



高成功率PCR酶 **KOD FX**

(Code No.KFX-101)

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】 进行实验的注意事项	4
【4】 性能数据	5
【5】 实验例	10
【6】 常见问题	12
【7】 相关产品	12

【 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°C**条件下。

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.

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

本产品是在高保真性 PCR 酶 KOD DNA Polymerase 基础上开发的高效率·高保真性 Long PCR 酶。在酶本身固有的高「保真性」以外，还显示了优良的「延伸性」、「扩增效率」、「可靠性」，在各种 PCR 实验中可得到确实有效的结果。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

· 优良的保真性

实际测序结果表明，在 KOD FX 的 PCR 过程中，产生碱基错配的频率(错误率)144,535 个碱基中仅为 19 个，由此可见，KOD FX 的保真性是 Taq DNA Polymerase 或其他公司 Long PCR 用酶的约 11 倍。

· 出色的延伸性 (扩增可能链长)

以 λ DNA 为模板可以扩增出 40kb，以人基因组 DNA 为模板可扩增出 24kb，以 cDNA 为模板可扩增出 13.5kb。

· 超群的扩增效率

与以往的 PCR 酶相比，得率大幅提高，因此即便模板量很少也可进行扩增。

· 高可靠性 (PCR成功率)

对高 GC 含量的目的片段、全血等可直接扩增，PCR 成功率非常高。

◆ 产品组成

	KFX-101(200 次份)	KFX-101B	KFX-101C
KOD FX (1.0 U/ μ l)	200 μ l \times 1 支	200 次份 \times 5	200 次份 \times 10
2 \times PCR Buffer for KOD FX*	1.7ml \times 3 支		
2mM dNTPs	1ml \times 2 支		

* 2 \times PCR Buffer for KOD FX 在-20 $^{\circ}$ C保存仍为液体状态（不会冻结）。-20 $^{\circ}$ C以下保存时可能会冻结，但不会影响品质，请放心使用。此时，请于融解并充分搅拌后再使用。

◆ 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 均以人基因组 DNA 为模板，对 tPA 基因的 24kb 进行扩增确认实验后再销售。（ tPA: tissue-type plasminogen activator ）

【2】 PCR 实验步骤

(1) PCR 反应液的配制

配制反应液前，请充分混匀除 KOD FX（酶液）以外的各试剂。冻结的试剂请于完全解冻后再使用。

	使用量	终浓度
2x PCR buffer for KOD FX	25 μ l	1x
2mM dNTPs	10 μ l	0.4mM each
10pmol / μ l Primer #1	1.5 μ l	0.3 μ M
10pmol / μ l Primer #2	1.5 μ l	0.3 μ M
Template DNA	\geq 1 μ l	{ Genomic DNA \sim 200 ng / 50 μ l Plasmid DNA \sim 50 ng / 50 μ l cDNA \sim 200 ng (RNA 相当量) / 50 μ l
KOD FX (1.0U/ μ l)	1 μ l	
Autoclaved, distilled water	up to 50 μ l	

· KOD FX（酶液）请在最后添加，反应液请用 Vortex 等充分混匀，spin down 后再进行 PCR。

(2) PCR 循环条件

一般情况下请按以下两步法进行。两步法循环无法确认到扩增或引物的 T_m 值不满 73°C 时，请尝试三步法。此外，扩增 10kb 以上的长片段出现杂带或弥散时，请尝试 Step down PCR。

两步法	三步法
Predenature : 94 $^\circ\text{C}$, 2min. Denature : 98 $^\circ\text{C}$, 10sec. \leftarrow 25~40 cycles Extension : 68 $^\circ\text{C}$, 1min. /kb \leftarrow	Predenature : 94 $^\circ\text{C}$, 2min. Denature : 98 $^\circ\text{C}$, 10sec. \leftarrow 25~40 cycles Annealing : (T_m -5) $^\circ\text{C}$, 30sec. \leftarrow Extension : 68 $^\circ\text{C}$, 1min. /kb \leftarrow

