

高效率·高成功率 PCR Master Mix

KOD FLEX™ PCR Master Mix

KOD FLEX™ PCR Master Mix 是一种高效率、高成功率的 2× PCR Master Mix。该产品采用改良型 KOD DNA 聚合酶 (UKOD)、延伸加速剂以及独特的缓冲液,能够高效且低偏差地扩增复杂的目标序列。即使是对高 GC/AT 片段、长片段、粗样本或难以特异性扩增的目标序列,也能够实现高效扩增。其准确性约为 Taq DNA 聚合酶的 11 倍,因此扩增产物可用于克隆实验后的测序分析。另外,该产品在扩增时受序列和扩增片段大小等因素的影响较小,具有较低的扩增偏差,适用于二代测序中的文库扩增。该酶中混合能抑制 5'→3' DNA 聚合酶活性和 3'→5' 外切酶活性的两种单克隆抗体,能够快速进行高特异性的热启动 PCR。

特征

- **高成功率·高速度**

因为添加了延伸增强剂,提高了 PCR 效率,单重 PCR 最短延伸时间可以缩短到 15 sec./ kb。

※使用粗样品、亚硫酸氢盐处理的 DNA 样品以及进行长片段多重 PCR 时,为了提高扩增效率,延伸时间推荐设置为 30-60 sec./ kb。

- **可扩增粗样品**

不易受粗样品的影响,除用于血液样品的直接多重 PCR 外,还可对动植物裂解液直接进行基因分型以及对土壤、食品样品等进行直接扩增。

- **均一扩增 (低偏差)**

将因 GC 偏差引起的扩增偏差降到了最低,可均一地扩增基因组及转录组的各区域。利用这一特性,可用于二代测序 PCR 扩增环节,制备二代测序分析用的扩增产物。

- **高保真性**

保真性是 Taq polymerase 的 11 倍（与 KOD FX Neo 相同），即使是较长目的片段也可以准确地进行扩增。扩增产物可用于二代测序，克隆等各种分析用途。

- **可以扩增含有尿嘧啶和肌苷的引物或模板**

以往的高保真性 PCR 酶很难扩增含有肌苷或尿嘧啶的引物，但 KOD -FLEX™ PCR Master Mix 可以对这样的引物进行高效扩增。亚硫酸氢盐处理后的模板及兼并引物也可以使用该试剂扩增。

1. 组分

产品名称	KMX-101*
KOD FLEX™ PCR Master Mix	1 mL×5 支

*50 μ L 反应体系，可用 200 次。

2. 安全上的注意事项

本制品是研究用试剂，请不要作为诊断及临床检查试剂使用。另外，使用本产品时，请严格遵守实验室的一般注意事项，注意安全。请遵守各试剂里附带的注意事项，严格按照仪器的操作说明书的指导。

3. 性能·品质

KOD FLEX™ PCR Master Mix 的每个批次，都会以 100 bp Radder 作为模板，通过 PCR 确认其是否成功扩增后才会进行发货。

4. 引物的准备

- 引物长度请尽可能设计为 22~35mer， T_m 值*1 > 60°C。
- 请设计 GC 含量在 45~60%。另外，请确认 GC 的分布均衡性。3'端序列 GC 含量高的引物，易于弥散，容易产生非特异性条带（设计引物 5'端 GC 为 60~70%，3'端为 40~50%的 GC 含量比较理想）。
- 3'末端碱基若设计为 G 或 C，可以提高结合效率。但是，如前所述，如果 3'末端区域中 GC 含量过高，则容易出现弥散或非特异性条带，请务必注意。
- 设计时请注意不要让引物分子内形成二级结构或引物二聚体。
- 扩增长链目的基因时，请使用 T_m 值 65°C 以上、长度 25~35mer 的引物。

使用 25mer 以上 (T_m 值 \geq 65°C) 的引物可以提高成功率。

- 该酶可以扩增原来高保真 PCR 酶不能扩增的含 I*2 或 U*3 的引物。

*1 引物 T_m 值的计算，请使用邻近数值法 (Nearest Neighbor method)。本说明书中所述的引物的 T_m 值，是按 50 mM Na^+ 浓度、0.5 μ M 的引物浓度计算的。

本公司有以邻近数值法 (Nearest Neighbor method) 为基础的 T_m 计算公式。

请在本公司网页 ([Tm calculator \(bio-toyobo.cn\)](http://tm-calculator.bio-toyobo.cn)) 上的链接计算。

