



高效率・高成功率PCR酶

KOD FX Neo

(Code No.KFX-201)

使用说明书

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】 进行试验的注意事项.....	9
【4】 性能数据.....	10
【5】 实验例.....	13
【6】 常见问题.....	15
【7】 参考文献.....	16
【8】 相关产品.....	16

【 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。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

The use of betaine in DNA polymerase reactions is covered by intellectual property, including U.S. Patent No. 6,270,962 and related patents issued or pending in other countries ("I.P."), exclusively licensed to EPICENTRE Technologies Corporation, 726 Post Road, Madison, WI 53713, USA ("EPICENTRE"). The right to use betaine in conjunction with KOD DNA Polymerase in PCR is sublicensed by EPICENTRE to TOYOBO Co., Ltd. solely for research purposes. The purchase of this product conveys to the buyer a limited, non-exclusive, non-transferable right under the I.P. to use the purchased product containing betaine and KOD DNA Polymerase in PCR solely for research purposes. No rights are granted to resell, repackage, or further sublicense. No other license is granted to the buyer, whether expressly, by implication, by estoppel or otherwise.

【1】 简介

KOD FX Neo 是以 KOD DNA Polymerase^{1,2)}为基础开发的 PCR 用酶，具有优良的延伸性，尤其在粗样品的扩增上表现出出色的性能，对于用普通 PCR 酶难以扩增的含多种 PCR 阻碍物质的粗样品及长链目的片段可轻松扩增。

本产品在高成功率 PCR 试剂「KOD FX (Code No. KFX-101)」的基础上，添加了本公司独有的延伸增强剂，使得对粗样品的扩增成功率更高，延伸性更好。

此外，本酶中还混合了抑制 Polymerase 活性与 3'→5' Exonuclease 活性的 2 种单克隆抗体，可简便地进行高特异性的 Hot start PCR。

◆ 特征

1. 出色的粗样品扩增能力

对含有抑制 PCR 反应物质的粗样品（活体样品、土壤、食品等）的扩增能力非常强。对于血液、动植物组织等样品，无需抽提核酸，直接添加到反应液中即可获得充分的扩增产物。

2. 优良的延伸性

KOD FX Neo 中添加了本公司独有的延伸增强剂*，以人基因组 DNA 为模板，最长可扩增 40 kb。

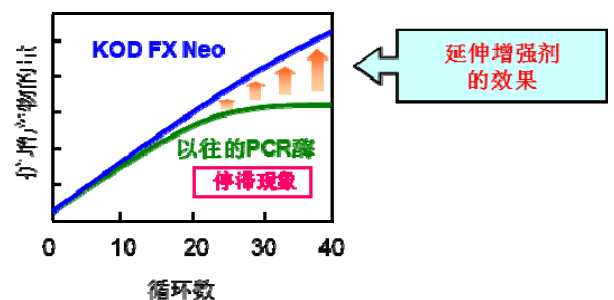
使用经纯化的模板时，延伸速度可达 30 sec./ kb，可更迅速地对长片段进行 PCR。

*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。

3. 可对含细胞壁的微生物直接 PCR

可对酵母、线状菌、真菌等过去难以直接扩增的样品直接进行 PCR。

图1 延伸增强剂的效果



4. 高保真性

本酶保真性约为 Taq DNA Polymerase 的 11 倍 [参考 p12.4]。适用于 PCR 产物在载体上进行克隆后再测序时的实验。

◆ 产品组成

	KFX-201(200U × 1)	KFX-201B
KOD FX Neo (1.0 U/μl)	200 μl × 1 支	(KFX-201) × 5
2 × PCR Buffer for KOD FX Neo	1.7 ml × 3 支	
2 mM dNTPs	1 ml × 2 支	

◆ 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 FX Neo 均对人基因组 DNA 模板 β -globin 基因内 32.0 kb 片段进行扩增确认实验后再销售。