Step down
Predenature : 94 $^\circ\text{C}$, 2min. Denature : 98 $^\circ\text{C}$, 10sec. \leftarrow 5 cycles Extension : 74 $^\circ\text{C}$, 1min. /kb \leftarrow
Denature : 98 $^\circ\text{C}$, 10sec. \leftarrow 5 cycles Extension : 72 $^\circ\text{C}$, 1min. /kb \leftarrow
Denature : 98 $^\circ\text{C}$, 10sec. \leftarrow 5 cycles Extension : 70 $^\circ\text{C}$, 1min. /kb \leftarrow
Denature : 98 $^\circ\text{C}$, 10sec. \leftarrow 15~25 cycles Extension : 68 $^\circ\text{C}$, 1min. /kb \leftarrow
Extension : 68 $^\circ\text{C}$, 7min.

- 延伸时间(Extension)请按照 1min./kb 设定。按 30sec./kb 设定在一般情况下也能确认到扩增，但有时会出现扩增量及扩增可靠性低下的情况（请参考P.9 探讨例3）。
- 由于本产品具有出色的扩增效率，通常25~30个循环即可得到充分的扩增。目的片段的拷贝数较少或对10kb以上的片段进行PCR时，请尝试30~40循环。

【3】进行实验的注意事项

1. 为了保证 PCR 顺利进行

- 1) 反应用离心管请尽量使用薄壁管。同时，推荐 PCR 反应液为 total 50 μ l。
- 2) 灭菌水、引物请事先分装成小份保存，建议每次实验都用完。
- 3) 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(2mM)」(Code No.:NTP-201)。
- 4) 引物请使用 GC 含量不高的 22~35mer(T_m 值 $>60^{\circ}\text{C}$)。同时，设计引物时要注意不要产生二级结构或引物二聚体。
- 5) 进行长目的片段扩增时，请尽量使用引物设计软件，请设计成 25~35mer、 T_m 值在 65°C 以上。并注意，在引物的 3' 端避免 GC rich。
- 6) 模板 DNA 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。

2. PCR 产物的克隆

- 1) 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 产物的末端磷酸化后再进行平滑末端克隆。进行 TA 克隆时，如果使用本公司的 KOD 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。

2) 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。KOD FX(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)。

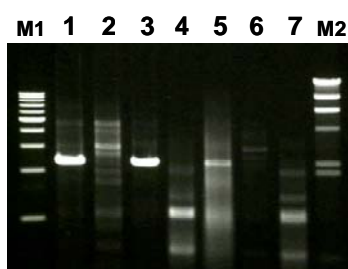
【4】性能数据

1. 扩增成功率 (GC rich 目的片段、粗样品)

■ GC rich 目的片段的扩增

用 KOD FX 可对其他公司 PCR 酶无法扩增的 GC rich 目的片段进行扩增。

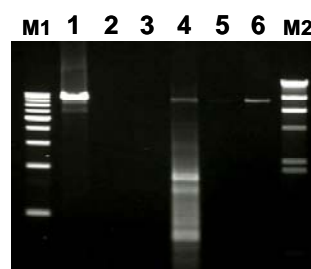
● 人 TGF- β 2.3kb (GC含量约70%)



M1: 1kb DNA Ladder
1: KOD FX
2: KOD -Plus-
3: KOD -Plus-+5% DMSO
4: A公司酶
5: B公司酶
6: C公司酶
7: Taq DNA Pol.
M2: λ / Hind III digest

模板: 人基因组DNA10ng / 50 μ l 反应体系

● 人 IGF2R基因[NM_000876] 8.9kb (GC含量约90%区域的mRNA)

