

适用于扩增长链目的片段 高速·高保真·高成功率 PCR Master Mix

KOD Long PCR Master Mix

KOD Long PCR Master Mix 是包含了改良型 KOD DNA polymerase (UKOD) 的 2×PCR Master Mix。

通过在具有高保真性和扩增效率的改良型 KOD DNA polymerase (UKOD) 中添加延伸增强剂, 我们在保持高保真性的同时, 实现了针对 10 kb 以上目的片段、延伸时间仅需 10 秒/kb 的高速 PCR。本产品适用于长读长测序的长链目的片段扩增的最优 PCR 试剂, 拥有高成功率, 也可实现粗样本的直接扩增。

本产品由两种可分别抑制聚合酶活性和 3' → 5' 外切酶活性的两种单克隆抗体混合而成, 可进行高特异性的 Hot start PCR。

产品特点

- **实现长读长测序的长链片段扩增**

以人类基因组 DNA 为模板, 可实现约 50 kb 的扩增。由于即使对长链靶标也能快速且准确地扩增, 因此非常适合长读长测序模板的扩增。

- **高速 PCR**

对于 1~10 kb 的目的片段, 可实现延伸时间每 1 kb 仅 5 秒的扩增。对于 10 kb 以上的目的片段, 也能实现延伸时间 10 秒/kb 的高速 PCR, 可大幅缩短 PCR 反应时间。由于也可延长延伸时间的设定, 因此能在同一循环中扩增不同长度的目的片段。

- **高保真**

保真性约为 Taq DNA polymerase 的 80 倍 (与 KOD -Plus-系列同等保真性)。扩增产物除克隆以外, 更可用于更多用途。

- **实现 GC-rich、AT-rich 目的片段的扩增**

无需依赖目的片段序列即可实现扩增。本产品具有低偏差且能实现高速扩增的特性, 因此特别适用于长读长文库的扩增

- **可实现粗样本扩增**

通过添加延伸增强剂, 可靠性得到提升。面对含有 PCR 抑制物质的粗样品 (生物样本、土壤、食品等), 无需进行纯化, 即可实现目标基因的扩增。

1. 包含物品

产品名	KML-101*
KOD Long PCR Master Mix	1 mL×5 支

*50 μ L 体系可用 200 次。

- 本产品为 2× Master Mix, 分别含有 Buffer、dNTPs、 Mg^{2+} 、聚合酶及抗聚合酶抗体。
- 产品到货后, 请于 $-20^{\circ}C$ 冷冻保存。使用时, 解冻后请用涡旋混匀器等充分混匀, 使溶液完全混匀后再使用。此后, 可在 $2\sim 8^{\circ}C$ 冷藏保存 (建议 1 个月内使用完毕)。若长期不使用, 请于 $-20^{\circ}C$ 再次冷冻保存。经确认, 反复冻融约 20 次不会对品质产生影响。

2. 安全注意事项

本产品为研究用试剂, 请勿将其用作诊断及临床检验用试剂。此外, 使用时请严格遵守实验室的一般注意事项, 并注意安全。在相关实验中, 也可能涉及处理对人体有害的试剂。请遵守各试剂附带的注意事项及仪器、器具附带的使用说明书的指示, 必要时请使用适当的防护用具。

3. PCR 实验流程

(1) 关于引物的设计

- 引物请尽量使用长度约 25~35mer (T_m 值*1 $> 65^{\circ}C$)。
- 请将 GC 含量设计为 45~60%。
- 请确认 GC 分布的偏差。若 GC 偏向 3'端区域, 容易出现拖尾、额外条带。通过将 5'端一半区域的 GC 含量设计为 60~70%、3'端一半区域设计为 40~50%, 可提高特异性。
- 将 3'末端设计为 G 或 C, 可提高引物结合效率。但需注意, 若 3'端区域 GC 过度偏倚 (如上所述), 容易出现拖尾、额外条带
- 设计时请注意避免形成分子内二级结构及引物二聚体。
- 可使用含传统高保真 PCR 酶无法兼容的肌苷*2 或尿嘧啶*3 的引物进行扩增, 也可扩增亚硫酸氢盐处理后的模板*4。可供宏基因组解析等用途使用