【2】 PCR 实验步骤

请注意：引物条件和循环条件与原来的 KOD FX 有所不同。

(1) 引物设计

- 请尽量使用 22~35mer (Tm 值* > 63°C) 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 或可提高引物与模板的结合(Priming) 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°C 以上的引物。使用 25mer 以上 (Tm 值 ≥ 65°C) 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	X μl	
2 × PCR Buffer for KOD FX Neo	25 μl	1 ×
2 mM dNTPs	10 μl	0.4 mM each
引物 (10 μM each)	0.75~1.5 μl	0.15~0.3 μM each
模板	Y μl	{ Genomic DNA ~200 ng/50 μl Plasmid DNA ~50 ng/50 μl cDNA ~200 ng/50 μl 活体样品·粗抽提液 ~5 μl/50 μl
KOD FX 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，引物浓度请用 **0.3 μM**（终浓度）。扩增 **10 kb** 以上的长链片段时，将引物浓度设定为 **0.15 μM**（终浓度）可提高扩增量。

(3) 模板

a. 使用纯化后的模板、cDNA时，添加量请参照下列数据（PCR反应液为**50 μl**时）。

		一般情况下模板量	
Genomic DNA	真核生物来源DNA	5~200 ng	50 ng
	原核生物来源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)
λ DNA		10 pg~10 ng	1 ng

- 模板的长度和纯度会对 PCR 结果产生很大的影响。模板量有多余的情况下，建议事先进行电泳以确认模板质量。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，逆转录反应液中过剩的 RNA 会抑制 PCR 反应。**50 μl** 的 PCR 反应液中添加的逆转录反应液量其 RNA 量请控制在 **200 ng** 以下。
- 不可使用含尿嘧啶的模板。

b. 直接将活体组织等样品添加到PCR反应液中时，添加量请参照如下数据（PCR反应液为**50 μl**时）。

	一般情况下模板量	备注
大肠杆菌	用接种针挑少许即可	
酵母	用接种针挑少许即可	
丝状菌（filamentous fungi）	用接种针挑少许即可	无法获得稳定的扩增时，可将丝状菌放入 50 μl 的TE中悬浊，再取 2~5 μl 作为模板使用即可获得稳定的结果。
培养细胞	$10^1 \sim 10^5$ cells	
血液	1~2 μl	
指甲	约米粒的1/3大小	由于抽提的DNA量很少，需 × 35~40 循环扩增。
头发	1~2 cm	
植物叶	2 mm 小块	
精米	约米粒的1/5大小	
小鼠尾巴	1 mm 左右	琼脂糖凝胶电泳中，PCR产物的一部分有可能会残留在孔内*。

*小鼠尾巴等动物组织直接扩增时，琼脂糖凝胶电泳中，DNA 片段有可能残留在孔内而无法泳动到目

的位置。建议每 $50\ \mu\text{l}$ 的 PCR 产物添加 $20\ \text{mg/ml}$ Proteinase K $10\ \mu\text{l}$ 后再进行电泳。

c. 用活体样品等的裂解液进行扩增时，请用以下的方法配制裂解液再进行 PCR。裂解液在 $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下可保存数周（长期保存需在 $-20\ ^\circ\text{C}$ 条件下）。（需对样品进行多次探讨时，建议配制裂解液再进行扩增，以保证样品的均质性。）

※根据活体样品的不同裂解液的配制方法有所差异，请参照如下。

动物组织 \Rightarrow ①碱裂解法 or ③Proteinase K 处理法

植物组织 \Rightarrow ②一步法 or ③Proteinase K 处理法

①碱裂解法（动物组织裂解液配制）

活体样品（添加量请参照右图）

↓ $\leftarrow 50\ \text{mM NaOH}$ $180\ \mu\text{l}$

↓ Vortex 充分振荡

↓ $95\ ^\circ\text{C}$, 10 min. 温育

↓ $\leftarrow 1\ \text{M Tris-HCl}$ (pH 8.0) $20\ \mu\text{l}$

↓ Vortex 充分振荡

↓ 离心 $12,000\ \text{rpm}$, 5 min.

上清（模板） \Rightarrow 取 $0.5\sim 2\ \mu\text{l}$ 添加到 $50\ \mu\text{l}$ PCR 反应液中

活体样品例

小鼠尾巴 $\Rightarrow 3\ \text{mm}$ 左右

指甲 $\Rightarrow 5\ \text{mg}$ 左右

※微量活体样品的情况下，请调整添加的 NaOH 量。

（例：头发 $1\ \text{cm}$ 左右用 $50\ \text{mM NaOH}$ $18\ \mu\text{l}$ 、 $1\ \text{M Tris-HCl}$ (pH 8.0) $2\ \mu\text{l}$ 。）

②一步法（植物组织裂解液配制）

活体样品（添加量请参照右图）

活体样品例
烟草叶 ⇒ 3 mm 小块
精米 ⇒ 1 粒

↓ ←溶解 Buffer 100 μ l

↓ 100mM Tris-HCl (pH9.5)
1M KCl
↓ 10mM EDTA

↓ Vortex 充分振荡

↓ 95°C, 10 min. 温育

↓ Vortex 充分振荡

↓ 离心 12,000 rpm, 5 min.