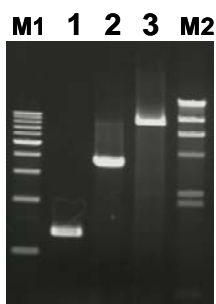


M1: 1kb DNA Ladder
1: KOD FX
2: A公司酶
3: D公司酶
4: E公司GCrich用酶
5: F公司GCrich用酶
6: G公司GCrich用酶
M2: λ / Hind III digest

模板: 人cDNA (HeLa Total RNA50ng相当) / 50 μ l 反应体系

■ 直接以全血为样品进行 PCR

用 KOD FX，以全血为样品 (模板) 可扩增 8.5kb。

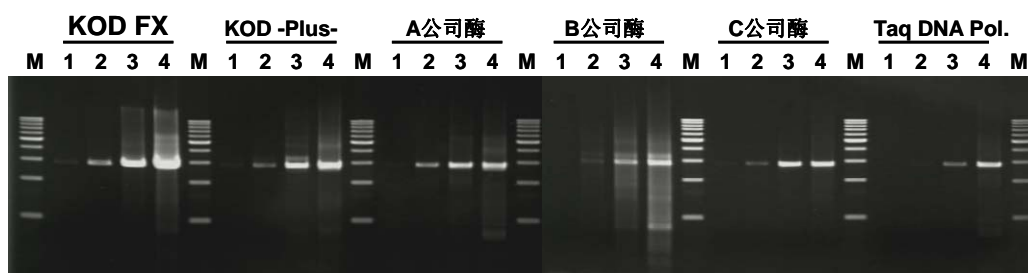


模板: 人全血2 μ l / 50 μ l 反应体系

M1: 1kb DNA Ladder
1: β -globin 1.3kb
2: β -globin 3.6kb
3: β -globin 8.5kb
M2: λ / Hind III digest

2. 扩增效率

用 KOD FX 和其他公司的酶进行模板 DNA 量和扩增效率的比较。以 0.1ng~100ng 的基因组 DNA 为模板，Human β -globin 2.8kb 为目的片段，在 50 μ l 反应体系中，用 15pmoles 引物、KOD FX 1U、2 step cycle 进行 30cycle 扩增反应。结果可见，与以往的 PCR 酶及其他公司的 PCR 酶相比较，用 KOD FX 可得到更明亮更好的效果，得率大幅提高，因此即便模板量很少也可进行扩增。



模板:人基因组DNA

1:模板量 0.1ng / 50 μ l反应体系
 2: 1 ng
 3: 10 ng
 4: 100 ng

目的片段: β -globin 2.8kb

PCR循环条件:

94°C 2min.
 98°C 10sec. \curvearrowright 30 cycles
 68°C 3min.

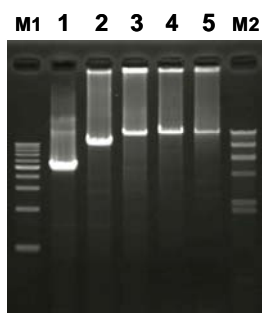
*其他公司酶按其说明书进行了30循环。

M:1kb DNA Ladder

3. 延伸性（扩增可能链长）

用 KOD FX、以 λ DNA 为模板可以扩增出 40kb，以人基因组 DNA 为模板可扩增出 24kb，以 cDNA 为模板可扩增出 13.5kb。

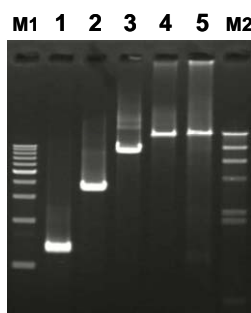
●Template: λ DNA



模板: λ DNA
10ng / 50 μl 反应体系

M1: 1kb DNA Ladder
1: 5kb
2: 10kb
3: 20kb
4: 30kb
5: 40kb
M2: λ / Hind III digest

