



KOD One™ PCR Master Mix

(Code No. KMM-101S, KMM-101)

KOD One™ PCR Master Mix -Blue-

(Code No. KMM-201S, KMM-201)

中文说明书

科研用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

目 录

[1]简介.....	1
[2]PCR 实验步骤.....	2
[3]PCR 产物的克隆.....	6
[4]性能数据.....	6
[5]实验例.....	10
[6]Trouble Shooting.....	12
[7]相关产品.....	13

—注意—

本试剂盒中所含的试剂均为科研用试剂。

请勿作为诊断、临床试剂使用。

在使用本试剂盒时，请严格遵守实验室的一般注意事项，注意安全。

—保存—

各组分请均保存于-20℃条件下。

[1]简介

KOD One™ PCR Master Mix / KOD One™ PCR Master Mix -Blue- 是含有改良型 KOD DNA polymerase (UKOD) 的 PCR 用 2×Master Mix。

在具有高保真性·高扩增效率的改良型 KOD DNA polymerase (UKOD) 中, 通过引入延伸增强技术, 在维持高保真性的同时, 实现了延伸时间 5 sec./ kb 的高速 PCR。此外, 在兼具高成功率的同时, 对粗样品、含尿嘧啶的模板以及使用含次黄苷 (dI) 或尿嘧啶 (dU) 引物的模板也可以进行扩增。

本品含有能抑制 Polymerase 活性与 3'→5' Exonuclease 活性的两种抗体, 可进行高特异性的热启动 PCR。本品分为不含 Loading Dye 的标准型 2×Master Mix (KOD One™ PCR Master Mix; Code No. KMM-101) 和含有 Loading Dye (BPB) 的 2×Master Mix (KOD One™ PCR Master Mix -Blue-; Code No. KMM-201)。

- 特征 -

● 可进行高速 PCR

扩增 1 kb 以下的目的片段时, 延伸时间可设为 1 sec.。扩增 1~10 kb 的目的片段时, 延伸时间可设为 5 sec./1 kb。相比以往试剂可大幅度缩短 PCR 的反应时间。也可将延伸时间设得更长, 从而可以在同一循环内扩增多种长度的目的片段。

● 简便

本试剂中包含所有除引物、模板以外的其他 PCR 组分, 便于操作的同时也提高了实现结果的重现性。另外, KOD One™ PCR Master Mix -Blue- (Code No. KMM-201) 中含有 Loading Dye (BPB), 反应结束后, 可直接点样进行凝胶电泳。

● 高保真性

KOD One™ 系列产品的保真性约为 Taq DNA polymerase 的 80 倍 (与 KOD -Plus- 系列相同)。长目的片段也可以迅速且高保真性地扩增。以人基因组 DNA 为模板可扩增 40 kb 的片段, 扩增产物可用于多种用途。

● 可扩增粗样品

因添加了延伸增强剂, 提高了扩增效率, 对于含有 PCR 抑制物的粗样品 (组织样品、土壤提取物、食品等) 可以省去核酸提取步骤, 直接进行目的基因的扩增。

● 含有次黄苷、尿嘧啶的引物和模板

常规高保真性 PCR 酶会将次黄苷或尿嘧啶识别为碱基的错配, 并且阻碍反应进行。本品使用不受次黄苷或尿嘧啶影响的改良型 KOD DNA polymerase (UKOD), 可以进行该种类型的扩增。

- 组成 -

KOD One™ PCR Master Mix	KMM-101*	1 ml ×5 支
	KMM-101S	0.25 ml ×1 支
KOD One™ PCR Master Mix -Blue-	KMM-201*	1 ml ×5 支
	KMM-201S	0.25 ml ×1 支

*50 µl 反应体系，可使用 200 次。

- 均为含有反应 Buffer、dNTPs、Mg²⁺、聚合酶及聚合酶抗体的 2×Master Mix。
- KOD One™ PCR Master Mix -Blue-中含有 Loading Dye (BPB)，反应结束后，可直接进行凝胶电泳。
- 产品购买后，请于-20℃冷冻保存。使用前请完全溶解并混合均匀，长期不使用时，请放于-20℃冻结保存。经测试，该试剂可在 2~8℃保存 1 个月，反复冻融 20 次以内对品质无影响。

- 安全事项 -

本品为研究用试剂。请勿作为诊断及临床检测用试剂使用。另外，使用本品时，请严格遵守实验室一般注意事项，注意安全。做相关实验时，要考虑试剂中可能的对人体有害的成分。请遵照各试剂中附带的注意事项以及仪器·器具的使用说明书，必要时，可使用适当的保护工具。

- 性能·品质 -

KOD One™ PCR Master Mix / KOD One™ PCR Master Mix -Blue- 的各批次产品均进行以下试验并检测通过：延伸时间设定为 50 sec，以人基因组 DNA 为模板扩增 10 kb 片段。