*1引物 T_m 值计算请使用最近邻法 (Nearest Neighbor method)。支说明书中标注的引物 T_m 值是基于 Na^+ 浓度50 mM、引物浓度0.5 μ M*的计算结果。我们已公开基于最近邻法的 T_m 计算程序, 可通过本公司官网 (<http://www.biotoyobo.cn/file/tmcal.html>) 使用。

*2 含Inosine (I) 的引物无法通过最近邻法去计算 T_m 值。需先移除Inosine后计算剩余序列的近似 T_m 值, 并以此为参考优化实验条件

*3 含Uracil (U) 的引物需将U视为Thymine (T) 进行计算。

4 经亚硫酸氢盐处理后的 DNA 中, 未甲基化的 C 会转化为 U, 导致引物设计难度增加。建议基于上述 (1) 的方法, 结合专用工具 (如免费在线工具 MethPrimer (<https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 进行设计

(2) PCR 反应液的制备

反应液配制前, 请先将试剂完全溶解并充分混匀后再使用。

Components	Volume	Final Concentration
Autoclaved, distilled water	X μ L	
KOD Long PCR Master Mix	25 μ L	1 \times
引物 (5 μ M each)	1.5 μ L	0.15 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 生物样本·粗提液 ~5 μ L / 50 μ L
Total	50 μ L	

- 将所有液体混合后, 用涡旋仪等充分搅拌反应液, 然后置于热循环仪中。

(3) PCR 循环条件

在使用 KOD Long PCR Master Mix 时, 推荐采用三步循环法以确保引物的有效退火。若观察到非特异性条带 (Extra Bands) 或拖尾现象 (Smear), 建议尝试两步循环法或 Step-Down 法。

三步循环法

Pre-denaturation:	94°C, 1 min.	
Denaturation:	98°C, 10 sec.	} 25~45 cycles
Annealing:	(T _m - 5)°C, 5 sec.	
Extension:	68°C, 5 ~10 sec./ kb	

延伸时间需根据目的片段长度进行设置。

1~ 10 kb	: 5 sec./ kb*1
10 kb ~	: 10 sec./ kb*1

- 退火温度需设置为引物T_m值减5°C (T_m-5°C)。若计算结果超过68°C, 则直接设定为68°C。
- DNA变性步骤推荐设置为98°C 10秒。若需在94°C进行变性, 则需将时间延长至15秒。
- 本产品采用了基于抗体的Hot Start技术。
- *1 当扩增量不足时, 可通过延长延伸时间 (每kb增加10~30秒) 改善。若目标拷贝数较少或需从粗提液扩增, 建议按每kb 10秒设置延伸时间。

当使用三步循环法出现非特异性条带或拖尾现象时, 请尝试以下两步循环法。如果在两步循环法中仍然出现非特异性条带或拖尾现象, 请尝试Step down法。这可能有助于提高扩增的特异性和检测灵敏度。

两步循环法

Pre-denaturation:	94°C, 1 min.	
Denaturation:	98°C, 10 sec.	} 25~45 cycles
Extension:	68°C, 5 ~10 sec./ kb	

延伸时间需根据目的片段长度进行设置。

1~ 10 kb	: 5 sec./ kb*2
10 kb ~	: 10 sec./ kb*2

Step down法

Pre-denaturation:	94°C, 1 min.	
Denaturation:	98°C, 10 sec.	} 5 cycles
Extension:	74°C, 5 ~10 sec./ kb	

Denaturation :	98°C, 10 sec.	} 5 cycles
Extension :	72°C, 5 ~10sec./ kb	
Denaturation :	98°C, 10 sec.	} 5 cycles
Extension :	70°C, 5 ~10 sec./ kb	
Denaturation :	98°C, 10 sec.	} 15~30 cycles
Extension :	68°C, 5 ~10 sec./ kb	