*2 使用邻近数值法 (Nearest Neighbor method) 无法计算含 I 的引物的 T_m 值。与含不配对的引物一样，计算除去 I 的大致的 T_m 值，请参照这个 T_m 值摸索最适反应条件。

*3 计算含 U 引物的 T_m 值时, 请将 U 视作 T 计算。

5.模板

可以使用以下模板。常用模板用量请参照下表 (PCR 反应液为 50μl 时)。

		加入模板量范围	推荐加入的模板量
基因组DNA	真核生物由来DNA	5~200 ng	50 ng
	原核生物由来DNA	0.1~100 ng	10 ng
质粒DNA		10 pg~50 ng	1 ng
cDNA		~200 ng (RNA对应的量)	50 ng (RNA对应的量)
粗样品 (血液、各种裂解物等)			参考下文

· 模板的长度及纯度对 PCR 结果影响很大。模板量足够的时候, 可以事先进行凝胶电泳, 确认一下模板质量。当体系混入大量 RNA 时, 可能会对 PCR 反应产生抑制作用。

· 以逆转录反应液为模板时, 逆转录反应液中残留的 RNA 可能会对 PCR 反应有抑制作用。

50μl PCR 反应液中添加的逆转录模板的量, 请以添加 200 ng RNA 的量推算。

如果将生物组织等粗样品直接加入 PCR 反应液中, 模板加入量 (50 μL PCR 反应液) 见下文。

	常用模板量	备注
大肠杆菌	枪头蘸取少量	如果无法实现稳定的扩增, 可将枪头蘸取的菌体悬浮于 50 μL TE 中, 并取 2-5 μL 作为模板, 以获得稳定的结果。
酵母菌	枪头蘸取少量	
丝状菌	枪头蘸取少量	由于提取的 DNA 量较少, 需要进行 35~40 个循环的扩增。 在琼脂糖电泳过程中, 条带可能会滞留在凝胶孔中。*
培养细胞	10 ¹ ~10 ⁵ cells	
血液	1~2μL	
指甲	1/3米粒大小	
头发	1~2 cm	
植物叶	2 mm	
精米	1/5米粒大小	
鼠尾	1 mm大小	

*如果直接扩增小鼠尾巴等粗样品组织, DNA 片段可能会在琼脂糖电泳时滞留在孔中, 无法迁移到所需位置。建议电泳前在 50 μL PCR 产物中加入 10 μL 20 mg/mL Proteinase K。

使用含裂解液的粗样品作为模板扩增时, 请按照以下方法制备裂解液模板并进行 PCR。裂解液模板可在 4°C 下保存数周 (如需长期保存, 可在 -20°C 下保存)。例如, 如果您想对一个样本进行多次研究, 建议您按照以下方法制备裂解液模板。

裂解液模板的制备方法因生物样本而异, 请参见下文。

动物组织 ⇒ ①碱裂解法或③Proteinase K 处理法

植物组织 ⇒ ②一步法或③Proteinase K 处理法

①碱裂解法（动物组织裂解液制备）。

生物样本（添加数量见右图）

↓←50 mM NaOH 180 μ L

↓ 充分涡旋搅拌

↓ 95°C, 10 min. 孵育

↓←1 M Tris-HCl (pH 8.0) 20 μ L

↓ 充分涡旋搅拌

↓ 离心 12,000 rpm, 5 min.

取上清液（模板）⇒ 0.5-2 μ L 加入 50 μ L PCR 反应液中

生物样本示例

鼠尾 ⇒ 约 3 mm 左右

指甲 ⇒ 约 5 mg 左右

如果生物样本较小，可调整加入的 NaOH 量。

（例如，对于 1 厘米长的头发，使用 18 μ L 50 mM NaOH 和 2 μ L 1 M Tris-HCl (pH 8.0)）。

②一步法（植物组织裂解液制备）。

生物样本（添加数量见右图）

↓←溶解 Buffer 100 μ L

↓ 溶解 Buffer 配制：

↓ 100mM Tris-HCl (pH9.5)

↓ 1M KCl

↓ 10mM EDTA

↓ 充分涡旋搅拌

↓ 95°C, 10 min. 孵育

↓ 充分涡旋搅拌

↓ 离心 12,000 rpm, 5 min.