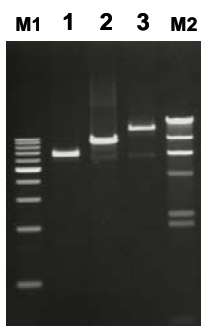
●Template: 人基因组DNA



模板: 人基因组DNA
50~200ng / 50 μl 反应体系

M1: 1kb DNA Ladder
1: β-globin 1.3kb
2: β-globin 3.6kb
3: β-globin 8.5kb
4: β-globin 17.5kb
5: tPA 24.0kb
M2: λ / Hind III digest

●Template: 逆转录反应液(cDNA)

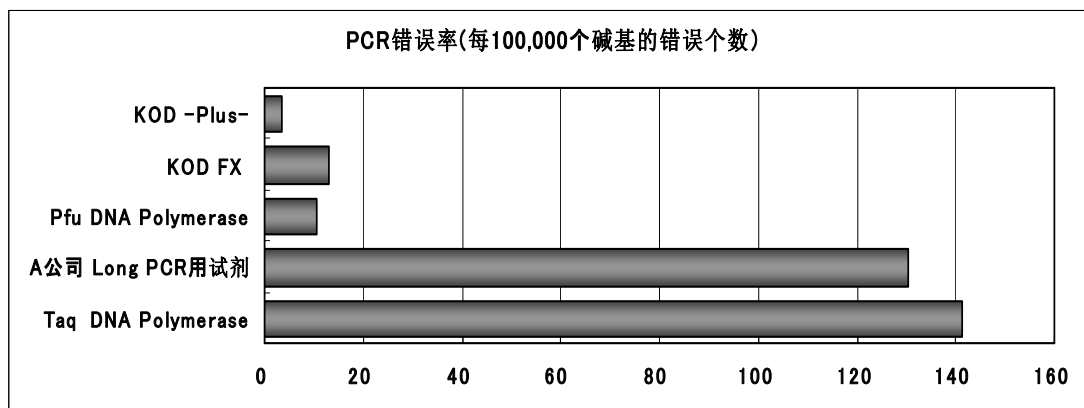


模板: 逆转录反应液(人cDNA)
total RNA100ng相当 / 50 μl 反应体系

M1: 1kb DNA Ladder
1: *Homo sapiens* polymerase (DNA directed), epsilon [NM_006231] 6.8kb
2: *Homo sapiens* insulin-like growth factor 2 receptor [NM_000876] 8.9kb
3: *Homo sapiens* dystrophin [NM_004006] 13.5kb
M2: λ / Hind III digest

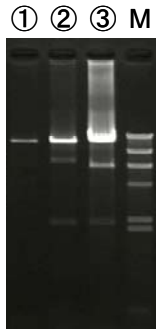
4. 保真性

以人基因组 DNA 为模板, 对 β-globin 基因 2.4kb 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, 在 KOD FX 的 PCR 过程中, 产生碱基错配的频率(错误率) 144,535 个碱基中仅为 19 个。保真性是 Taq DNA Polymerase 及其他公司 Long PCR 用酶的约 10 倍。



5. 探讨例

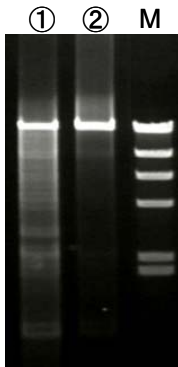
■ 探讨例 1：循环条件的探讨之一



模板: 逆转录反应液(人cDNA) Human Adult Skeletal Muscle total RNA 100ng相当 / 50 μ l 反应体系
目的片段: *Homo sapiens* dystrophin [NM_004006] 13.5kb
PCR循环条件:
94°C 2min.
98°C 10sec. ↙ ①30 cycles ② 35 cycles ③ 40 cycles
68°C 14min. ↘

M: λ / *Hind* III digest

■ 探讨例 2：循环条件的探讨之二



模板: 人基因组DNA 200ng / 50 μ l 反应体系
目的片段: tPA 24kb
PCR循环条件:

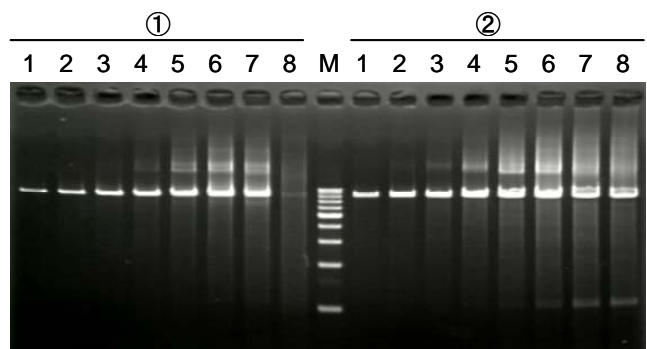
①
94°C 2min.
98°C 10sec. ↙ 30 cycles
68°C 24min. ↘

②
94°C 2min.
98°C 10sec. ↙ 5 cycles
74°C 24min. ↘ 5 cycles
98°C 10sec. ↙ 5 cycles
72°C 24min. ↘ 5 cycles
98°C 10sec. ↙ 5 cycles
70°C 24min. ↘ 5 cycles
98°C 10sec. ↙ 20 cycles
68°C 24min. ↘
68°C 7min.

M: λ / *Hind* III digest

■ 探讨例 3 : 模板 DNA 的量与延伸时间的探讨

●目的片段: β -globin 8.5kb



M: 1kb DNA Ladder

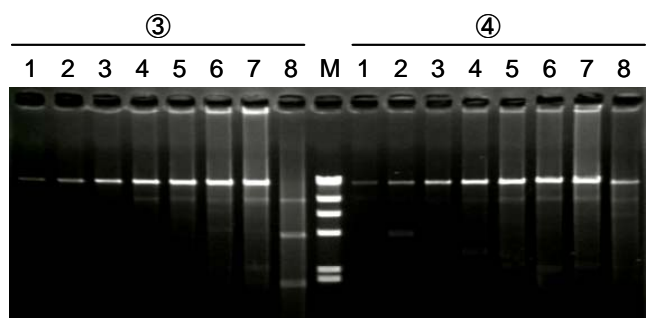
模板: 人基因组DNA

- 1: 6ng / 50 μ l 反应体系
- 2: 12ng
- 3: 25ng
- 4: 50ng
- 5: 100ng
- 6: 200ng
- 7: 400ng
- 8: 800ng

PCR循环条件:

- | | |
|--------------------------|------------------------|
| ① | ② |
| 94°C 2min. | 94°C 2min. |
| 98°C 10sec. | 98°C 10sec. |
| 68°C 4.5min. ↗ 30 cycles | 68°C 9min. ↗ 30 cycles |

●目的片段: tPA 24kb



M: λ / Hind III digest

- | | |
|-------------------------|-------------------------|
| ③ | ④ |
| 94°C 2min. | 94°C 2min. |
| 98°C 10sec. | 98°C 10sec. |
| 74°C 12min. ↗ 5 cycles | 74°C 24min. ↗ 5 cycles |
| 98°C 10sec. ↗ 5 cycles | 98°C 10sec. ↗ 5 cycles |
| 72°C 12min. ↗ 5 cycles | 72°C 24min. ↗ 5 cycles |
| 98°C 10sec. ↗ 5 cycles | 98°C 10sec. ↗ 5 cycles |
| 70°C 12min. ↗ 5 cycles | 70°C 24min. ↗ 5 cycles |
| 98°C 10sec. ↗ 20 cycles | 98°C 10sec. ↗ 20 cycles |
| 68°C 12min. ↗ 20 cycles | 68°C 24min. ↗ 20 cycles |
| 68°C 7min. | 68°C 7min. |

【5】实验例

■ 实验例 1：用碱裂解法配制的小鼠尾巴裂解液的扩增例

将碱裂解法配制的小鼠尾巴裂解液 $0.5\ \mu\text{l}$ ，直接添加到PCR反应液中，以Mouse membrane glycoprotein(Thy-1) gene(M10246)为目的片段，采用两步法，进行 30 个循环的扩增。

小鼠尾巴 (3mm左右)

- ↓ ←50 mM NaOH $180\ \mu\text{l}$
- ↓ Vortex 充分振荡
- ↓ 95°C , 10 min. 温育
- ↓ ←1 M Tris-HCl (pH 8.0) $20\ \mu\text{l}$
- ↓ Vortex 充分振荡
- ↓ 离心 12,000 rpm, 10 min.