*2 当扩增量不足时, 可通过延长延伸时间 (每kb增加10~30秒) 改善。若目标拷贝数较少或需从粗悬液扩增, 建议按每kb 10秒设置延伸时间。

(4) 关于模板

a. 纯化模板、若使用cDNA的情况下、推荐添加量请参考下表。
(PCR反应液 50 μL体系)

			常规模板量
Genomic DNA	真核生物由来DNA	1~200 ng	50 ng
	原核生物由来DNA	0.1~200 ng	10 ng
Plasmid DNA		1 pg~50 ng	10 ng
cDNA		1ng~750 ng (RNA相当量)	50 ng (RNA相当量)
λDNA		10 pg~10 ng	1 ng

- 对于10kb 以上的长链片段扩增, 建议将模板添加量调整为常规量的1.5~2 倍。
- 模板的长度和纯度对 PCR 结果有显著影响。建议在模板量充足时, 通过琼电泳预先确认其质量。若 RNA 大量混入, 可能会抑制 PCR 反应
- 当使用逆转录反应液作为模板时, 需注意其中过量的 RNA 可能导致 PCR 反应受抑制。建议在 50 μL PCR 反应液中, 逆转录反应液的添加量对应 RNA 量不超过 750 ng。

b. 当直接将生物组织等样本添加至PCR反应液时, 请参考以下添加量。
(PCR反应液50μL体系)

	常规模板量	参考
大肠菌	附着在牙签上的少量样本	
酵母	附着在牙签上的少量样本	
丝状菌	附着在牙签上的少量样本	若无法获得稳定的扩增结果, 建议将样本混匀于50 μL TE Buffer中, 取2~5 μL作为模板进行PCR, 可获得稳定结果。
培养细胞	10 ¹ ~10 ⁵ cells	
血液*1	1~2 μL	
指爪	米粒1/3程度	} 由于抽提出的DNA量极少, 需进行35~45个循环的扩增。
头发	1~2 cm	
植物叶片	2 mm角	
精米	米粒1/5程度	

鼠尾 1 mm程度 在琼脂糖凝胶电泳中, 有时会出现条带带留在凝胶加样孔中的情况。*2

*1 血液抗凝剂有时会抑制 PCR 反应。使用抗凝剂时, 请选择 EDTA 采血管或柠檬酸采血管。

*2 使用鼠尾等动物组织直接扩增时, 有时会出现 DNA 片段带留在琼脂糖凝胶加样孔中、无去泳动到目标位置的现象。建议在 50 μ L PCR 产物中添加 10 μ L 20 mg/mL 的 Proteinase K, 混匀后进行电泳。

c. 使用生物样本等进行扩增时, 请按以下方法制备裂解液并进行 PCR。生物样本通过细碎处理可提高提取效率。对于组织、叶片等柔软样本, 建议在溶液中使用匀浆器等将其匀浆。此外, 对于指甲、种子等坚硬样本, 建议事先用研钵、锤子等粉碎后再处理。裂解液可在 4°C 下保存数周 (长期保存时请于 -20°C 保存)。若需多次探讨样本等情况, 建议制备裂解液。

不同生物样本的裂解液制备方法有所不同。请参考以下内容。

动物组织 \Rightarrow ① 碱溶解法 或 ③ Proteinase K 处理法

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

① 碱溶解法 (制备动物组织裂解液)

生物样本 (添加量请参考右图)

↓ ← 50 mM NaOH 180 μ L

↓ 用 Vortex 完全混匀

↓ 95°C, 孵育 10 min.

↓ ← 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 20 μ L

↓ 用 Vortex 完全混匀

↓ 离心 12,000 rpm, 5 min.