取上清液（模板）⇒ 0.5-2 μ L 加入 50 μ L PCR 反应液中

生物样本示例

烟草叶 ⇒ 约 3 mm 左右

精米 ⇒ 1 粒

③Proteinase K 处理法

生物样本（添加数量见右图）

↓←Proteinase K 溶解缓冲液 100~200 μ L

↓ Proteinase K 溶解缓冲液：

↓ 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)

↓ 5 mM EDTA

↓ 400 mM NaCl

↓ 0.3% SDS

↓ 200 μ g/ml Proteinase K

生物样本示例：

鼠尾 ⇒ 约 3 mm 左右

指甲 ⇒ 约 5 mm 左右

烟草叶 ⇒ 约 3 mm 左右

精米 ⇒ 1 粒

- ↓
- ↓ 充分涡旋搅拌
- ↓ 55°C, 60 min. 孵育
- ↓ 95°C, 5 min. 孵育
- ↓(如果在 55°C 温度下过夜, 可能不需要 95°C 5min 热灭活)。
- ↓ 充分涡旋搅拌
- ↓ 离心 12,000 rpm, 5 min.
- 取上清液 (模板) ⇒ 0.5-2 μL 加入 50 μL PCR 反应液中

裂解液制备也可在 96 孔板上进行。

以使用小鼠尾巴制备裂解液 (碱溶解法) 为例。

将鼠尾 (约 3 毫米) 放入 96 孔板中

- ↓←加入 180 μL 50 mM NaOH, 盖上盖子并充分涡旋搅拌。
- ↓离心
- ↓95°C, 10 min. 孵育 (使用热循环仪)
- ↓加入 20 μL ←1 M Tris-HCl (pH 8.0), 盖上盖子并涡旋搅拌均匀。
- ↓离心

取上清液 (模板) ⇒ 0.5-2 μL 加入 50 μL PCR 反应液中

*切割小鼠尾部, 使其浸入液体中。

*请小心使用热碱。

*处理后, 尾部不会完全溶解。老鼠尾巴的表面只会溶解。

6.PCR protocol

a. PCR 反应液的制备

制备反应液之前, 请将冻结的试剂完全融解后, 再将各试剂充分混匀。

Components	Volume	Final Concentration
Autoclaved, distilled water	X μL	
KOD FLEX™ PCR Master Mix(2×)	25 μL	1×
Primer(10μM)	0.6 μL each	0.3μM each
模板	Z μL	<ul style="list-style-type: none"> Genomic DNA ~200 ng/50μL Plasmid DNA ~50 ng/50μL cDNA ~200 ng/50μL 粗样本 · 粗抽提液~5μL/50μL
Total	50 μL	

- 加入所有液体后, 用涡旋或其他方法充分混合反应溶液, 并将其放入热循环仪中。

- 如果出现非特异性扩增或涂抹状条带，可将引物浓度降至 0.1 μM（最终浓度），然后扩增。
- 在扩增长片段时，将引物浓度降低到 0.1 μM（最终浓度）可提高扩增效果。

b.PCR 循环条件

PCR 的循环条件，根据引物的 Tm 值不同而异。引物的 Tm 值在 65°C 以下的时候，请尝试 3 步法循环。引物的 Tm 值超过 65°C 时，请尝试 2 步法循环。

3 步法循环 [引物的 Tm 值在 65°C 以下时]

Pre-denature:	94°C, 2 min.		
Denature :	98°C, 10 sec.		
Annealing :	Tm°C*1, 10 sec.		
Extension :	68°C, 时间请参考表1		

2 步法循环 [引物的 Tm 值超过 65°C 时]

Pre-denature:	94°C, 2 min.		
Denature :	98°C, 10 sec.		
Extension :	68°C, 时间请参考表1		

表1 延伸时间的设定

	纯化DNA (Genomic DNA·Plasmid DNA·cDNA)		粗样品 (活体样品·粗抽提液)
	不含GC簇*1目的基因	含有GC簇*2目的基因	
Extension	15 sec./ kb*4	30 sec./ kb	60 sec./ kb

*1 GC 簇是指 400 bp 以上的区域，GC 含量达到 70% 以上。

*2 2 步法循环中为了使引物充分退火，不论目的片段长或短，请将延伸时间设定在 30 sec. 以上。另外，使用兼并引物时，为了进行充分退火，将退火时间设定为 30 sec. 可以得到良好的结果。

建议 (单重)