上清（模板） ⇒ 取 0.5~2 μ l 添加到 50 μ l PCR 反应液中

③Proteinase K 处理法

活体样品（添加量请参照右图）

活体样品例
小鼠尾巴 ⇒ 3 mm 左右
指甲 ⇒ 5 mg 左右
烟草叶 ⇒ 3 mm 小块
精米 ⇒ 1 粒

↓ ←Proteinase K 溶解 Buffer 100~200 μ l

↓ 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)
5 mM EDTA
↓ 400 mM NaCl
0.3% SDS
↓ 200 μ g/ml Proteinase K

↓ Vortex 充分振荡

↓ 55°C, 60 min. 以上温育

↓ 95°C, 5 min. 温育

↓ (55°C, over night 情况下, 也可以不进行热失活)

↓ Vortex 充分振荡

↓ 离心 12,000 rpm, 5 min.

上清（模板） ⇒ 取 0.5~2 μ l 添加到 50 μ l PCR 反应液中

※裂解液配制可在 96 孔 PCR 板内进行。

下例为小鼠尾巴的裂解液（碱裂解法）的配制方法。

将小鼠尾巴 (3 mm 左右) 放入 96 孔 PCR 板

↓ ←加入 50 mM NaOH 180 μ l、盖上盖子 Vortex 充分振荡

↓ spin down (轻轻振荡使液体落下即可)

↓ 95°C, 10 min.温育 (用 PCR 仪)

↓ ←加入 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 20 μ l、盖上盖子 Vortex 充分振荡

↓ spin down (轻轻振荡使液体落下即可)

上清 (模板) ⇒ 取 0.5~2 μ l 添加到 50 μ l PCR 反应液中

※小鼠尾巴切片时, 请浸入碱溶液再切。

※接触热碱性溶液时, 请十分注意。

※处理后, 小鼠尾巴不会也无需完全溶解。小鼠尾巴表面溶解即可。

(4) PCR 循环条件

由于 KOD FX Neo 的循环基本上是两步法, 因此条件的设定非常简单。引物的 T_m 值未满足 68°C, 或用两步法无法确认到扩增的情况下, 请尝试三步法。此外, 进行 10 kb 以上片段扩增的 Long PCR、出现特异性条带或弥散等情况时, 请尝试 Step down。

(请注意与 KOD FX 有所差异。)

a. 两步法循环

	纯化后DNA·cDNA的扩增	粗样品的扩增
Pre-denature :	94°C, 2 min.	94°C, 2 min.
Denature :	98°C, 10 sec. ← 25~45 cycles	98°C, 10 sec. ← 25~45 cycles
Extension :	68°C, 30 sec./ kb	68°C, 60 sec./ kb

· 扩增粗样品时, 延伸 (Extension) 时间请按目的片段长度 60Sec./kb 设定。以纯化后的 DNA、plasmid 为模板时, 30 sec./kb 可充分扩增。

· 可预想到目的片段的拷贝数较少, 或扩增 10 kb 以上片段时设定为 60Sec./kb, 可能会增加扩增量。另外, 把循环数增加到 30~45 个循环也可确认到扩增。

· DNA 变性 (Denature) 设定为 94°C, 15 sec. 可增加目的片段的扩增量。高 GC 含量片段变性条件请设定为 98°C, 10 sec.。

b. 其他循环

用两步法循环无法确认到扩增的情况下，请尝试三步法。进行 10 kb 以上片段扩增的 Long PCR、出现特异性条带或弥散等情况时，请尝试 Step down。

三步法循环

	纯化后DNA·cDNA的扩增	粗样品的扩增
Pre-denature :	94°C, 2 min.	94°C, 2 min.
Denature :	98°C, 10 sec.	98°C, 10 sec.
Annealing :	(Tm)°C, 30 sec.	(Tm)°C, 30 sec.
Extension :	68°C, 30 sec./ kb	68°C, 60 sec./ kb
	} 25~45 cycles	} 25~45 cycles