上清液体 (样本) \Rightarrow 每 50 μ L PCR 反应液中添加 0.5 ~ 2 μ L 样本。

生物试剂少量时, 可调整 NaOH 添加量来进行调整。

(例: 头发 1cm 程度, 添加 50 mM NaOH 18 μ L、1M Tris-HCl (pH 8.0) 2 μ L 即可。)

② 一步法 (制备植物组织裂解液)

生物样本 (添加量请参考右图)

↓ ← 溶解 Buffer 100 μ L*

↓ 100 mM Tris-HCl (pH9.5)

↓ 1 M KCl

↓ 10 mM EDTA

↓ 用 Vortex 完全混匀

↓ 95°C, 孵育 10 min.

↓ 用 Vortex 完全混匀

↓ 离心 12,000 rpm, 5 min.

上清液 (样本) \Rightarrow 每 50 μ L PCR 反应液添加 0.5 ~ 2 μ L 样本。

生物样本案例

鼠尾 \Rightarrow 3 mm 程度

指甲 \Rightarrow 5 mg 程度

生物样本案例

烟草叶 \Rightarrow 3 mm 程度

糯米 \Rightarrow 1 粒

种子 \Rightarrow 1 粒

* 通过匀浆, 可以提高一定的提取效率。

③ Proteinase K 处理法

生物样本 (添加量请参考右图)

↓←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

↓

↓ 用 Vortex 完全混匀

↓ 55°C, 孵育 60 min.以上

↓ 95°C, 孵育 5 min.

↓ (在 55°C下过夜进行的情况下, 有时可能不需要热失活)

↓ 用 Vortex 完全混匀

↓ 离心 12,000 rpm, 5 min.

上清液 (样本) \Rightarrow 每 50 μ L PCR 反应液添加 0.5 ~ 2 μ L 样本。

生物样本案例

鼠尾 \Rightarrow 3 mm 程度

指甲 \Rightarrow 5 mg 程度

烟草叶 \Rightarrow 3 mm 程度

精米 \Rightarrow 1 粒

制备裂解液也可在 96 孔板上进行。

作为一个案例, 下表将展示使用鼠尾的裂解液 (碱溶解法) 的制备方法。

将鼠尾 (3 mm 程度) 放入 96 孔板中

↓←加入 50 mM NaOH 180 μ L、盖子盖好用, 用 Vortex 完全混匀

↓SPIN DOWN (即使只是轻轻摇动让液体落下这样的程度, 也没有问题)

↓95°C, 孵育 10 min. (使用热循环仪)

↓←加入 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 20 μ L、盖子盖好用, 用 Vortex 完全混匀

↓SPIN DOWN (即使只是轻轻摇动让液体落下这样的程度, 也没有问题)

上清液 (样本) \Rightarrow 每 50 μ L PCR 反应液添加 0.5 ~ 2 μ L 样本。

※请将鼠尾切成切片, 使其能浸入液体中。

※请注意热碱液。

※处理后, 鼠尾不会完全溶解, 仅表面会溶解。

4. 为了顺利进行 PCR

- 请尽量使用 thin-wall 型反应管。
- 建议将灭菌水和引物事先小份分装保存，并每次使用后即丢弃剩余部分。

5. 关于纯化 PCR 产物

- 对于使用本产品扩增的 PCR 产物的纯化，可在进行酚/氯仿处理后实施乙醇沉淀。使用磁珠进行纯化时，有时会出现磁珠聚集（珠子吸附在管壁表面的现象），但纯化本身仍可进行。此外，通过在纯化前进行以下处理，有可能抑制磁珠聚集。