- 确认产生非特异性扩增或弥散时, 即使 T_m 值在 65°C 以下, 也请尝试 2 步法循环。
- 使用兼并引物的时候, 兼并程度越高, 一种引物对应的摩尔数就越少。根据兼并引物的比例, 通过上调引物的浓度, 最大到 $3.0\mu\text{M}$ (终浓度), 可以提高灵敏度。
- 通常30个循环就可以得到充分扩增。扩增量少的时候可以增加到40个循环。
- 预测目的基因的拷贝数比较少或目的基因超过10 kb时, 将延伸时间延长至60 sec./ kb可增加产物量。

(例) 如何在考虑 T_m 值和片段长度的条件下设置循环

引物 T_m 值 $\leq 65^{\circ}\text{C}$: 3 步循环

片段长度: 500bp	片段长度: 1kb	片段长度: 5kb
94°C, 2 min.	94°C, 2 min.	94°C, 2 min.
98°C, 10 sec.	98°C, 10 sec.	98°C, 10 sec.
60°C, 10 sec.	60°C, 10 sec.	60°C, 10 sec.
68°C, 8 sec.	68°C, 15 sec.	68°C, 75 sec.
4°C, hold	4°C, hold	4°C, hold
← 30 cycles		

引物 T_m 值 $> 65^{\circ}\text{C}$: 2 步循环

片段长度: 500bp	片段长度: 1kb	片段长度: 5kb
94°C, 2 min.	94°C, 2 min.	94°C, 2 min.
98°C, 10 sec.	98°C, 10 sec.	98°C, 10 sec.
68°C, 30 sec.	68°C, 30 sec.	68°C, 75 sec.
4°C, hold	4°C, hold	4°C, hold
← 30 cycles		

建议 (多重)

- 与其他目标相比, 扩增效率低的目标可通过提高引物浓度来改善扩增均一性。对于扩增效率高的目标, 也可以通过降低引物浓度来提高扩增均一性。
- 使用市场上销售的多重扩增用的引物套装时, 请按照使用说明书进行操作。
- 有不能确认扩增的目的基因时, 请在 $T_m \sim T_m - 5^{\circ}\text{C}$ 的基准范围内进行优化。
- 参照表 2 设置多重 PCR 的延伸时间。

表2 延伸时间的设定

目的基因数量	短片段(≤1 kb)		长片段(1 kb~10 kb)	
	10以下	10以上	10以下	10以上
Extension 3步法循环	15~30 sec.	30~60 sec.	30 sec./ kb 以最长目的基因为基准	30~60 sec./ kb 以最长目的基因为基准
Extension 2步法循环	30 sec.	30~60 sec.	30 sec./ kb 以最长目的基因为基准	30~60 sec./ kb 以最长目的基因为基准

- 对粗样品进行扩增时，无论何种情况下，请设定为60 sec./ kb。
- 扩增粗样品时，增加目的基因数量，有时会导致效率下降。这种情况下，请使用纯化的 DNA。

7.为了顺利进行 PCR

- 请尽可能使用薄壁型 PCR 管。另外，推荐 PCR 反应液总量为 50μl。
- 推荐事前先将灭菌水、引物分成小管保存。

8.对于 PCR 产物的二代测序（NGS）

- PCR 产物用于二代测序（NGS）时，请根据文库制备试剂盒的使用说明书，进行纯化及模板的制备。

9.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，PCR 产物用于克隆时，请事先使用磷酸化引物，将 PCR 产物的末端磷酸化之后，再利用 blunt end 进行克隆。

TA 克隆时，建议使用本公司 KOD DNA Polymerase 的 TA 克隆试剂盒「TARget Clone™ -Plus- (Code No. TAK-201)」，使用未纯化的 PCR 产物，可简单方便地进行 TA 克隆。

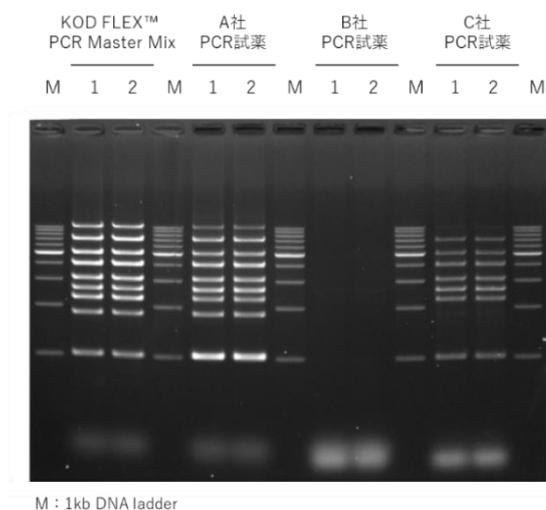
另外，我司性能卓越的连接试剂「Ligation high Ver. 2 (Code No. LGK-201)」对于各种末端，具有很好的连接效果。