[2]PCR 实验步骤

1. 引物的设计

- 请尽量使用长度在 22~35 个碱基 (Tm 值>63℃) 的引物*1*2*3，GC 含量在 45~60%。
- 请确定引物中 GC 的分布情况。GC 偏向于 3'端区域时，容易出现弥散或非特异性条带。所以请尽量使靠近 5'侧的序列中 GC 含量为 60~70%，3'侧的 GC 含量为 40~50%，从而提高扩增特异性。
- 3'末端有 G 或 C 时，可提高引物效率。但如上所述，3'末端 GC 含量偏高时，容易出现弥散及非特异性条带，请留意。
- 设计时请尽量避免二级结构及二聚体的产生。
- 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℃) 的引物时，可提高扩增成功率。
- 可以使用以往高保真性 PCR 酶不能使用的含次黄苷或尿嘧啶的引物进行扩增，还可扩增亚硫酸氢盐处理过的模板 DNA*4。宏基因组相关实验也可以使用本产品。

*1. 引物Tm值的计算方面，请使用最邻近碱基对法 (Nearest Neighbor method)。本说明书中的引物的Tm值，是按Na⁺浓度50mM、引物浓度0.5 µM计算的。本公司根据最邻近碱基对法 (Nearest Neighbor method) 制作了用于计算Tm的工具。可以从公司网站 (<http://bio-toyobo.cn>) 上产品资料页中找到相关链接。

*2. 最邻近碱基对法 (Nearest Neighbor method) 计算Tm值的方法不能直接用在含次黄苷的引物上。与计算含错配碱基的引物相同，去除次黄苷序列后再计算大致Tm值，然后设计实验进行最适条件的优化。

*3. 计算含有尿嘧啶引物的Tm时，请将U转换为T后再进行计算。

*4. 针对亚硫酸氢盐处理后的序列，首先请遵从一般性的引物设计原则。推荐利用专门的设计工具，比如免费的在线工具MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 等。

2. PCR 反应液的制备

反应液制备前，请将试剂完全融解、混匀后再使用。

组分	体积	终浓度
灭菌水	X μ l	
KOD One™ PCR Master Mix	25 μ l	1×
引物 (10 μ M each)	1.5 μ l	0.3 μ M each
模板	Y μ l	Genomic DNA ~200 ng / 50 μ l Plasmid DNA ~50 ng / 50 μ l cDNA (RNA 相当量) ~750 ng / 50 μ l 活体样本·粗抽提液 ~5 μ l / 50 μ l
总体积	50 μ l	

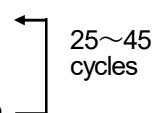
*1. 组分添加完后请混合均匀后再放置于PCR仪里。

*2. 引物浓度推荐为0.3 μ M (终浓度)，但扩增10 kb以上的长片段时，引物浓度为0.15 μ M (终浓度) 时可提高扩增产物量。另外，检测灵敏度较差时，将引物浓度提高至0.5 μ M (终浓度) 可能会有改善。

3. PCR 循环条件

为验证合适的退火温度，推荐使用三步法循环：

<三步法循环>

变性	98°C, 10 sec.	 25~45 cycles
退火	($T_m - 5$)°C, 5 sec.	
延伸	68°C, 1~10 sec./ kb	

延伸时间请根据目的片段长度参考以下方法进行设定：

目的片段长度	建议延伸时间
1 kb以下	1 sec* ¹
1~10 kb	5 sec / kb* ²
10 kb	10sec / kb

*1. 有些PCR仪器可能无法设定为1 sec.的延伸时间。扩增量少时，请设定为5 sec.

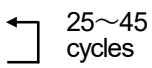
*2. 如果模板起始量较少或用粗样品进行扩增时，请按10 sec./kb进行设定。

退火 (Annealing) 温度请按引物的 $T_m - 5$ °C进行设定。 $T_m - 5$ °C超过68°C时，请按68°C设定。

DNA变性 (Denaturation) 推荐98°C, 10 sec.。94°C进行变性时，请设为15 sec.。

三步法循环有非特异性条带或弥散时，请尝试两步法或Step down方法。可能会提高扩增特异性和检测灵敏度。

<两步法循环>

变性	98°C, 10 sec.	 25~45 cycles
延伸	68°C, 5~10 sec./ kb	

<Step down循环>

变性	98°C, 10 sec.	5 cycles
延伸	74°C, 5~10 sec./ kb	
变性	98°C, 10 sec.	5 cycles
延伸	72°C, 5~10sec./ kb	
变性	98°C, 10 sec.	5 cycles
延伸	70°C, 5~10 sec./ kb	
变性	98°C, 10 sec.	15~30 cycles
延伸	68°C, 5~10 sec./ kb	

进行两步法或Step down方法时，延伸时间请参考三步法进行设定，目的片段长度在1 kb以下时，请设定为5 sec。

4. 模板添加量

a. 使用提纯的模板、cDNA时，请按照下表进行添加。

(50 µl反应体系)

模板来源	添加量范围	推荐的模板量
真核生物的gDNA	1~200 ng	50 ng
原核生物的gDNA	0.1~200 ng	10 ng
Plasmid DNA	1 pg~50 ng	10 ng
cDNA	1 ng~750 ng (RNA相当量)	50 ng (RNA相当量)
λ DNA	10 pg~10 ng	1 ng

模板的长度或纯度对 PCR 结果有很大的影响。模板起始量多时，推荐预先进行电泳确认模板质量。RNA 混入量较多时，可能会抑制 PCR 反应。

使用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。请确保 50 µl PCR 反应液中 RNA 的量小于 750 ng。

b. 直接向PCR反应液中添加组织样本时，请按以下参考值进行添加。

(50 µl反应体系)

物种	推荐的的模板量	备注
大肠杆菌	用枪头取少许	不能得到稳定扩增时，用50 µl的TE Buffer制成悬浊液，取2~5 µl当模板，可以得到稳定的结果。
酵母	用枪头取少许	
丝状菌	用枪头取少许	
培养细胞	10 ¹ ~10 ⁵ cells	因为提取的DNA量较少，有必要扩增35~45个循环。
血液*	1~2 µl	
指甲	1/3米粒大小	
头发	1~2 cm	
植物叶片	2 mm小块	
精米	1/5米粒大小	
鼠尾	1 mm左右	

* 血液抗凝剂可能会对 PCR 有抑制。采集血液样本时，请使用 EDTA 采血管、柠檬酸采血管。

* 直接扩增鼠尾等动物组织时，用凝胶电泳将 DNA 片段从胶孔中回收时，有时不能得到正确大小的目的条带。此时可以在 50 µl PCR 产物中添加 10 µl 的 20 mg/ml Proteinase K。

- c. 使用活体样本进行扩增时, 请使用以下方法制备 PCR 用裂解液。将组织样本捣碎得越彻底, 越可能提高抽提效率。组织或叶片等柔软的样本推荐在溶液中使用 Pestle 等进行粉碎, 指甲、种子等坚硬的样本可先用研钵或锤子等粉碎后再进行处理。裂解液可在 4°C 保存数周 (长期保存时, 请储存在 -20°C)。想多次使用样品时, 推荐制备裂解液。

活体样本不同, 裂解液制备方法也不同。请参考以下方法。

动物组织 ⇒ ① 碱裂解法 或者 ③ Proteinase K 处理法

植物组织 ⇒ ② 一步法 或者 ③ Proteinase K 处理法

① 碱裂解法 (动物组织裂解液的制备)

活体样本 (添加量请参考右图示)

- ↓ ←50 mM NaOH 180 μl
- ↓ 用 Vortex 充分混匀
- ↓ 95°C, 10 min. 温育
- ↓ ←1 M Tris-HCl (pH 8.0) 20 μl
- ↓ 用 Vortex 充分混匀
- ↓ 离心 12,000 rpm, 5 min.

上清 (模板) ⇒ 50 μl 的 PCR 反应液中请添加 0.5~2 μl 的模板。

微量活体样本请调整添加 NaOH 的量。

(例如: 头发 1cm 左右, 请用 50 mM NaOH 18 μl、1M Tris-HCl (pH 8.0) 2 μl 进行处理。)

② 一步法 (植物组织裂解液的制备)

活体样本 (添加量请参考右图)

- ↓ ←溶解 Buffer 100 μl*
- ↓
- ↓
- ↓
- ↓ 用 Vortex 充分混匀
- ↓ 95°C, 10 min. 温育
- ↓ 用 Vortex 充分混匀
- ↓ 离心 12,000 rpm, 5 min.

溶解 Buffer 组分
100 mM Tris-HCl (pH9.5)
1 M KCl
10 mM EDTA

上清 (模板) ⇒ 50 μl 的 PCR 反应液中请添加 0.5~2 μl 的模板。

③ Proteinase K 处理方法

活体样本 (添加量请参考右图)

- ↓ ←Proteinase K 溶解 Buffer 100~200 μl
- ↓
- ↓
- ↓
- ↓
- ↓ 用 Vortex 充分混匀
- ↓ 55°C, 60 min. 以上温育
- ↓ 95°C, 5 min. 温育
- ↓ (55°C 过夜处理时, 无需高温失活)
- ↓ 用 Vortex 充分混匀
- ↓ 离心 12,000 rpm, 5 min.

溶解 Buffer 组分
(裂解液制备可用 96 孔板进行)
20 mM Tris-HCl (pH 8.0)
5 mM EDTA
400 mM NaCl
0.3% SDS
200 μg/ml Proteinase K

上清 (模板) ⇒ 50 μl 的 PCR 反应液中请添加 0.5~2 μl 的模板。

活体样本例

鼠尾 ⇒ 3 mm 左右
指甲 ⇒ 5 mg 左右

活体样本例

烟叶 ⇒ 3 mm 左右的小块
精米 ⇒ 1 粒
种子 ⇒ 1 粒

* 超声破碎可提高抽提效率。

以鼠尾为例制备裂解液（碱裂解法）的方法如下所示。

将鼠尾（3 mm 左右）放入 96 孔板中
 ↓←添加 50 mM NaOH 180 μ l， 盖上盖子用 Vortex 充分混匀
 ↓Spin down（轻轻振荡，使液体落至管底）
 ↓95°C, 10 min. 温育（使用 PCR 热循环仪）
 ↓←添加 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 20 μ l， 盖上盖子用 Vortex 充分混匀
 ↓Spin down（轻轻振荡，使液体落至管底）
 上清（模板） \Rightarrow 50 μ l 的 PCR 反应液中请添加 0.5~2 μ l 的模板。

※鼠尾切片，为了使其能浸泡到裂解液中，请进行切片处理。

※请注意热碱处理。

※处理后，鼠尾无需完全裂解。鼠尾的表面裂解即可。

[3]PCR 产物的克隆

本产品扩增的 PCR 产物的末端是 blunt end（平末端）。因此，扩增用于克隆的 PCR 产物需要使用 5' 端磷酸化修饰的引物，然后使用平端连接的方法。此外，也可以使用本公司的 KOD DNA Polymerase 用 TA 克隆试剂盒「TARget Clone™ -Plus- (Code No. TAK-201)」，直接从未纯化的 PCR 产物开始，简便地进行 TA 克隆。使用 TARget Clone™ -Plus- 的其中一个组分「10 \times A-attachment Mix (Code No. TAK-301)」，可对 PCR 产物的 3' 末端进行加 A，进而直接对任意的 T 载体进行 PCR 产物的克隆。连接反应推荐使用我公司生产的连接酶「Ligation high Ver.2 (Code No. LGK-201)」。

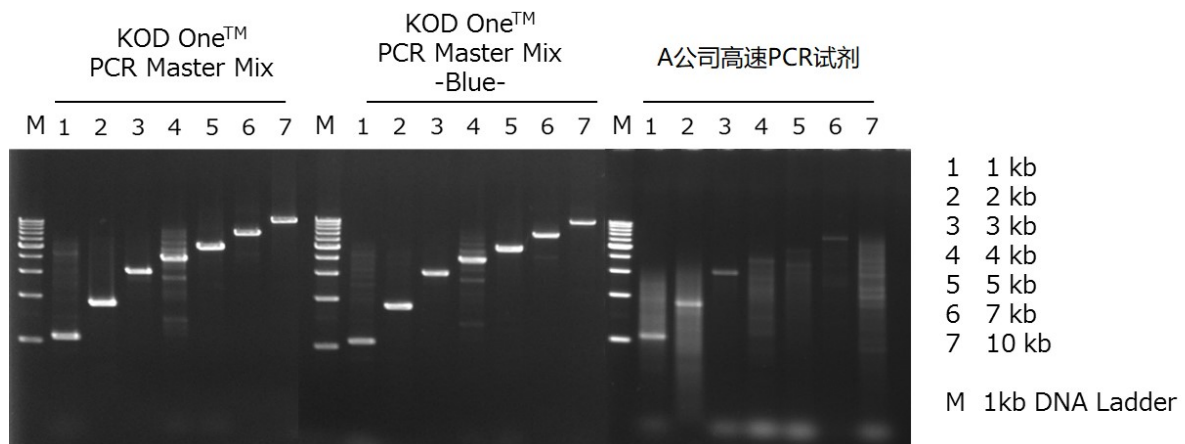
用限制性内切酶处理用本品扩增的 PCR 产物，利用粘末端进行克隆时，请对限制性内切酶处理前的扩增产物进行纯化。DNA polymerase 有残留时，该酶具有的 3'→5' Exonuclease 活性在内切酶处理时会将突出末端切掉。扩增产物的纯化，可以用苯酚/氯仿处理后，加乙醇沉淀并回收，或者利用本公司的磁珠法 DNA 纯化试剂盒「MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up- (Code No. NPK-601)」非常方便地进行纯化。

[4]性能数据

1. 高速 PCR

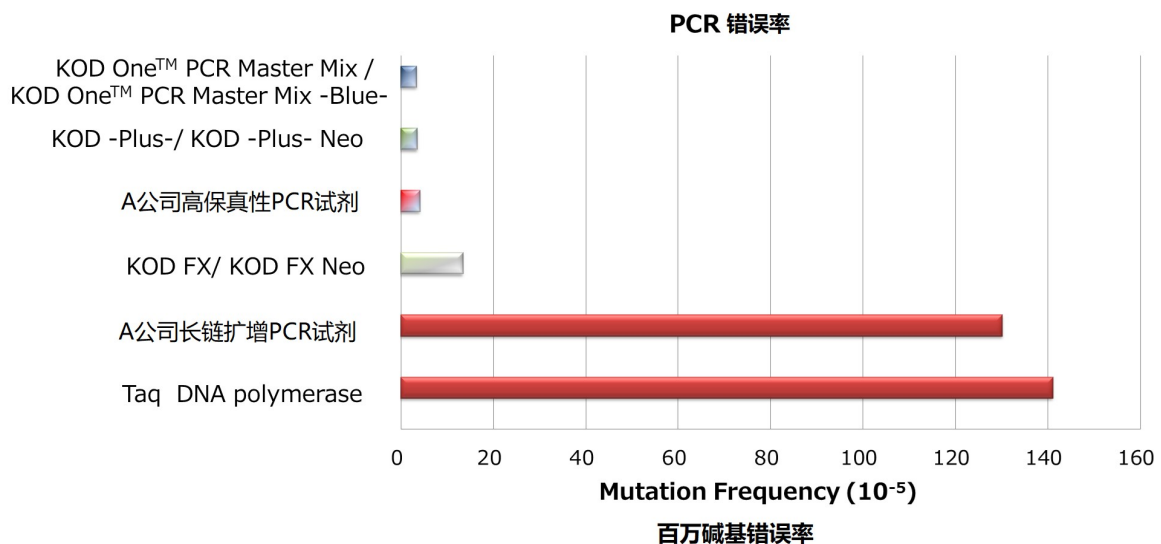
使用 KOD One™ PCR Master Mix 及 KOD One™ PCR Master Mix -Blue- 以人基因组 DNA 为模板，可进行超快速 PCR 扩增。结果显示，KOD One™ PCR Master Mix 及 KOD One™ PCR Master Mix -Blue- 扩增 1 kb 以下的目的片段时延伸时间设为 1 sec.，1~10 kb 的目的片段时按 5 sec./ kb 设定可以得到清晰的扩增条带。

<反应液>		<PCR 循环>			
		1 kb 以下的目的片段		1~10 kb 的目的片段	
灭菌水	21 μ l	98°C	10 sec	98°C	10 sec
KOD One™ PCR Master Mix	25 μ l	60°C	5 sec	60°C	5 sec
10 μ M 各引物	1.5 μ l	68°C	1 sec	68°C	5 sec./ kb
10 ng/ μ l 人基因组 DNA	1 μ l	} 30 cycles		} 30 cycles	
总体积	50 μ l				



2. 保真性

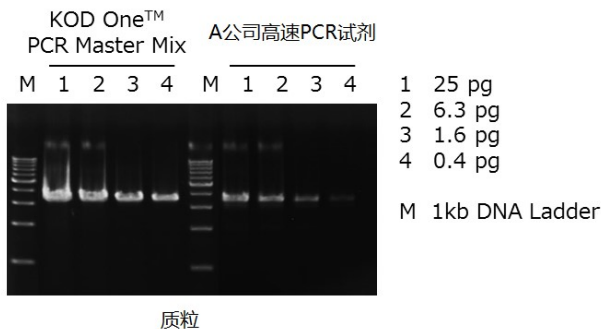
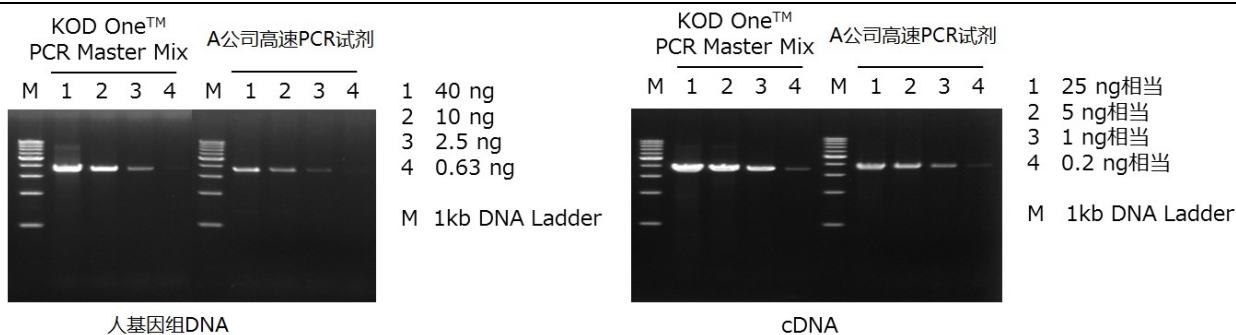
以人基因组 DNA 为模板扩增 β -globin 基因, 使用「TArget Clone™ -Plus- (Code No. TAK-201)」对 PCR 产物进行 TA 克隆。随后从各克隆中抽提 plasmid, 进行 sanger 测序并确认序列。统计结果显示, KOD One™ PCR Master Mix / KOD One™ PCR Master Mix -Blue-的保真性大约是 Taq DNA polymerase 的 80 倍。



3. 检测灵敏度

使用人基因组 DNA、cDNA、质粒, 扩增约 3.5 kb 的目的片段, 延伸时间按 5 sec./ kb 设定, 比较检测的灵敏度。反应根据各种 PCR 酶推荐的条件进行。结果显示, KOD One™ PCR Master Mix 以 5 sec./ kb 的速度扩增时, 扩增产物量也很多, 与其他公司的试剂相比, 可以扩增更低拷贝数的模板。

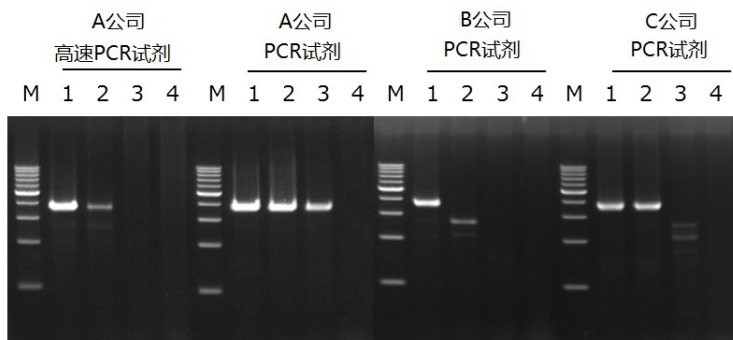
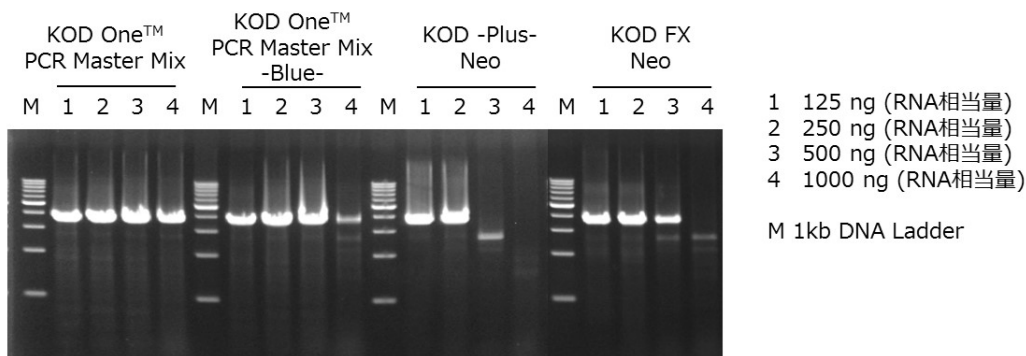
<反应液>		<PCR 循环>	
灭菌水	21 μ l	98°C	10 sec.
KOD One™ PCR Master Mix	25 μ l	60°C	5 sec.
10 μ M 各引物	1.5 μ l	68°C	18 sec.
各模板 DNA	1 μ l	} 30 cycles	
总体系	50 μ l		



4. 逆转录反应液（cDNA）的添加量

逆转录反应液中残留的RNA对PCR有抑制作用,过量添加cDNA模板会使扩增效果变差。KOD One™ PCR Master Mix 不易受RNA的抑制作用,与原来的产品及其他公司的产品相比,即使添加较多的cDNA也能得到良好的扩增。

<反应液>		<PCR 循环>	
灭菌水	17 μ l	98°C	10 sec.
KOD One™ PCR Master Mix	25 μ l	60°C	5 sec.
10 μ M 各引物	1.5 μ l	68°C	18 sec.
各 cDNA	5 μ l	} 30 cycles	
Total Volume	50 μ l		



5. 使用粗样品扩增

使用 KOD One™ PCR Master Mix, 比较血液、鼠尾裂解液（碱裂解液）的扩增结果。反应根据各 PCR 酶推荐条件进行, 延伸时间 5 sec./ kb。结果显示, 只有 KOD One™ PCR Master Mix 能够得到明确的条带。

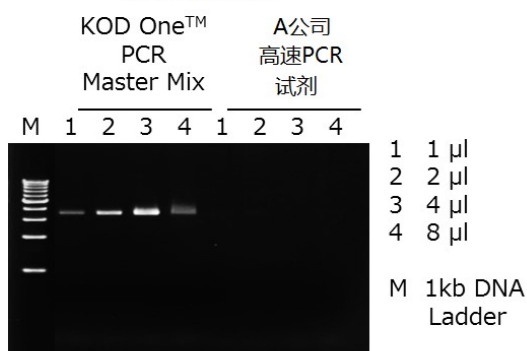
<反应液>

灭菌水	22 - X μ l
KOD One™ PCR Master Mix	25 μ l
10 μ M 各引物	1.5 μ l
各样品	X μ l
Total Volume	50 μl

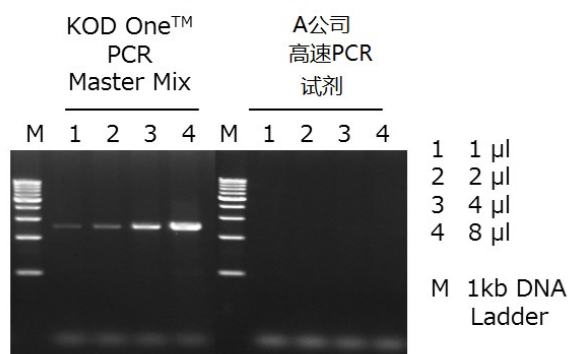
<PCR 循环>

98°C	10 sec.	30 cycles
60°C	5 sec.	
68°C	5 sec./ kb	

血液直扩实验



鼠尾裂解液扩增实验



6. 含次黄（嘌呤核）苷引物的扩增

使用含次黄苷的兼并引物, 比较 KOD One™ PCR Master Mix 与 KOD -Plus- Neo（原来产品）的扩增效果。结果显示, 只有 KOD One™ PCR Master Mix 能够得到明确的条带。所以, KOD One™ PCR Master Mix 用在原来的高保真性 PCR 酶不能使用的含次黄苷的兼并引物上也能高保真性地扩增基因。

<反应液>

灭菌水	21 μ l
KOD One™ PCR Master Mix	25 μ l
100 μ M 各引物	1.5 μ l*
50 ng/ μ l <i>E.coli</i> 基因组 DNA	1 μ l
Total Volume	50 μl

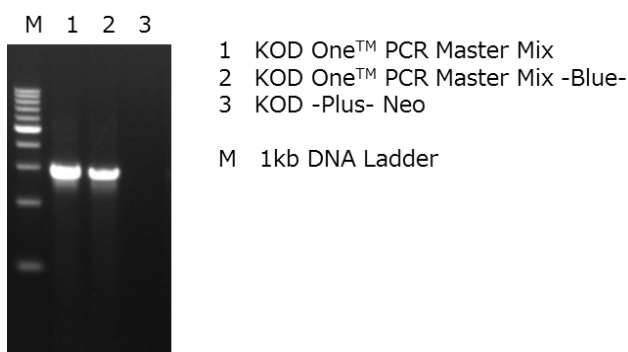
<PCR 循环>

98°C	10 sec.	30 cycles
60°C	5 sec.	
68°C	15 sec.	

<引物序列>

正向引物: ATGGTICARATHCCICARAAY

反向引物: RTGIGCYTGRTCCARTTYTC



- ◇ 引物兼并程度高时会使每种引物试剂的摩尔浓度减少。
- ◇ 根据兼并程度提高引物浓度, 可以提高灵敏度。

[5]实验例

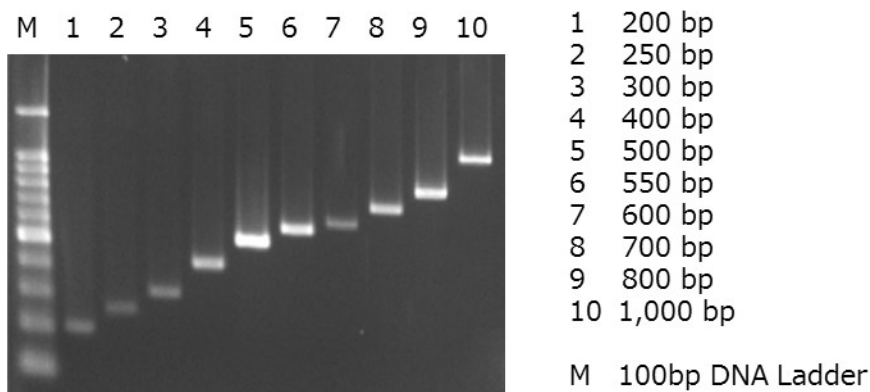
1. 使用 dUTP 防止交叉污染的应用例

PCR 的灵敏度很高，用于检测方面时，环境中残留的 PCR 扩增产物可能会污染新的反应、产生假阳性结果。如果在 PCR 的底物中使用 dUTP，进行新的 PCR 之前，使用 Uracil-N-Glycosylase (UNG) 消化体系中可能的核酸污染，这种方法非常有效。

KOD One™ PCR Master Mix 是使用了不受次黄(嘌呤核)苷或尿嘧啶影响的改良型 KOD DNA polymerase (UKOD)，通过向反应液中添加 dUTP，可用于上述防止交叉污染的对策。下面介绍 KOD One™ PCR Master Mix 中添加 dUTP 的实验例。

<反应液>		<PCR 循环>	
灭菌水	16 μ l	98°C	10 sec.
KOD One™ PCR Master Mix	25 μ l	60°C	5 sec.
2 mM dUTP	5 μ l	68°C	1 sec.
10 μ M 各引物	1.5 μ l	} 30 cycles	
10 ng/ μ l 人基因组 DNA	1 μ l		
总体积	50 μ l		

dUTP添加 (终浓度0.2 mM)



实验结果显示，使用 KOD One™ PCR Master Mix，含有 dUTP 时延伸时间设定为 1 sec.，也可以均一地扩增 1 kb 以下的目的片段（200 ~ 1,000 bp）。此外，KOD One™ PCR Master Mix 的组分不会抑制 UNG 酶的活性。

2. 对质粒导入突变的实验例

使用互补引物，通过突变导入法，在约 5 kb 的质粒中进行突变导入（3 碱基置换、3 碱基缺失、3 碱基插入）。

<反应液>		<突变导入循环>	
灭菌水	21 μ l	98°C	10 sec.
KOD One™ PCR Master Mix	25 μ l	60°C	5 sec.
10 μ M 各引物	1.5 μ l	68°C	25 sec.
50 ng/ μ l 质粒	1 μ l	} 15 cycles	
Total Volume	50 μ l		

- 向上述反应液中添加 *Dpn* I（10 U/ μ l; Code No. DPN-101）2 μ l，37°C 反应 1 小时
- 用上述 *Dpn* I 处理的反应液转化 JM109 等感受态细胞。

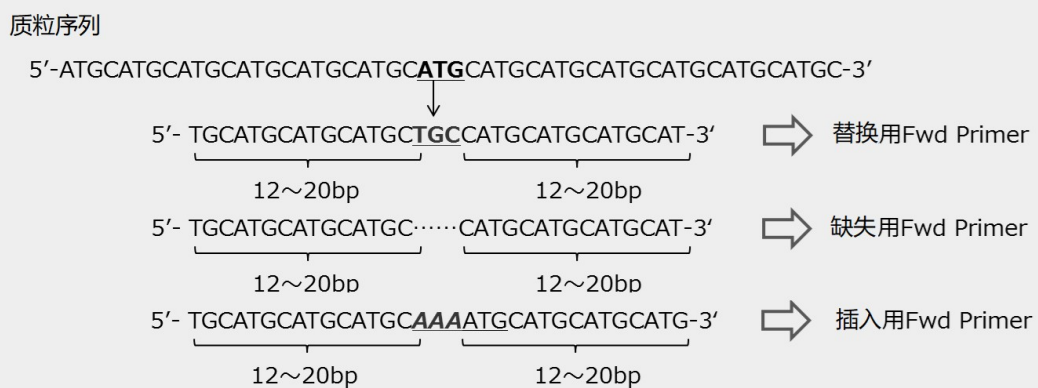
引物设计例

①确定需要导入突变的类型和位置

	质粒序列	5'-ATGCATGCATGCATGCATGCATGC ATG CATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'
需要导入的变异		↓
碱基替换 <u>ATG→TGC</u>		5'-ATGCATGCATGCATGCATGCATGC TGC CATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'
碱基缺失 <u>ATGを删除</u>		5'-ATGCATGCATGCATGCATGCATGC.....CATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'
碱基插入 <u>ATG前插入AAA</u>		5'-ATGCATGCATGCATGCATGCATGC AAA ATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'

②正向引物设计

以突变部位为中心，分别在5'端、3'端加上12~20 bp与质粒能退火的序列。



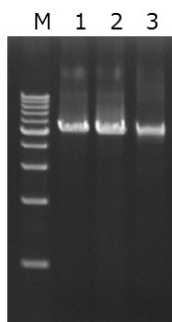
③反向引物设计

设计与上述Fwd引物逆向互补的引物。

5'- TGCATGCATGCATGC TGC CATGCATGCATGCATGC-3'	3'- ACGTACGTACGTACG ACG GACGTACGTACGTACGTA-5'	⇒ 替换用Rev Primer
5'- TGCATGCATGCATGC.....CATGCATGCATGCATGC-3'	3'- ACGTACGTACGTACG.....GTACGTACGTACGTA-5'	⇒ 缺失用Rev Primer
5'- TGCATGCATGCATGC AAA ATGCATGCATGCATGC-3'	3'- ACGTACGTACGTACG TTT TACGTACGTACGTAC-5'	⇒ 插入用Rev Primer

使用KOD One™ PCR Master Mix, 即使长度为5 kb的质粒, 也可以通过延伸时间25 sec.的高速循环条件进行突变导入。通过测序可以确认得到的克隆基本都突变成功, 并且没有除目的位点以外的突变发生。

突变导入后电泳确认



1 3碱基替换
2 3碱基缺失
3 3碱基插入
M 1kb DNA Ladder

每组8个克隆的目标突变数和目标外突变数的统计

	突变导入率	目标外突变数
3碱基替换	8/ 8克隆 (100%)	0个
3碱基缺失	8/ 8克隆 (100%)	0个
3碱基插入	7/ 8克隆 (87.5%)	0个

[6]Trouble Shooting

问题	对策	具体例·标准
无扩增产物; 扩增产物少	改变循环条件	将延伸时间延长至 10~30 sec./ kb
		增加 2~5 个循环数
		采用三步法循环条件, 将退火温度设定为 (Tm-7~Tm-10)°C
	确认所用模板的量 and 品质	加大模板量
		为减少抑制物质的影响, 减少模板量
		优化模板制备方法
		再次纯化模板
		分解或去除 RNA
	确认所用引物的量 and 品质	引物终浓度调整为 0.3 μM~0.15 μM (针对 10kb 以上的长链目的片段时很有效)。
		引物终浓度调整为 0.3 μM~0.15 μM (针对低拷贝检测时比较有效)
		重新制备、合成引物
		重新设计引物
	出现弥散及非特异性条带	改变循环条件
用两步法循环时, 将延伸温度设定为 72°C。或者用 step down 法进行循环		
减少 2~5 个循环数		
确认所用模板的量		减少模板量
确认所用引物的品质		重新制备、合成引物
		重新设计引物 (设计较长的引物, 可能会消除弥散或非特异性条带)
不能进行 TA 克隆	使用专用试剂盒	使用专用 TA 克隆试剂盒「TArget Clone™-Plus- (Code No. TAK-201)」。 (KOD One™ PCR Master Mix / KOD One™ PCR Master Mix -Blue-的扩增产物的末端为平末端。)

[7]相关产品

产品名称	包装	Code No.
<高保真·高效率·高速 PCR 酶> KOD -Plus- Neo	200 U×1 支	KOD-401
<高效率·高成功率 PCR 酶> KOD FX Neo	200 U×1 支	KFX-201
<多重 PCR·亚硫酸氢盐处理的 DNA 用高保真性 PCR 酶 > KOD -Multi & Epi- [®]	200 U×1 支	KME-101
<KOD DNA Polymerase 用高效率 TA 克隆试剂盒> TArget Clone™ -Plus-	10 次份	TAK-201
<TA 克隆用加 A 试剂 (KOD 用) > 10× A-attachment Mix	25 μl×1 支 (25 次份)	TAK-301
<高效率连接试剂盒> Ligation high Ver.2	750 μl×1 支 (100 次份)	LGK-201
<磁珠法 DNA fragment 纯化试剂盒> MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-	200 次份	NPK-601
<限制性酶 (突变导入时去除质粒) > Dpn I	1,000U×1 支	DPN-101



<销售商>

东洋纺（上海）生物科技有限公司

邮编：200122

邮箱：tech@bio-toyobo.cn

网址：<http://www.bio-toyobo.cn>

联系电话：021-58794900

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 单元

<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