(1) Proteinase K 处理

在 50 μ L PCR 产物中，添加 1 μ L 10~20 mg/mL 的 Proteinase K，于室温下放置 1 分钟以上

(2) Tween 20 处理

在 50 μ L PCR 产物中，添加 10% Tween 20 1 μ L。

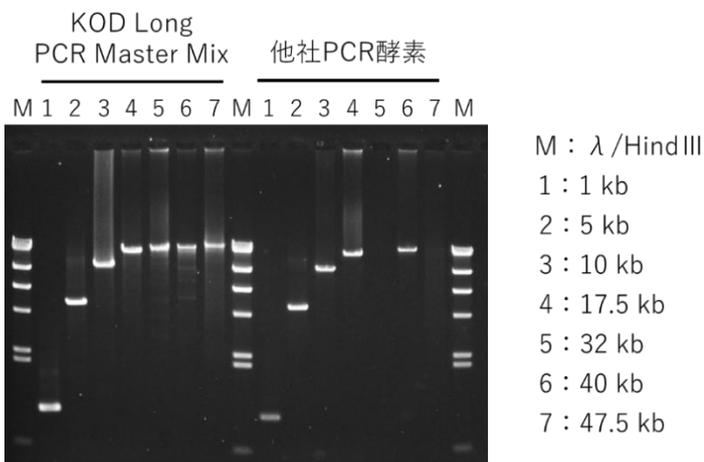
6. 关于 PCR 产物的克隆

- 使用本产品扩增的 PCR 产物末端为平末端 (blunt end)。因此，克隆 PCR 产物时，请使用预先磷酸化的引物，或对 PCR 产物末端进行磷酸化后，利用平末端进行克隆。
- 进行 TA 克隆时，使用本公司的 KOD DNA Polymerase 用 TA 克隆试剂盒 [TARget Clone™ -Plus- [Code No. TAK-201]]，即使是未纯化的 PCR 产物简便地进行 TA 克隆。此时，作为连接试剂，推荐使用 TA 克隆专用的 [Ligation high Ver.2 [Code No. LGK-201]]
- 使用本产品扩增的 PCR 产物经限制性内切酶处理后，利用其粘性末端进行克隆时，请在酶切前纯化扩增产物。若残留 DNA 聚合酶，其 3' \rightarrow 5' 外切酶活性可能在酶切过程中消除粘性末端。

7. 性能数据

(1) 通过高速 PCR 扩增 1~47.5 kb 的长链片段

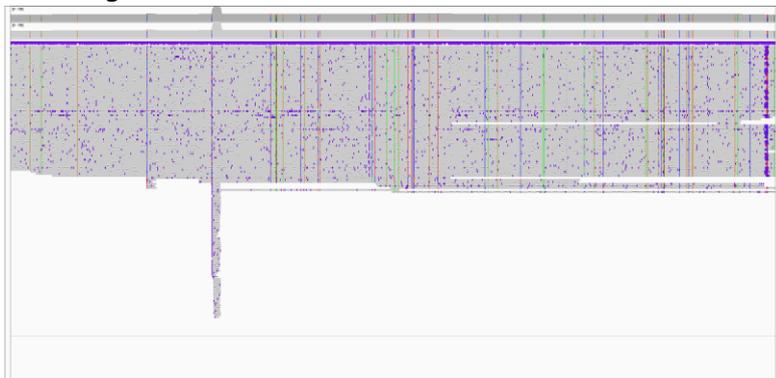
使用 KOD Long PCR Master Mix, 以人类基因组 DNA 为模板实施了长链片段扩增。结果显示, 本产品成功扩增了所有长链目的片段。