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

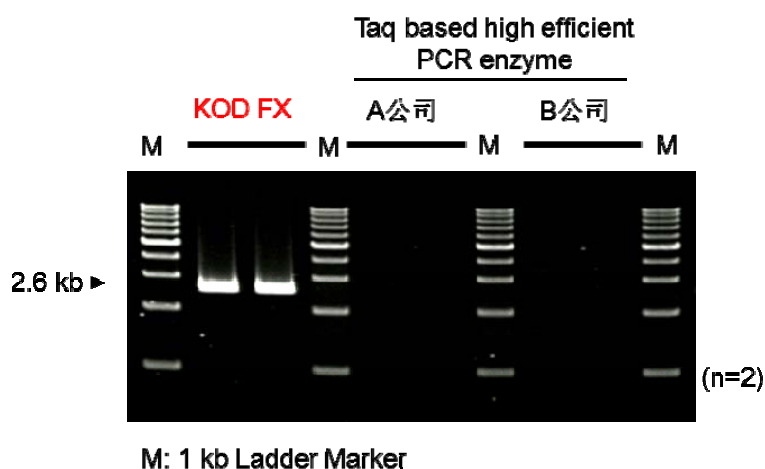
※小鼠尾巴切片时，请浸入碱溶液再切。

※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。

※不建议将用Proteinase K配制的裂解液直接用于PCR。Proteinase K和SDS对PCR可能会有不好的影响，使用时，请事先纯化。如要将裂解液直接用于PCR，推荐以上的碱裂解法。

结果可见，只有在用KOD FX的情况下，才能确认到明亮的扩增条带。相比使用Proteinase K的方法，碱裂解法所花工夫较少，可更简便地进行转基因小鼠的基因分析。



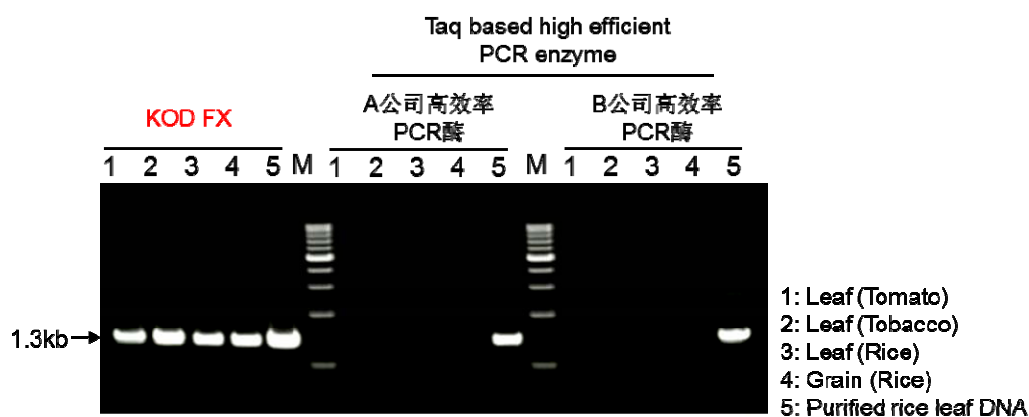
■ 实验例 2：用一步法配制的植物裂解液的扩增例

将一步法配制的番茄叶、烟草叶、稻叶以及精米的裂解液各 1 μl，直接添加到PCR反应液，以rbcL为目的片段，采用两步法，进行 30 个循环的扩增。

<p>植物叶 (3mm左右小块、精米一粒)</p> <p>↓ ←溶解 Buffer 100 μl</p> <p>↓ Vortex 充分振荡</p> <p>↓ 95°C, 10 min.温育</p> <p>↓ Vortex 充分振荡</p> <p>上清 (模板) ⇒ 取 0.5~2 μl 添加到 50 μl PCR反应液中</p> <p>※用本方法处理后，植物组织不会也无需完全溶解。</p> <p>※参考文献: <i>Biotechniques</i>.19:394(1995)</p>	<p>溶解 Buffer</p> <p>100mM Tris-HCl (pH9.5)</p> <p>1M KCl</p> <p>10mM EDTA</p>
--	---

结果可见，只有在用KOD FX的情况下，所有的样品才都能确认到明亮的扩增条带。

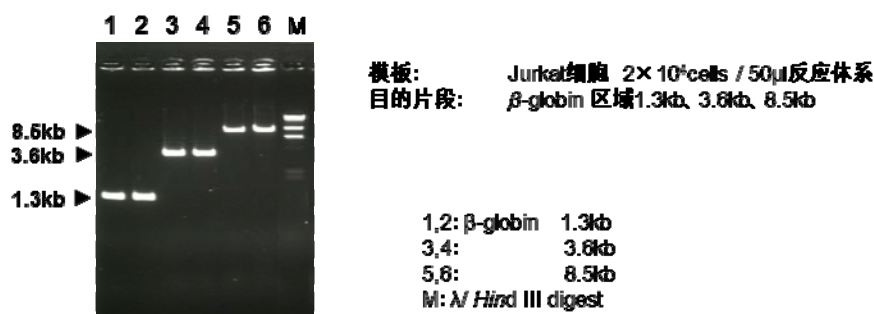
用一步法结合KOD FX，即可大大简化植物基因分析的步骤。



■ 实验例 3：全血、培养细胞、酵母等

按如下量向 50 μl PCR 反应液直接添加样品，进行 PCR。

- 全血…1~4 μl
- 培养细胞…~2×10⁴ cells (例：取悬浊在RPMI/10%FCS中的 1×10⁴ cells/μl细胞悬浊液 2 μl)
- 酵母…用接种针挑少许即可 (菌落直接 PCR。无需通过酶处理溶解酵母细胞壁。)



【6】常见问题

问题	可能原因	对策
无法确认到扩增产物或扩增产物很少。	循环条件	用三步法，退火温度降为 Tm-10°C。
		增加 2~5 个循环。<参考探讨例 1>
	引物	确认引物的品质。→再配制·再合成。
		重新设计引物。
模板 DNA 的纯度·量	确认模板 DNA 的纯度（特别要确认模板是否被 RNA 等污染）。→提高模板 DNA 的纯化级别。	
	使用适量的模板 DNA。<参考探讨例 3>	
出现弥散、杂带时。	循环条件	减少 2~5 个循环。<参考探讨例 1>
		进行 Step down PCR。<参考探讨例 2>
	引物	确认引物的品质。→再配制·再合成。
		重新设计引物。
模板 DNA 量	使用适量的模板 DNA。<参考探讨例 3>	
酶量	酶的使用量降为 0.5~0.8U/ 50 μl。	

【7】相关产品

品名	包装	保存温度	Code No.
<高保真性 PCR 酶> KOD DNA Polymerase	250 U×1	-20°C	KOD-101
<热启动·高保真性 PCR 酶> KOD -Plus-	200 U×1 (200 U×1) ×5	-20°C	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	-20°C	KOD-211 KOD-211B
dNTPs Mixture(2mM)	1 ml	-20°C	NTP-201
<KOD 专用高效率 TA 克隆试剂盒> TARget Clone -Plus-	10 次份	-20°C	TAK-201
<利用磁珠纯化 DNA fragment 试剂盒> MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	200 次份	室温	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: