



08-06

高保真性 PCR 反应酶的升级版
KOD –Plus- Ver.2
(Code:KOD-211)

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.....	4
【4】 常见问题.....	5
【5】 相关产品.....	6
【6】 参考文献.....	7

【 注意 】

该系列产品为研究用试剂。**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。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,079,352, 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155 and claims outside the US corresponding to US Patent No. 4,889,818. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim (such as the patented 5' Nuclease Process claims in US Patents Nos. 5,210,015 and 5,487,972), no right to perform any patented method, and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

【1】 简介

本产品是使用嗜热原始菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株开发的高保真性 PCR 用酶。本酶除 Polymerase 活性外,还具有强力 3'→5'核酸外切酶活性(Proof-reading 活性),因此保真性约为 Taq DNA Polymerase 的约 80 倍。本产品通过对原来的 KOD -Plus- 的 PCR Buffer 的改良,在保持出色的保真性的基础上,更提高了 PCR 反应的可靠性(成功率)。

本产品与 KOD -Plus-一样,将抑制多聚酶活性及校正活性的 2 种抗 KOD 单克隆抗体预混合在酶中,可简便地进行 Hot start PCR。本产品具有如下特征:

1) **高可靠性** 对难以扩增的序列目的片段及长目的片段的可靠性(PCR成功率)更高,因此可获得确实有效的扩增产物。

2) **降低了带入的RT溶液的阻碍** 与KOD -Plus-相比,降低了逆转录反应溶液带入对 PCR反应的阻碍。

3) **高保真性** 约为Taq DNA Polymerase的 80 倍,与KOD -Plus-具有同等的保真性,最适用于PCR产物的克隆。

※有另售的KOD/KOD -Plus-用TA克隆试剂盒「Target Clone™ -Plus-」。

◆KOD -Plus- Ver.2 是对 KOD -Plus-的反应缓冲液(10×Buffer for KOD -Plus-)进行改良后的升级版。如您手头已有 KOD -Plus-,则可购买单独销售的 KOD -Plus- Ver.2 用 Buffer(Code No.KOD-3B)

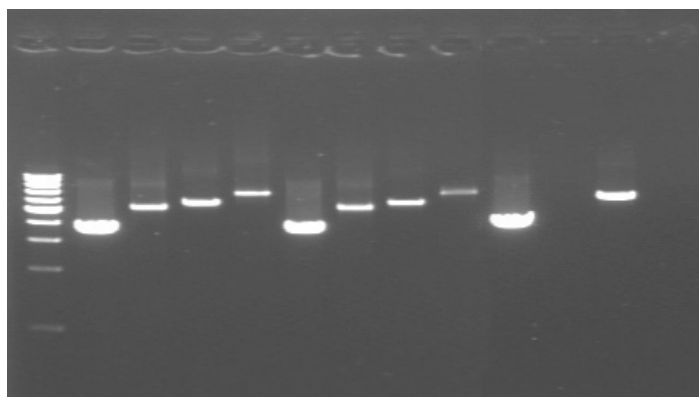
实例:

※以各种 cDNA 为目的片段,使用 KOD -Plus- Ver.2、KOD -Plus-和其他公司 PCR 用酶的扩增性能比较例。

以经 HeLa total RNA 逆转录的各种 cDNA 为模板,用各产品的推荐条件对其进行 PCR。结果可见,与其他酶相比,KOD -Plus- Ver.2 显示了良好的扩增效果。特别是对难扩增的 human polymerase ε cDNA 6.8kb(第四栏)的目的片段,也能得到明亮的扩增条带。

其他公司高保真性

KOD -Plus- Ver.2 KOD -Plus- PCR用酶
M 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4



1:human transferrin receptor cDNA 3.5kb
2:human tuberous scleosis cDNA 5.3kb
3:human adaptin cDNA 5.7kb
4:human polymerase ϵ cDNA 6.8kb
M:1kb ladder

◆ 产品内容

	KOD-211 (200 次用)
KOD -Plus- (1.0 U/ μ l)	200 μ l \times 1 支
10 \times Buffer for KOD -Plus- Ver.2	1ml \times 1 支
25mM MgSO ₄	1ml \times 1 支
2mM dNTPs	1ml \times 1 支

◆ 注意安全

该系列产品为研究用试剂。**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，安全操作。
在进行相关实验时，有可能还会使用到其他对人体有害的试剂。请务必遵守各试剂的注意事项及仪器、器具等的使用说明，适当使用保护用品。

◆ 性能•品质

各批号的 KOD -Plus- Ver.2 均对 HeLa total RNA 的逆转录产物 human polymerase ϵ cDNA 6.8kb 进行扩增确认实验后再销售。

【2】 PCR 实验步骤

(1)PCR反应液的配制

配制反应液前请对各试剂进行充分混匀后再使用。冻结的试剂应使其完全融解。

Components	Volume	Final Concentration
10× Buffer for KOD -Plus- Ver.2	5 μ l	1×
2mM dNTPs	5 μ l	0.2mM each
25mM MgSO ₄	3 μ l	1.5mM
Primer(10 μ M each)	1.5 μ l	0.3 μ M each
Template DNA	\geq 1 μ l	Genomic DNA 10~200 ng/50 μ l Plasmid DNA 1~50 ng/50 μ l cDNA 请参照 3.-(7)
KOD -Plus- (1U/ μ l)	1 μ l	1 U/50 μ l
Autoclaved,distilled water	to 50 μ l	

•酶溶液请在最后添加，用vortex等对反应液进行充分混匀之后，将其放置到PCR仪上。

(2)PCR的循环条件

通常情况下请按以下的三步法进行反应。用高Tm值（65℃以上）的引物进行PCR，产生杂带时，请尝试2步法。

3 Steps		2 Steps	
Pre-denature	94°C, 2min.	Pre-denature	94°C, 2min.
:		e :	
Denature :	98°C, 10sec.	Denature :	98°C, 10sec.
Annealing :	(Tm-5)°C, 30sec.	Extension :	68°C, 1min. /kb
Extension :	68°C, 1min. /kb		

25~40 cycles

•延伸时间(Extension)请按目的片段链长1kb/min.的标准设定。

【3】 进行实验的注意事项

- (1) 请尽量选用 thin-wall 型反应用离心管。另外，PCR 反应液推荐量为 total 50 μ l。
- (2) 灭菌水、引物建议事先分成小包装，每次都使用完。
- (3) dNTPs 请务必使用本产品添附的部分，也可以使用本公司另售的「dNTPs Mixture(2mM)」(Code No.NTP-201)。
- (4) 引物的 GC 含量不可太高，长度应保持在 22~34mer 的范围之内 (T_m 值 $>60^{\circ}\text{C}$)。另外，设计引物时要注意不要使其形成分子内二级结构、引物二聚体等情况。
- (5) 对长链目的片段进行扩增时，请使用 T_m 值 65°C 以上的引物。
- (6) 模板 DNA 的长度、纯度等对 PCR 的结果影响很大。如果模板 DNA 的量有余，建议事先做个电泳分析以确认其品质。本产品如果混入了过量的 RNA，则可能阻碍 PCR 的反应。
- (7) 以逆转录反应液为模板 DNA 时，RT 反应液中过剩的 RNA 会阻碍 PCR 反应。建议在 50 μ l 的 PCR 反应液中，RNA 的量控制在 150ng 以下。也就是说，用 1 μ g Total RNA，20 μ l 体积进行 RT 反应，往 PCR 反应的添加量在 3 μ l 以下。另外，植物基因组根据抽出方法的不同，可能混入 RNA 的量更多。要防止 RNA 的混入，建议降低 DNA 样品的液量或对 DNA 样品进行 RNase 处理。
- (8) 对于高 GC 含量的目的片段，添加终浓度为 2~5% 的 DMSO，有可能改善扩增效果。
- (9) DNA 的变性条件为 94°C 、15sec. 时，能增加目的片段的扩增量。对于高 GC 含量的目的片段，变性条件请设定为 98°C 、10sec.。
- (10) PCR 的循环数根据样品 DNA 的量而定。通常，使用人类基因组 DNA 50-200ng 时，30~40 循环可得到良好的结果。
- (11) 进行 Colony Direct PCR 时，注意不要向 PCR 反应液中带入过量的菌体。肉眼看不到的菌体量即可充分进行 PCR。
- (12) 通过本产品扩增的 PCR 产物末端已被平滑化(blunt end)，因此可以通过平滑末端法进行克隆。使用本公司的 KOD/KOD -Plus-用 TA 克隆试剂盒 TArget CloneTM -Plus-(Code No.TAK-201) 即可简便地进行 TA 克隆。

【4】 常见问题

原因	对策	具体数据
无法看到扩增产物 或没有扩增产物	提高MgSO ₄ 的浓度	从标准的 1.5mM 提高到 2.0mM
	降低退火温度	下降到T _m -10℃
	增加循环数	增加2~5个循环
	增加模板DNA的量	
	增加酶量	从标准的1U提高到1.5~2.0U
	确认使用的模板DNA、引物的品质	特别是确认模板DNA是否被RNA污染
	对高GC含量的目的片段 请降低MgSO ₄ 的浓度	从标准的 1.5mM 降低到 1.0mM
	样品中混有大量的RNA	将cDNA样品稀释后再使用 分解或除去RNA
可看到非特异性扩增产物	提高退火温度	勿高于68℃
	进行Step Down PCR	
	降低MgSO ₄ 的浓度	从标准的 1.5mM 降低到 1.0mM
	设计新的引物组	
背景中可看到smear或杂带	减少循环数	减少2~5个循环
	降低模板DNA的量	
	降低MgSO ₄ 的浓度	从标准的 1.5mM 降低到 1.0mM
	减少使用的酶量	从标准的1U降低到0.5~0.8U
不能进行TA克隆	请使用专用的试剂盒	请使用TArget Clone™ -Plus-

【5】 相关产品

品 名	包 装	保存温度	Code.No.
<M-MLV 改变型逆转录酶> ReverTra Ace [®] (100 U/μl)	10,000 U×1 支 10,000 U×5 支	-20℃	TRT-101 TRT-101B
<高保真性 PCR 酶> KOD DNA Polymerase	250 U×1 支 250 U×5 支	-20℃	KOD-101 KOD-101B
<热启动高保真性 PCR 酶> KOD -Plus-	100 U×1 本 200 U×1 本 200 U×10 本	-20℃	KOD-201(2) KOD-201 KOD-201B
<KOD/KOD -Plus-用高效率 TA 克隆试剂盒> TArget Clone [™] -Plus-	10 次份×1 本 10 次份×5 本	-20℃	TAK-201 TAK-201B
dNTPs Mixture(2mM)	1 ml	-20℃	NTP-201
KOD -Plus-用 25mM MgSO ₄	1 ml	-20℃	KOD-2S
KOD -Plus- Ver.2 用 Buffer	1 ml	-20℃	KOD-3B

【6】 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)

[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：