(2) PCR 产物的长读长检测

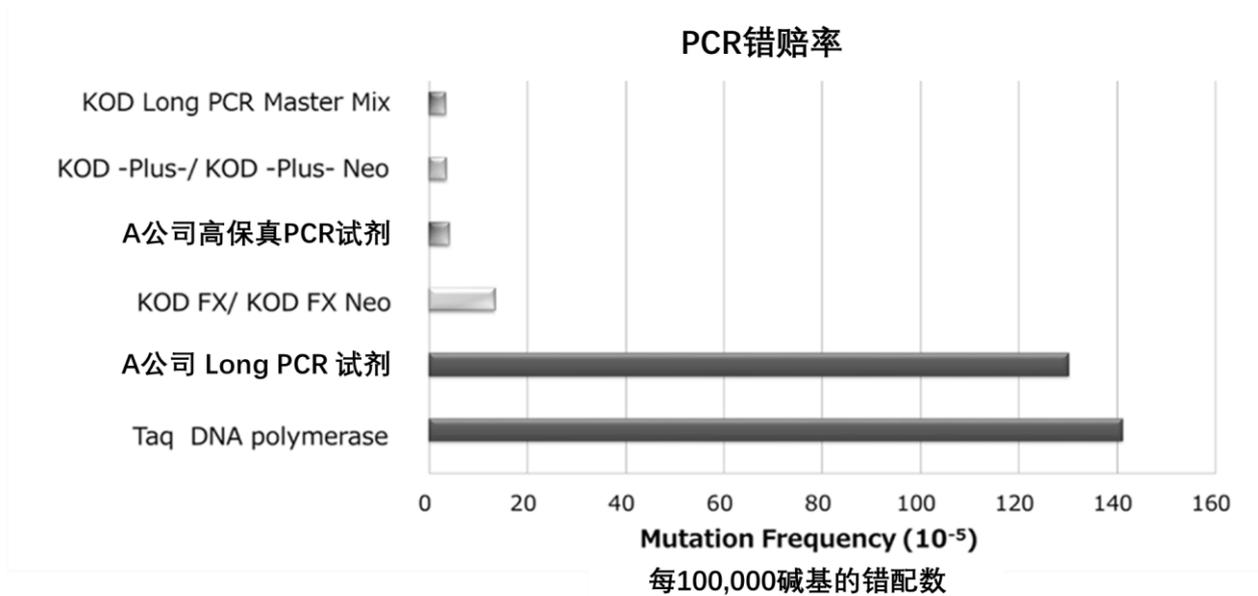
将上述扩增的 47.5kb PCR 产物纯化后, 使用 Ligation sequencing DNA V14 (Code. SQK-LSK114; Oxford Nanopore Technologies), 按照推荐 protocol 制备长读长解析文库。所得文库使用 Flongle Flow Cell (R10.4.1) (Code. FLO-FLG114; Oxford Nanopore Technologies) 进行长读长解析。结果显示, 获得了覆盖 47.5kb 全长的读长, 确认目的序列已正确扩增

通过 Integrative Genomics Viewer (IGV) 进行目标区域全长的扩增确认



(3) 保真性测试

以人类基因组 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。之后, 从各克隆中纯化质粒并进行测序, 确认序列。结果显示, KOD Long PCR Master Mix 的保真性优于 Taq DNA 聚合酶约 80 倍。



8. 常见问题及解决方案

问题	对策	具体案例参考标准
未观察到扩增产物。 扩增产物少。	变更循环条件	延伸时间延长至 10~30 sec./ kb
		循环数增加 2-5 个循环
		三步循环法中将退火温度降至 $T_m-7\sim T_m-10^{\circ}\text{C}$
	确认样本质量	添加合适的模板量
		为减少抑制物质的影响, 需减少模板量。
		重新确认样本制备方案
		纯化样本
	确认引物质量及添加量	分解或去除 RNA
		重新制备合成引物
观察到拖尾及额外条带。	变更循环条件	重新制备合成引物
		重新制备合成引物
		3 步循环法时, 提高退火温度。或者改为 2 步循环法
	确认样本添加量	2 步循环法时, 将延伸温度设定为 72°C , 或者改为 Step Down 法
		减少样本量
		循环数减少 2-5 个循环
	确认引物质量	重新制备合成引物
		重新设计引物 (较长的引物, 有时可消除拖尾及额外条带)。
	无法进行 TA 克隆	尝试使用专用的试剂盒

9. 关联产品

产品名	规格	Code No.
<高速·高保真 PCRMaster Mix> KOD One PCR Master Mix	1mL×5 支	KMM-101
<高速·高保真 PCRMaster Mix (含染色液) > KOD One PCR Master Mix -Blue-	1mL×5 支	KMM-201
<高效率·高成功率 PCRMaster Mix> KOD FLEX PCR Master Mix	1mL×5 支	KMX-101
<用于 KOD DNA Polymerase 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 μL1 支 (100 次份)	LGK-201

TOYOBO

[制造·销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司

交货期限·订货·产品内容·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