- 退火温度请按引物的Tm值设定。

Step down循环

	纯化后DNA·cDNA的扩增	粗样品的扩增
Pre-denature :	94°C, 2 min.	94°C, 2 min.
Denature :	98°C, 10 sec.	98°C, 10 sec.
Extension :	74°C, 30 sec./ kb	74°C, 60 sec./ kb
Denature :	98°C, 10 sec.	98°C, 10 sec.
Extension :	72°C, 30 sec./ kb	72°C, 60 sec./ kb
Denature :	98°C, 10 sec.	98°C, 10 sec.
Extension :	70°C, 30 sec./ kb	70°C, 60 sec./ kb
Denature :	98°C, 10 sec.	98°C, 10 sec.
Extension :	68°C, 30 sec./ kb	68°C, 60 sec./ kb
Extension :	68°C, 7 min.	68°C, 7 min.
	} 5 cycles	} 5 cycles
	} 5 cycles	} 5 cycles
	} 5 cycles	} 5 cycles
	} 15 ~ 30 cycles	} 15 ~ 30 cycles

▪ 扩增粗样品时，延伸（Extension）时间请按目的片段长度 60Sec./kb设定。以纯化后的DNA、plasmid为模板时，30 sec./kb可充分扩增。

▪ 可预想到目的片段的拷贝数较少，或扩增10 kb以上片段时设定为60Sec./kb，可能会增加扩增量。另外，把循环数增加到30~45个循环也可确认到扩增。

▪ DNA变性（Denature）设定为94°C, 15 sec.可增加目的片段的扩增量。高GC含量片段变性条件请设定为98°C, 10 sec.。

【3】 进行试验的注意事项

1. 为了保证 PCR 顺利进行

- 反应用离心管请尽量使用薄壁管 (thin-wall type)。同时, 推荐 PCR 反应液为 total 50 μ l。
- 灭菌水、引物请事先分装成小份保存, 建议每次实验都使用完。
- dNTPs 请务必使用本品中添附的组分, 或用本公司单独销售的「dNTPs Mixture (2 mM) (Code No. NTP-201)」。

2. PCR 产物的克隆

- 用本酶扩增的 PCR 产物末端为平滑末端。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 产物末端磷酸化后再进行平滑末端克隆。

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)」。

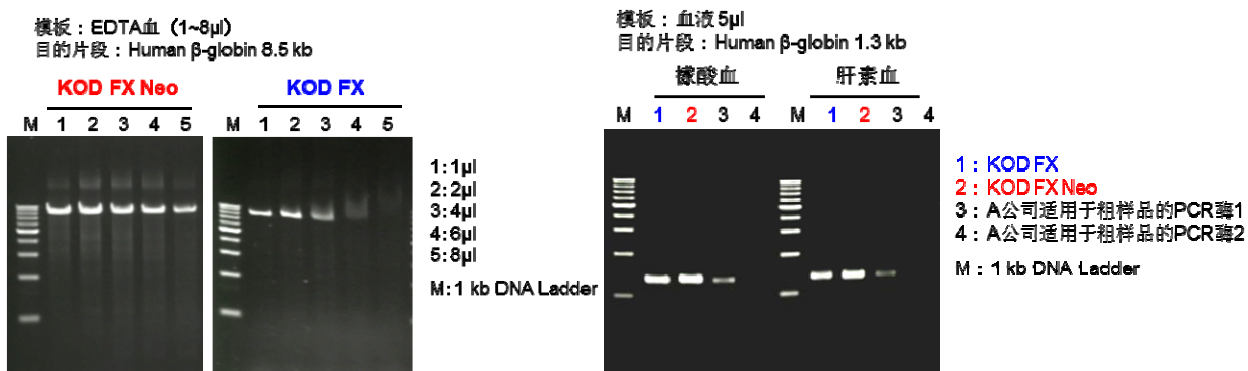
【4】 性能数据

1. 粗样品扩增例比较

a. 血液

使用 KOD FX Neo 及 KOD FX，比较能添加到 50 μ l 反应液中的血液量（EDTA 血）。以 β -globin 基因 8.5 kb 为目的片段，按各 PCR 酶的推荐条件，进行 30 个循环。结果可见，用 KOD FX 的情况下，添加 4 μ l 血液就会抑制 PCR 反应，而用 KOD FX Neo 的情况下，即便添加了 8 μ l 血液仍能确认到扩增。同时，扩增量也大大超过 KOD FX（下面左图）。