- 用本产品扩增得到的 PCR 产物可以用限制性内切酶处理，利用其突出末端进行克隆。使用限制性内切酶处理前请先对扩增产物进行纯化处理。DNA Polymerase 有剩余的时候，如果产物未纯化，本酶具有的 3'→5'外切酶活性，有可能会将限制性内切酶处理后的突出末端切除掉。

10. 实验例

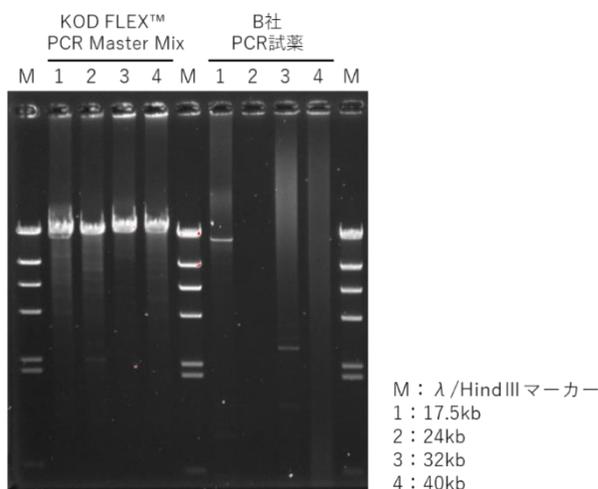
(1) 高成功率 · 低偏差

对多重目标(Chrome9 (1.0kb), MSH6 (1.8kb), BRCA2 (2.3kb), WT-1 (2.5kb), FANCE (3.0kb), RAD51D (4.0kb), KRAS (5.0kb), BRCA1 (7.0kb), DDB2 (10.0kb)) 进行了多重 PCR 扩增。使用不同的扩增试剂进行多重 PCR, 比较性能(50 μ L 反应系、N=2)。结果表明, KOD FLEX™ PCR Master Mix 的扩增效果良好, 偏差较小。



(2) 扩增片段长度

以人类基因组 DNA 为模板进行长片段扩增。结果证实, 使用 KOD FLEX™ PCR Master Mix 扩增可达 40 kb。



11. 常见问题

问题	对策	具体操作
未扩增 扩增产物少	改变循环条件	将延伸时间延长至 60 sec./ kb
		增加 2~5 个循环数
		进行 3 步法循环
		降低退火温度，在 $T_m \sim T_m - 5^\circ\text{C}$ 范围内进行优化
		使用兼并引物时，将退火时间从 10 sec. 延长至 30 sec.
	确认所用模板的量及品质（特别是确认模板内没有过量的 RNA 等的污染）	增加模板的量
		优化模板的制备方法
		纯化模板
		为了消除 RNA 引起的抑制作用，减少 cDNA 样品的量
	确认所用模板的量及品质	将 RNA 分解掉或除去
将引物浓度从 0.3 μM 至 0.1 μM （终浓度）范围内逐步减少进行优化（特别是对 10 kb 以上的长片段有时会比较有效）		
使用兼并引物时，提高引物浓度。[参考 p4 option]		
改变引物序列	重新制备模板，重新合成引物	
出现弥散、非特异性条带	改变循环条件	重新设计引物 [参考 3. (1)]
		3 步法循环变为 2 步法循环。
	减少 2~5 个循环数	
	确认所用模板的量	减少模板的量
	确认所用模板的量及品质	重新制备模板，重新合成引物
将引物浓度逐渐减少到 0.1 μM （终浓度）进行优化		
改变引物序列	重新设计引物。（设计较长的引物，有时会消除弥散及非特异性条带）。[参考 P2]	
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)」 (扩增产物的末端已被平滑化))

12. 相关产品

品名	包装	Code.No.
<KOD DNA Polymerase 用高效率 TA 克隆试剂盒> TArget Clone® -Plus-	10 次	TAK-201
<高效率连接试剂> Ligation high Ver.2	750 μL ×1 支 (100 次)	LGK-201

TOYOBO

[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 500 号华润时代广场 28 层 AL 座

邮编：200122

交货期限 · 订货 · 产品内容 · 技术相关咨询

[Tel:021-5879-4900](tel:021-5879-4900) Fax:021-5879-4901

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

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