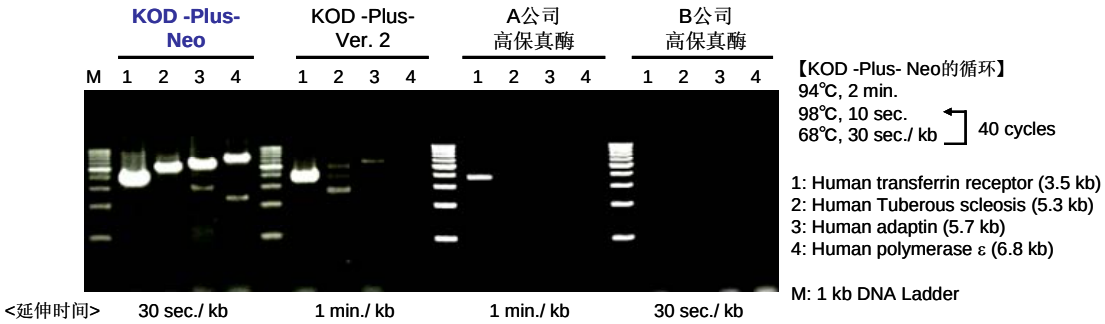
【KOD -Plus- Neo的循环条件】
1～4:
94℃, 2 min.
98℃, 10 sec.
68℃, 30 sec./ kb　30 cycles
5: Step down循环

1: Human β-globin (1.3 kb)
2: Human β-globin (2.7 kb)
3: Human β-globin (3.6 kb)
4: Human β-globin (8.5 kb)
5: Human β-globin (17.5 kb)

M: 1 kb DNA Ladder

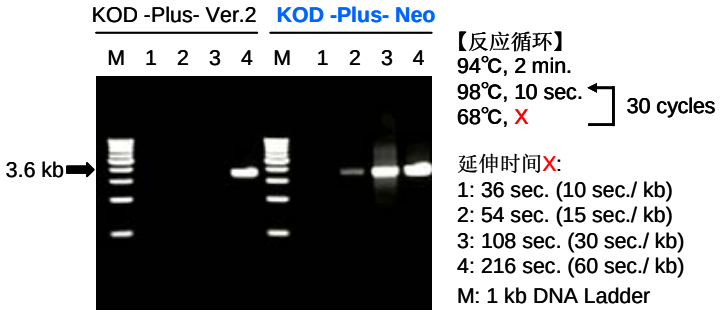
3. 微量模板的扩增效率

以 HeLa 细胞来源的 Total RNA 逆转录得到的 cDNA（Total RNA 0.5 ng 相当）为模板，扩增 4 种基因，并比较扩增效率。反应按各 PCR 酶的推荐条件，进行了 40 个循环。结果显示，只有用 KOD -Plus- Neo 的情况下，4 种基因才都能确认得到充分的扩增。



4. 延伸速度

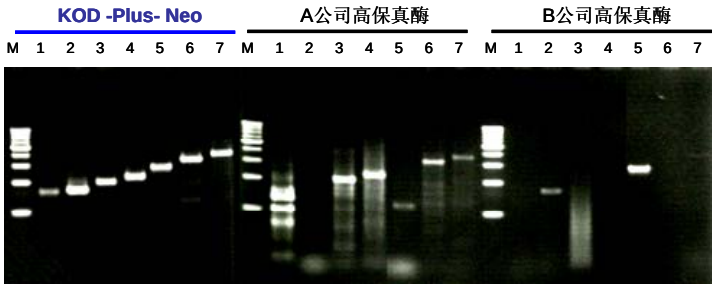
以人基因组 DNA（50 ng）为模板，用各种延伸时间对 β-globin 基因（3.6 kb）进行扩增。结果可见，用 KOD -Plus- Neo，很短的延伸时间也能确认到明亮的条带。因此，可把 KOD -Plus- Neo 的延伸时间设定为 30 sec./ kb。



【5】 实验例

【实验例 1】Total RNA 的各种基因全长 ORF 的扩增

以 HeLa 细胞来源的 Total RNA 逆转录后得到的 cDNA（Total RNA 50 ng 相当）为模板，对各种蛋白激酶的 ORF（open reading frame）的全长扩增。反应根据各 PCR 酶的推荐条件进行了 30 个循环。结果可见，只有用 KOD -Plus- Neo 的情况下，所有的基因都能得到明亮的扩增产物。



<延伸时间> 30 sec./ kb　　1 min./ kb　　30 sec./ kb

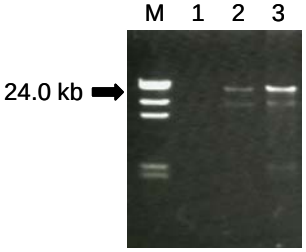
【KOD -Plus- Neo的循环】
94℃, 2 min.
98℃, 10 sec.
68℃, 30 sec./ kb　30 cycles

1: Human brk Tyrosine kinase (1.6 kb)
2: Human rac protein kinase-alpha (1.7 kb)
3: Human 63kDa protein kinase (2.0 kb)
4: Human c-syn protooncogene (2.2 kb)
5: Human FER Tyrosine kinase (2.7 kb)
6: Human cell adhesion kinase beta (3.2 kb)
7: Human Jak2 kinase (3.6 kb)

M: 1 kb DNA Ladder

【实验例 2】长链目的片段的扩增例

以人基因组 DNA（200 ng）为模板尝试对 tPA（Human tissue-type plasminogen activator）基因（24.0 kb）进行扩增。结果可见，通过将反应液的 Mg^{2+}浓度调整到 2 mM 即可对这种长目的片段进行扩增(对于 10 kb 以上的目的片段,通过将反应液的 Mg^{2+}浓度调整到 2 mM，可改善扩增效率)。



【KOD -Plus- Neo的循环】
Step down cycle
1: 延伸时间 30 sec./ kb、Mg浓度 1.5 mM(终浓度)
2: 延伸时间　1 min./ kb、Mg浓度 1.5 mM(终浓度)
3: 延伸时间 30 sec./ kb、Mg浓度　2 mM(终浓度)
M: *λ*/*Hind* Ⅲ digest

【6】 常见问题

问题	对策	具体事例·标准
无法确认到扩增产物或扩增产物很少。	改变循环条件。	将延伸时间延长为 1 min./ kb。
		增加 2~5 个循环。
		用三步法。 用三步法时退火温度降为 Tm-5~Tm-10℃。
		用 Step down 循环（特别是对 10 kb 以上的长链目的片段有效）。
	改变 $MgSO_4$ 浓度。	从标准的 1.5 mM 提高至 2.0 mM（特别是对 10 kb 以上的长链目的片段有效）。
		GC rich 目的片段时从标准的 1.5 mM 下降到 1.0 mM。
	确认使用模板的量和品质（特别要确认模板是否被 RNA 等污染）。	增加模板量。
		纯化模板。
		为减少 RNA 带来的抑制作用，减少 cDNA 样品的量。
		降解或除去 RNA。
	确认使用引物的品质。	重新配制、合成引物。
		重新设计引物。
	增加酶的使用量。	从标准的 1 U 增加到 1.5~2.0 U。
	加入添加剂。	按终浓度 2~5%添加 DMSO。[请参考 5.（b）]
出现弥散、杂带时。	改变循环条件。	原先用 3 步法时改为 2 步法。
		原先用 2 步法时改为 Step down 循环。
		减少 2~5 个循环数。
	降低 $MgSO_4$ 浓度。	从标准的 1.5 mM 降低到 1.0 mM。
	确认使用的模板量。	减少模板量。
	确认使用的引物的品质。	重新配制、合成引物。
		重新设计引物（引物设计得较长些往往可消除弥散、杂带现象）。
	减少使用的酶量。	从标准的 1 U 降低到 0.5~0.8 U。
无法进行 TA 克隆。	使用专用的试剂盒。	请使用专用的 TA 克隆试剂盒「TArget Clone -Plus-（Code No. TAK-201）」。 <KOD -Plus- Neo 的扩增产物末端已被平滑化。>

【7】 参考文献

(1) Takagi, M., Nishioka, M., Kakihara, H., Kitabayashi, M., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M., and Imanaka, T., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4504-4510 (1997)
(2) Hashimoto, H., Matsumoto, T., Nishioka, M., Yuasa, T., Takeuchi, S., Inoue, T., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., and Kai, Y., *J. Biochem.* (Tokyo), **125**, 983-986 (1999)
(3) Mizuguchi, H., Nakatsuji, M., Fujiwara, S., Takagi, M., and Imanaka, T., *J. Biochem.* (Tokyo), **126**, 762-768 (1999)
(4) Nishioka, M., Mizuguchi, H., Fujiwara S., Komatsubara, S., Kitabayashi, M., Uemura, H., Takagi, M., and Imanaka, T., *J. Biotechnol.* **88**, 141-149 (2001).
(5) Hashimoto, H., Nishioka, M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., Inoue, T., and Kai. Y., *J. Mol. Biol.*, **306**, 469-77 (2001).
(6) Imanaka, T., and Takagi, M., *J. Chin. Inst. Chem. Engrs*., **32**, 277-288 (2001).

【8】 相关产品

品　名	包装	Code.No.
<高保真性 PCR 酶> KOD -Plus-	200 U×1 (200 U×1)×5	KOD-201 KOD-201B
<高保真性 PCR 酶(高保真性的同时 PCR 成功率 UP)> KOD -Plus- Ver.2	200 U×1 (200 U×1)×5	KOD-211 KOD-211B
<高成功率 PCR 酶> KOD FX	200 U×1 (200 U×1)×5	KFX-101 KFX-101B
<KOD DNA Polymerase 用高效率 TA 克隆试剂盒> TArget Clone™ -Plus-	10 次份	TAK-201
<高效率连接试剂盒> Ligation high Ver.2	750 μl×1 (100 次份)	LGK-201
<利用磁珠纯化 DNA fragment 试剂盒> MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	200 次份	NPK-601

[制造 • 销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司

上海市浦东新区张杨路 188 号汤臣商务中心 C 座 310 室

邮编：200122

交货期限 • 订货相关咨询

Tel:021-5879-4900　Fax:021-5879-4901

E-Mail:sales@bio-toyobo.cn

产品内容 • 技术相关咨询

Tel:021-5879-4142　Fax:021-5879-5259

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

http://www.bio-toyobo.cn

代理商资料：