用 KOD FX Neo 还可以扩增柠檬酸血、肝素血。在 50 μ l 反应体系中添加 5 μ l 的血液，比较 β -globin 基因 1.3 kb 的扩增结果。结果可见，用 KOD FX 和其他公司的 PCR 酶，反应受到不同程度的抑制，而用 KOD FX Neo 则可确认到充分的扩增（下面右图）。



b. 植物叶

使用烟草叶的裂解液，比较 KOD FX Neo 及 KOD FX。反应按照各 PCR 酶的推荐条件，进行了 35 个循环。结果可见，用 KOD FX 无法扩增的条件，用 KOD FX Neo 则可确认到明亮的条带（下面左图）。

用 KOD FX 系列可将植物组织、动物组织直接添加到 PCR 反应液中进行扩增。

使用 KOD FX Neo 及以往的 PCR 酶，向 50 μ l 反应液中添加 2mm 的烟草叶小块，比较

各种长度目的片段的扩增。结果可见，用其他公司 PCR 酶无法确认到扩增，而用 KOD FX、KOD FX Neo 则可确认到充分的扩增。而且，相比 KOD FX，用 KOD FX Neo 的扩增量更多（下面右图）。

模板：烟草叶裂解液（一步法） 1 μ l

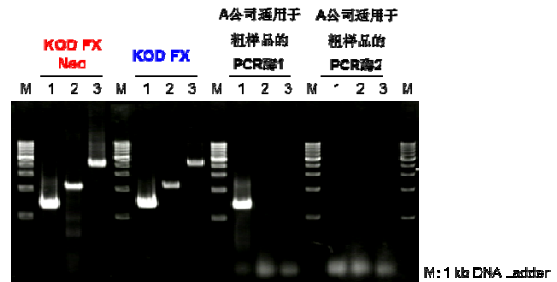
目的片段：ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase large subunit N-methyltransferase gene (rbcm1T)



模板：烟草叶2mm小片

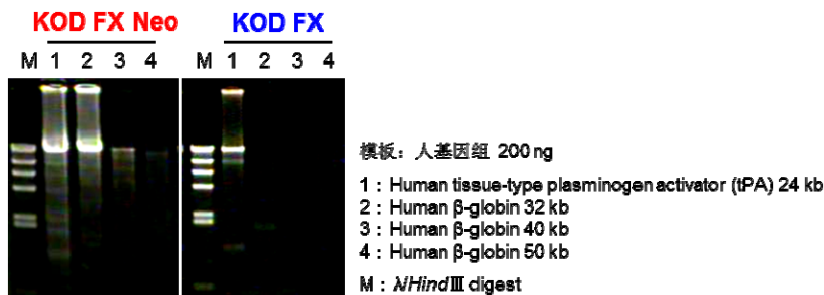
目的片段

1: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase large subunit gene (rbcl) 1.3 kb
2: ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase / oxygenase large subunit N-methyltransferase gene (rbcm1T) 2.2 kb
3: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase large subunit N-methyltransferase gene (rbcm1T) 4.6 kb



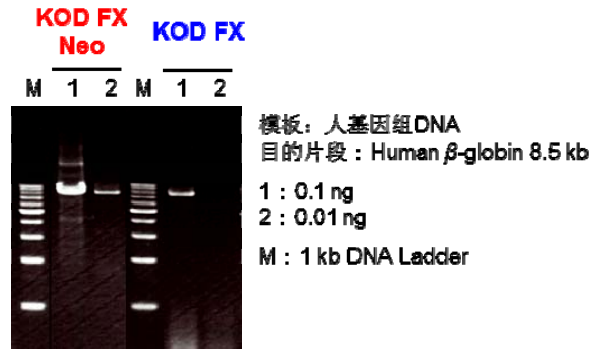
2. 延伸性

使用 KOD FX Neo 及 KOD FX，以人基因组 DNA 为模板，扩增长链目的片段。反应选用 Step down。结果可见，用 KOD FX Neo 可确认到 40 kb 的扩增。

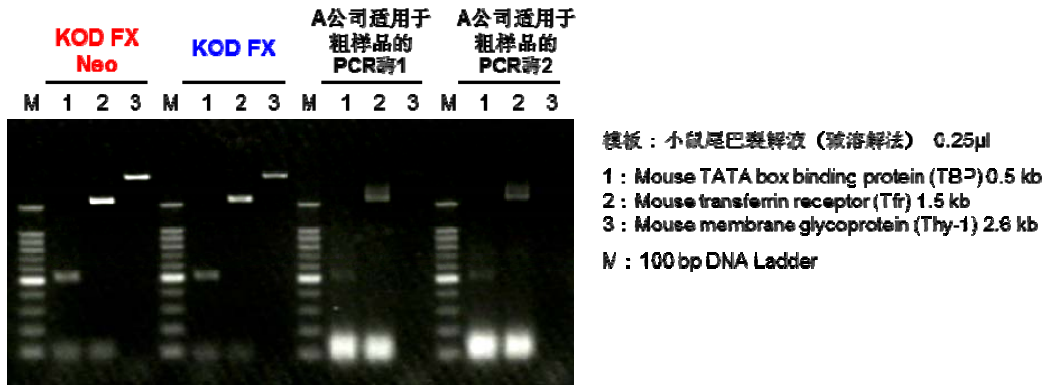


3. 扩增效率 · 检测灵敏度

KOD FX Neo 中由于添加了独有的延伸增强剂，可使反应持续时间更长。因此，可通过增加循环数扩增微量模板。以各种量的人基因组 DNA 为模板，对 β -globin 基因 8.5 kb 进行 40 个循环的扩增，比较 KOD FX Neo 及 KOD FX 的扩增量。结果可见，KOD FX Neo 的扩增量高于 KOD FX，可对更少的模板量进行扩增。

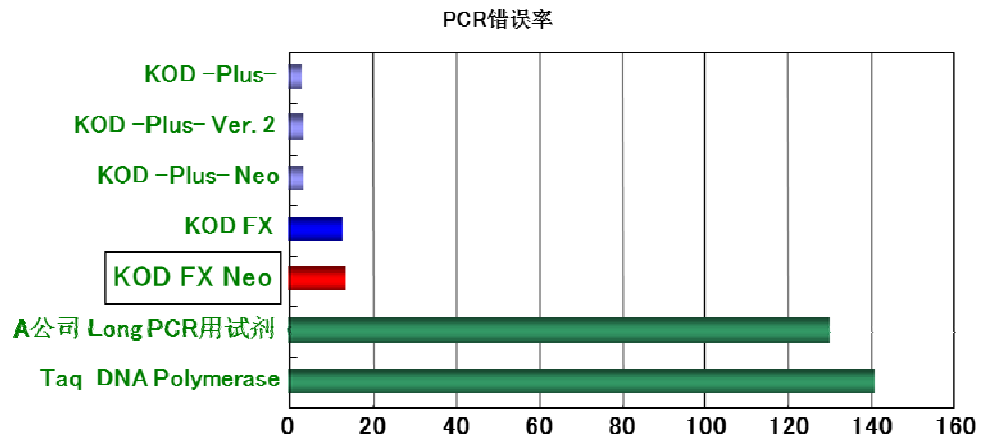


用粗样品也可得到同样的结果。使用 KOD FX Neo 及以往的 PCR 酶，扩增小鼠尾巴裂解液等各种长度的目的片段并比较。结果可见，KOD FX Neo 的扩增量高于 KOD FX，而且用其他公司 PCR 酶无法扩增的微量模板，用 KOD FX Neo 可确认到明亮的条带。



4.保真性

以人基因组 DNA 为模板，扩增 β -globin 基因，PCR 产物用「TARget Clone -Plus- (Code No. TAK-201)」进行 TA 克隆。然后，将克隆得到的质粒纯化后再进行测序，确认序列。结果可见，KOD FX Neo 显示了与 KOD FX 同等的保真性。该保真性约为 Taq DNA Polymerase 的 11 倍。

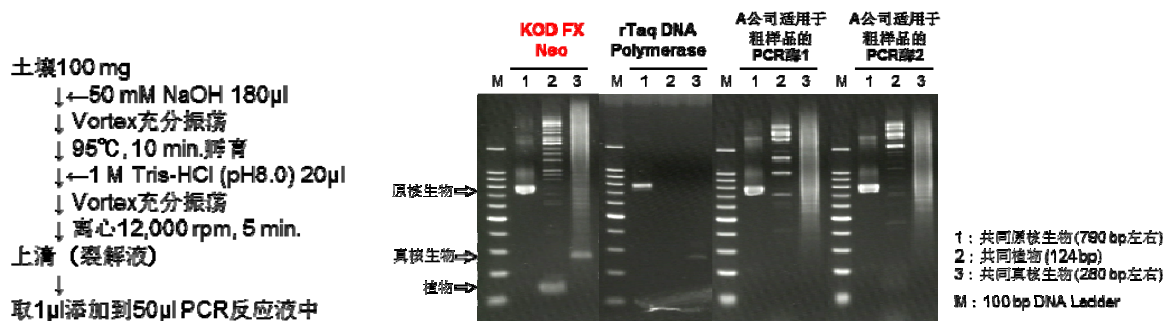


【5】 实验例

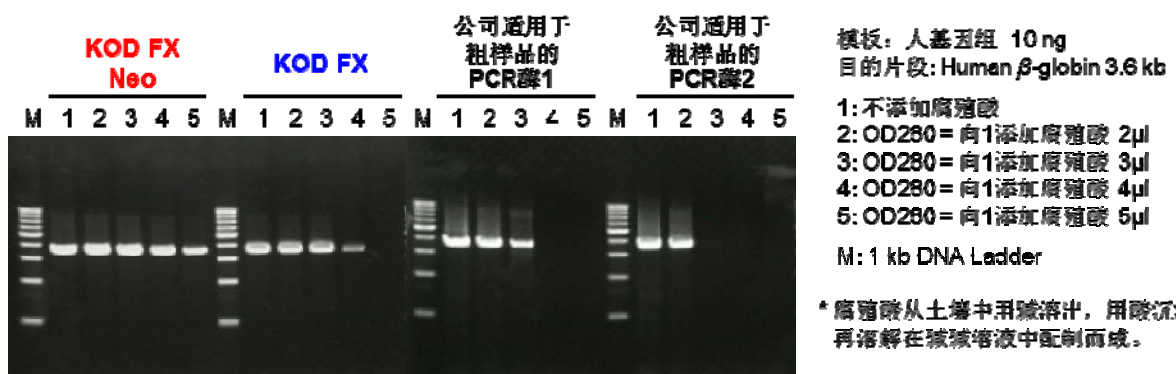
■ 实验例 1 土壤的扩增

土壤的处理方法一般有使用 Proteinase K 等方法。这里，介绍一个碱裂解法的应用例（碱裂解法在活体组织的前处理中非常有效）。

土壤 100 mg 用碱裂解法处理后，取上清 1 μ l，检测土壤里含有的微生物、植物基因等。结果可见，只有 KOD FX Neo 能确认到所有的扩增。

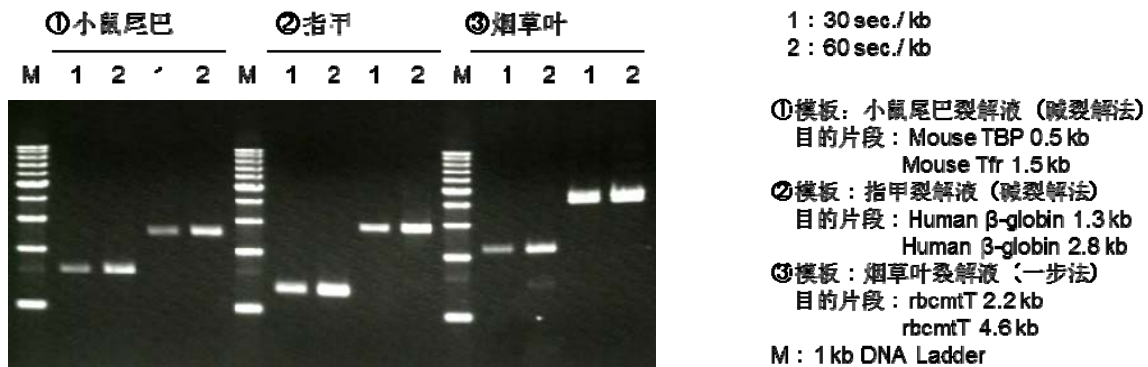


土壤里存在的“腐殖酸”是抑制 PCR 的物质，这种腐殖酸用通常的 DNA 抽提无法去除。相比以往的 PCR 酶，KOD FX Neo 可最大程度地对抗腐殖酸的抑制作用，可扩增土壤等粗样品。



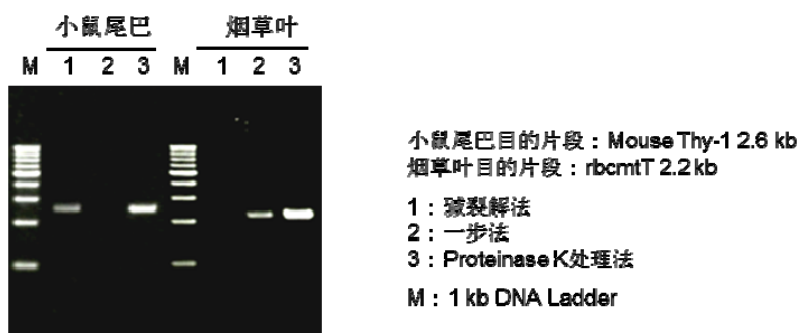
■实验例 2 延伸时间的探讨

分别以延伸时间 30 sec./ kb 和 60 sec./ kb 扩增各种粗样品基因。结果可见，60 sec./ kb 扩增量更多。因此，扩增粗样品时，建议延伸时间设定为 60 sec./ kb。



■实验例 3 裂解液配制方法的探讨

用小鼠尾巴、烟草叶，比较各种裂解液的配制方法。结果可见，小鼠尾巴裂解液最好用碱裂解法和 Proteinase K 处理法，而烟草叶最好用一步法和 Proteinase K 处理法。建议动物组织裂解液配制用碱裂解法或 Proteinase K 处理法，植物组织裂解液配制用一步法或 Proteinase K 处理法。尤其是碱裂解法和一步法更为迅速。扩增量少的时候，也通过增加循环数加以改善。



【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 60 sec./ kb。 〔参考实验例 2〕
		增加 2~5 个循环。
		用三步法。 用三步法时退火温度降为 $T_m-5\sim T_m-10^\circ\text{C}$ 。
		用 Step down 循环（特别是对 10 kb 以上的长链目的片段特别有效）。
	确认使用模板的量 and 品质（特别要确认模板是否被 RNA 等污染）。	增加模板量。
		为减少抑制物质的影响，减少模板量。
		探讨模板的配制法。 〔参考实验例 3〕
		纯化模板。
		为减少 RNA 带来的抑制作用，减少 cDNA 样品的量。
	确认使用引物的量、品质。	降解或除去 RNA。
		引物浓度从 $0.3\ \mu\text{M}$ 降为 $0.15\ \mu\text{M}$ （终浓度）（特别是对 10 kb 以上的长链目的片段特别有效）。
		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。
出现弥散、杂带现象时。	改变循环条件。	原先用三步法时改为两步法。
		原先用两步法时改为 Step down 循环。
		减少 2~5 个循环数。
	确认使用模板的量。	减少模板量。
	确认使用引物的品质。	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）。
减少酶的使用量。	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 FX 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.
<KOD FX Neo 用 PCR Buffer> 2 × PCR Buffer for KOD FX Neo	1.7 ml × 1 (65 次份)	KFX-2B
<高成功率 PCR 酶> KOD FX	200 U × 1 (200 U × 1) × 5 (200 U × 1) × 10	KFX-101 KFX-101B KFX-101C
<高保真性 PCR 酶> KOD -Plus-	200 U × 1 (200 U × 1) × 5	KOD-201 KOD-201 B
<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-211 B
<高保真 · 高效率 · 高速 PCR 酶> KOD -Plus- Neo	200 U × 1 (200 U × 1) × 5	KOD-401 KOD-401 B
<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

[销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司

地址：上海市浦东新区张杨路 500 号华润时代广场 28 楼 AL

邮编：200122

订购 • 技术相关咨询

Tel:021-5879-4900 Fax:021-5879-4901

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

<http://www.bio-toyobo.cn>

[生产商]

东洋纺株式会社敦贺生物工厂

地址：日本国福井县敦贺市东洋町 10 番 24 号

代理商资料: