



# KOD -Plus-

使用 PCR 等的代表性实例

TOYOBO CO., LTD. Biochemical Operations Department  
OSAKA JAPAN

## —目录—

[1] KOD-PLUS-的特性.....	1
[2] PCR 反应的准备及条件.....	2
[3] PCR 实例 .....	3
实例 1 KOD-Plus 与各种其它耐热性 DNA 多聚酶之间 PCR 可信度的比较.....	3
实例 2 使用 KOD-Plus 对高 GC 含量样品进行 PCR 扩增 .....	5
实例 3 使用 KOD-Plus-进行 Site-directed mutagenesis.....	8
实例 4 使用 KOD-Plus-进行各类长链 PCR .....	11
实例 5 通过菌落直接法 PCR 对金黄色葡萄球菌进行基因特性分析.....	13
实例 6 使用含 KOD-Plus-的 RT-PCR 试剂盒“ReverTra -Plus-™”进行基因扩增.....	15
实例 7 RT 反应液量对下一步使用 KOD -Plus-进行 PCR 时的影响.....	18
[4] 有关 KOD -Plus- 的问题与解答 .....	20
[5] TOYOBO PCR 酶以及 RT-PCR 试剂盒目录.....	23

### 购买者须知

PCR ( Polymerase Chain Reaction , 多聚酶链反应 ) 知识产权归 F. Hoffmann-La Roche Ltd.及 Hoffmann-La Roche Inc.所有, 受美国专利号 4,683,195、4,683,202、4,965,188 及 5,075,216 保护。

## I KOD -Plus-的特性

KOD -Plus- 是一种新型的高保真 PCR 试剂，它允许对各种目标物进行 PCR。KOD -Plus-是从日本鹿儿岛县小宝岛上发现的硫质喷气孔中分离出来的 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 菌株（超耐热原始菌）生成的 KOD DNA 多聚酶<sup>1)</sup> 进行改良的品种。

在耐热 DNA 多聚酶<sup>1)</sup>中，KOD DNA 多聚酶具有最高的 DNA 合成效率以及 PCR 保真度。但是，其高校正功能可能会导致 PCR 过程中的一些问题。为此，我们已经根据最新的技术研制出了更优良的 PCR 试剂。特别是，添加了两种结合 KOD DNA 多聚酶的具有不同抗原决定部位的单克隆抗体以便提供更多的解决方案，另外包括对缓冲液组成进行了改变。

因此，我们已将一种具有很高 PCR 性能的新型的高保真 PCR 试剂投放到了市场。KOD -Plus-主要具有以下特性。

### ● 高保真度 ●

KOD -Plus-具有强 3' 5'核酸外切酶活性以及多聚酶活性，并因此提供了大约比 Taq DNA 多聚酶高 82 倍的保真度。

### ● 高耐热性●

KOD -Plus-对于各种 PCR 模板都很合适，某些 PCR 模板可能具有更高的高级结构并且某些 PCR 产物需用来进行克隆。

### ● 适合于“热启动”PCR●

在室温下多聚酶活性以及校正活性将受到抑制，并且通过两个单克隆抗体，PCR 反应之前由引物导致的非特异性反应以及消化作用也将受到抑制。

此外，由于这些抑制作用是由抗体引起，所以其作用在首次循环中的变性阶段中将消失并从此不再抑制随后的反应。

### ● 可用于高 GC 含量的模板 ●

对模板很高的亲和性为扩增高 GC 含量的目标物提供了可能性。

### ● 最佳的缓冲液组成 ●

对多种的目标物都可进行长链 PCR。

## 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)

## II PCR 反应的准备及条件

### PCR 操作程序

#### 1) PCR 反应混合液的配制

在配制 PCR 反应混合液之前，应将每种试剂摇匀。

成分	数量	浓度以及含量
用于 KOD -Plus-的 10 × PCR 缓冲液	5 μl	1 ×
2 mM dNTPs	5 μl	每种 0.2 mM
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2 μl	1 mM
引物混合液 (每种 10 μM)	1.5 μl	每种 0.3 μM
模板 DNA (每种 10 pg-200 ng)	≥1 μl	基因组 DNA 10 - 200 ng 质粒 DNA 1 - 50 ng
KOD -Plus- DNA 多聚酶*	1 μl ~ 50 μl	1.0 U
经过高压蒸汽灭菌处理的蒸馏水		

\*抗 KOD DNA 聚合酶抗体 : 1.6 mg/ml

\* KOD -Plus-的标准量应为 50 μl 的 PCR 反应混合液中含有 1 μl (1 U)。

我们研究了使用 1 U KOD -Plus-对多种目标 DNA 进行扩增, 确认到可扩增的 DNA 片段的长度最大可达 21、12 和 10 kbp, 分别对应λDNA、基因组 DNA 以及 RT 反应产物。

\* 在反应混合液中添加了所有试剂之后, 需通过旋涡振荡进行搅匀。

#### 2) PCR 循环条件

在进行循环之前, 需增加一个阶段以便在 94 °C 下对抗体进行两分钟的变性。

三阶段循环	两阶段循环
变性: 94 °C、15 秒	变性: 94 °C、15 秒
结合: (T <sub>m</sub> -5) °C、30 秒	伸长: 68 °C、1 分钟/kb
伸长: 68 °C、1 分钟/kb	
25 到 35 次循环	25 到 35 次循环

\* 伸长时间应设定为 1 分钟/1 kb 目标长度。

\* 关于计算融解温度 (T<sub>m</sub>) 的公式, 请参见本手册的第 21 页。

\* 通常, 应使用三阶段循环。如果使用高融解温度引物 (72 °C 或者更高的温度) 并在 PCR 过程中观测到了杂带时, 则尝试使用两阶段循环。

#### 注意

- 对于使用 KOD -Plus-进行的 PCR, 务必使用添附的其它专用产品: 用于 KOD -Plus-的 10 × PCR 缓冲液、25 mM MgSO<sub>4</sub> 以及 2 mM dNTPs。这些在成分上与传统的 KOD 以及 KOD Dash<sup>®</sup>所使用的有所不同。
- 使用 KOD -Plus-生成的 PCR 产物具有平滑末端。不建议用于 TA 克隆。
- 在将 RT 反应产物用作模板 DNA 时, 其较大量的 RT 反应混合液可能会抑制扩增的速度。一般而言, RT 反应液量应被确定为 PCR 反应混合物的 1/25 到 1/50 (对于 50 μl PCR 反应混合物而言是 1 到 2 μl)。但在这种情况下, 不必考虑用于 PCR 中的 RT 反应液中的 Mg<sup>2+</sup> 离子以及 dNTPs 的量。应使用标准数量。(f.c. 1 mM MgSO<sub>4</sub>, f.c. 0.2 mM dNTPs)
- 在根本没有检测到某个目标物的扩增时, 应考虑提高反应混合物中的 MgSO<sub>4</sub> 的浓度 (从 1 mM 提高到 1.2 mM)。当出现拖带时, 应考虑降低反应混合物中的 MgSO<sub>4</sub> 的浓度 (从 1 mM 降低到 0.8 mM)。

### III PCR 实例

#### 实例 1

#### KOD -Plus-与各种其它耐热性 DNA 多聚酶之间 PCR 可信度的比较

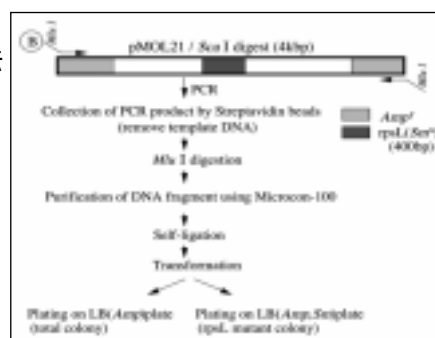
Masao Kitabayashi, Tsuruga Bio Research Center, Toyobo Co., Ltd.

我们同时比较了各种耐热性 DNA 多聚酶之间的 PCR 保真度以确认具有准确序列的基因扩增产物的克隆的概率。

#### 方法

我们根据 Mo et.al.<sup>2)</sup>确定的使用 rpsL 基因测量 PCR 保真度的方法对 KOD -Plus-的 PCR 保真度进行了检测。结果如右图所示。

通过测量抗链霉素 (Sm) 转化细胞在所有抗氨卡青霉素 (Amp) 转化细胞中所占的比例来获得突变频率。



#### 结果及讨论

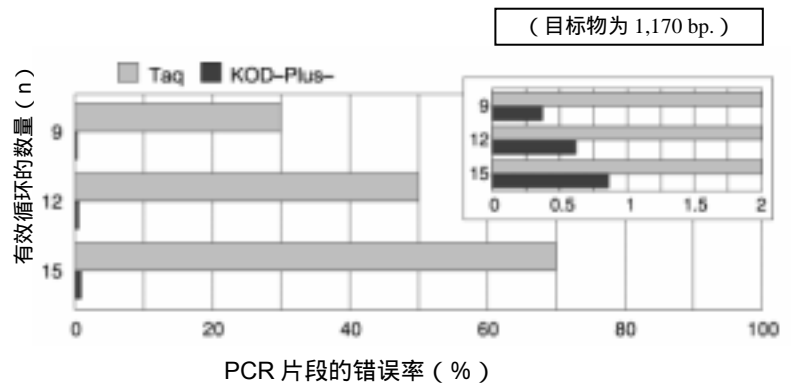
表 1 说明了 PCR 保真度的检测结果。KOD -Plus-的准确度极大地优于 Taq DNA 多聚酶的准确度。而且与其它 $\alpha$ 型 DNA 多聚酶相比，KOD -Plus-具有最高等级的准确度。

表 1. 各种聚合酶的 PCR 保真度

Polymerase	Colonies		Mutant Frequency ( % )
	Total	Mutant	
<b>KOD -Plus-</b>	10,610	10	0.09
KOD	9,490	14	0.15
$\alpha$ 类型的耐热性多聚酶 (A 公司的产品)	10,900	68	0.63
$\alpha$ 类型的耐热性多聚酶 (B 公司的产品)	6,520	76	1.16
Taq	10,560	780	7.39

接下来,我们根据对 PCR 保真度的检测结果计算了 KOD -Plus- 以及 Taq DNA 多聚酶的 PCR 扩增产物的突变率。结果如图 1 所示。

结果说明 Taq DNA 多聚酶所扩增的基因产物通过克隆检测表明其准确性极低。因此,需要对多个基因序列进行确认以便在克隆中检测出准确序列扩增基因产物。所以,如要提高实验的效率,建议在 PCR 中使用 KOD -Plus-。



PCR 片段的错误率 (%)  
有效循环的数量 (n) 计算如下:  
“(2<sup>n</sup>) = (DNA 模板的数量) / (PCR 模板的数量)”。

图 1. Taq 与 KOD -Plus-的错误率的比较

## 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) Mo, H., Maki, H., and Sekiguchi, M. *J. Mol. Biol.*, 222 : 925-936 (1991)

## 实例 2

## 使用 KOD -Plus 对高 GC 含量样品进行 PCR 扩增

Toshihiro Kurosaka, Tsuruga Bio Research Center, Toyobo Co., Ltd.

通过将富含 GC 序列的基因来进行 PCR 以便将 KOD -Plus-的扩增效果与 rTaq DNA 多聚酶的扩增效果进行比较。此外，我们确认了添加 DMSO 可能产生的影响。

## 方法

我们制备了一种含有假单胞菌脂肪酶基因的质粒作为模板，其中 GC 含量大约 70%。将大约 2 kb 的此模板作为目标物，如下所述配制 PCR 混合液并进行 25 次 PCR 循环。此外，为了确认 DMSO 的影响，在添加 DMSO 的情况下，我们将人体基因组的 DNA 作为模板，以大约 2 kb 的 TGF- $\beta$ 基因（大约 70% 的 GC 含量）作为目标物，并且以与上述相同的方式进行了 PCR。对于 rTaq DNA 多聚酶，在与上述相同的条件下（不包括延伸温度）进行 PCR。

## - PCR 混合液 -

D.W.	34.5 ( $\mu$ l )
10 $\times$ KOD -Plus- 缓冲液	5
2 mM dNTPs	5
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2
引物 ( 每种 10 $\mu$ M )	1.5
模板 DNA* <sup>2</sup>	1
KOD -Plus- ( 1 U/ $\mu$ l )	1
	50 $\mu$ l

\*1：由于 KOD -Plus-含抑制多聚酶活性以及 3' 5'核酸外切酶活性的抗体，所以无需用冰块进行样品的配制。

\*2: 关于模板 DNA 的量，标准数量为每 50  $\mu$ l 的反应混合液使用 10 到 200 ng 的基因 DNA 以及 1 到 50 ng 的质粒 DNA。

## - PCR 循环条件 -

94 ( 2 分钟 )  
 94 ( 15 秒 )  
 A ( 30 秒 )  
 68 ( B 分钟 )

<C 次循环>

A : Tm- ( 5 - 10 )  
 B : 1 分钟/kb  
 C : 25 到 35 次循环

## 注释

列出了 KOD -Plus-以及其它 PCR 酶之间的 PCR 条件的差别

	Taq, Tth	KOD, KOD Dash®	KOD -Plus-
MG 浓度	1.5 mM	1 - 1.2 mM	1 mM <sup>*3</sup>
结合温度	Tm- (5 - 10)	Tm - Tm-5	Tm- (5 - 10)
伸长温度	72 - 75	72 - 74	68 <sup>*4</sup>
伸长时间	1 分钟/kb	30 秒./kb	1 分钟/kb
酶浓度	1.25 - 2.5 U/50 µl	1.25 - 2.5 U/50 µl	1 U/50 µl

\*3: 当未检测到扩增时, 考虑增加反应混合物中 Mg 的浓度。此外, 当出现拖带时, 应降低 Mg 的浓度。

\*4: 应尽可能地在 68 温度下进行伸长反应。当在 72 温度下进行该反应时, 可能无法检测到扩增。

## 结果及讨论

对于 KOD -Plus-, 我们可以确认在正常条件下的强扩增作用, 然而, 对于 rTaq DNA 多聚酶, 可能只有在添加 5% 的 DMSO 或者 A 公司的 PCR 增强剂的情况下才能确认到扩增 (图 1)。除了在 Mg<sup>2+</sup> 浓度以及伸长温度等中存在差异外, KOD -Plus- 是一种能以与 Taq 以及 Tth DNA 多聚酶等相同的方式简便地进行 PCR 反应的酶。另外, 该研究的结果间接表明 KOD -Plus- 是一种与 Taq DNA 多聚酶等相比, 对高 GC 含量的目标物扩增更有效的酶。我们也研究了 TGF-β 基因的扩增条件 (大约 70% 的 GC 含量), 并且发现对于通常的 30 次循环, 目标物未被进行有效扩增, 只有通过 DMSO 的添加才能实现有效扩增。添加 2 到 5% 的 DMSO 产生了有效扩增, 其中 5% 更有效 (图 2)。

检测保真度的结果表明添加 2 到 5% 的 DMSO 不会降低保真度。而且, 此时, 我们可以确定那些通过在反应系统中添加 2 到 5% 的 DMSO 极大地提高了在通常条件下很难达到的目标物扩增。我们还确认到了添加 DMSO 对其它目标物的有效扩增中也非常有效。此外, 虽然存在对添加 DMSO 会降低保真度的担心, 但是实际并未观测到此类情况。

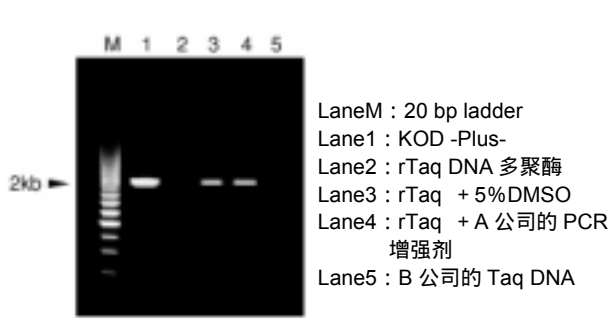


图 1

高 GC 含量的目标物扩增效果的比较

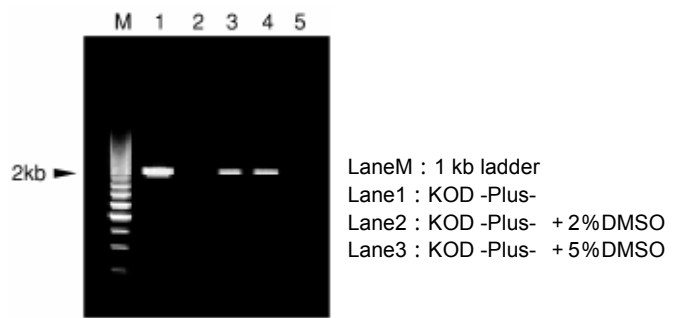


图 2

DMSO 对于 TGF-β基因扩增效果的影响

此外，在使用 KOD -Plus-应注意，其 PCR 生成产物是平衡末端产物。

α型的 DNA 多聚酶例如 Pfu 以及 KOD -Plus-并不适于进行 TA 克隆。因此，应通过平衡末端连接来进行克隆，或者为了进行 TA 克隆可对生成产物进行一次纯化之后使用 Taq DNA 多聚酶等进行操作以获得 A 末端。

通过理解此文提到的 KOD -Plus-的特性，相信读者可以更有效地使用 KOD -Plus-。

## 参考文献

- 1) T. Imanaka et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4504-4510 (1997)
- 2) H. Maki et al., *J. Mol. Biol.*, **222**: 925-936 (1991)
- 3) T. Imanaka et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, **125**: 983-986 (1999)
- 4) T. Imanaka et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, **126**: 762-768 (1999)

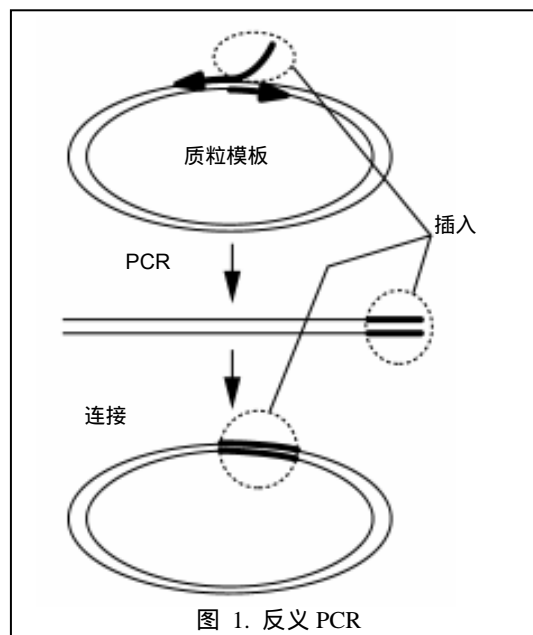
## 实例 3 | 使用 KOD -Plus-进行 site-directed mutagenesis

Katsumi Tsuji, Tsuruga Bio Research Center, Toyobo Co., Ltd.

我们将反义 PCR 作为借助于使用 KOD -Plus-的 PCR site-directed mutagenesis 的实例进行介绍。

反义 PCR 是一种通过 PCR 扩增整个质粒全长的方法，并且两对反转引物并非互为同源，其在引物设计中导入了碱基置换、插入或者缺失（图 1）。

此次，通过进行扩增整个 pUC19 (2.69 kb) 全长的 PCR，在质粒的 5'末端的 *lacZ*  $\alpha$ 肽中导入了 His-Tag 以及 *Bgl*II 部位。



### 方法

预处理：

以下两种引物经过一定的修饰，以便在随后的 PCR 中加以使用。

5'-CAT-CAT-CAT-CAT-CAT-CAT-AGA-TCI-ACC-ATG-ATT-ACG-CCA-AGC-TTG-CAT-GCC-3'

6 × His

*Bgl*II 部位

5'-CAT-AGC-TGT-TTC-CTG-TGT-GAA-ATT-GTT-ATC-CGC-3'

对于所有这两种引物，通过使用多核苷酸激酶（TOYOBO，编号：PNK - 111），实施了 5' - 磷酸化作用。

如下所述，配制 PCR 混合液以进行 PCR。

#### - PCR 混合液 -

D.W.	34.1 (μl)
10 × KOD -Plus-缓冲液	5
2 mM dNTPs	5
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2.4
磷酸化引物混合物 (每种 10 μM)	1.5
pUC19 (50 ng/μl)	1
KOD -Plus- (1 U/μl)	1
	50 μl

#### - PCR 循环条件 -

94 (2 分钟)	} <5 次循环>
94 (15 秒)	
60 (30 秒)	
68 (3 分钟)	



## 结果及讨论

对于在 90 个菌落中随机选择的 86 个菌落,在通过菌落直接法 PCR 生成的 PCR 生成物中确认了 *Bg/II* 形成的断裂。此外,测序确认表明了 His-Tag 以及 *Bg/II* 部位已被准确地进行插入。

由此,可以认为 KOD -Plus-的使用更便于通过 PCR 进行定点突变。

## 参考文献

- 1) Takagi, M., Nishioka, M., Kakiyama, 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)

## 实例 4 | 使用 KOD -Plus-进行各类长链 PCR

Masao Kitabayashi, Tsuruga Bio Research Center, Toyobo Co., Ltd.

我们研究了各种模板中可扩增的目标物长度，将结果呈现如下。

### 方法

如下所述，配制 PCR 混合液以便进行 PCR。

#### - PCR 混合液 -

D.W.	33.5 ( $\mu$ l )
10 $\times$ KOD -Plus- 缓冲液	5
2 mM dNTPs	5
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2
引物 ( 每种 10 $\mu$ M )	1.5
模板 DNA* <sup>1</sup>	2
KOD -Plus- ( 1 U/ $\mu$ l )	1
	50 $\mu$ l

#### - PCR 循环条件 -

94 ( 2 分钟 )	} <30 到 35 次循环>
94 ( 15 秒 )	
60 ( 30 秒 )	
68 ( A* <sup>2</sup> 分钟 )	

\*1：调整模板 DNA 以便根据总量分别制备 50 ng 的  $\lambda$ DNA、1 ng 的质粒 DNA、200 ng 的基因组 DNA 以及 2  $\mu$ l 的 cDNA ( RT 反应混合物中的 20  $\mu$ l )。

\*2：以 1 分钟/kb 来计算以及设置反应中的伸长时间。

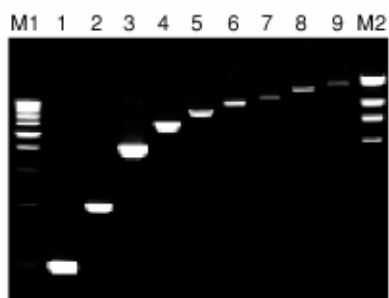
### 结果及讨论

到目前为止我们所进行的研究中，已经表明了通过 PCR 所进行的 DNA 扩增具有良好的性能以及扩增效率，并且通过分别将 DNA、质粒 DNA、基因组 DNA 以及 cDNA 作为模板，分别观测到了 21, 8, 12.3 以及 6.8 kb 的被扩增片段。

长链 PCR 的成功很大程度上取决于模板 DNA 的状态。建议尽可能地以最高的浓度来存储模板 DNA 并且在使用之前立即用无菌水等来稀释成反应所需的量。此外，当质粒 DNA 被用作模板时，将 MgSO<sub>4</sub> 浓度从 1.0 改为 1.5 mM 可能会导致扩增数量的增加。

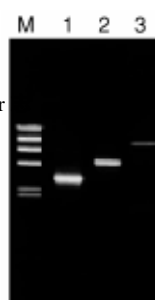
即使使用比在这里所述更短的目标物长度，可能会由于目标物的拷贝数量、基因序列的细节或者引物特异性而导致扩增失败。在这种情况下，请考虑在反应体系或者 MgSO<sub>4</sub> 浓缩液中添加浓度为 2 到 5% 的 DMSO 浓缩液。

< 模板：λDNA >



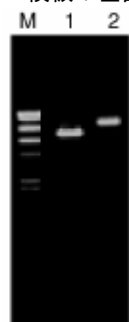
M1 : 1 kb ladder  
 M2 : λHind III marker  
 1 : 目标物 1 kb  
 2 : 目标物 2 kb  
 3 : 目标物 4 kb  
 4 : 目标物 6 kb  
 5 : 目标物 8 kb  
 6 : 目标物 10 kb  
 7 : 目标物 12 kb  
 8 : 目标物 15 kb  
 9 : 目标物 21 kb

< 模板：质粒 DNA >



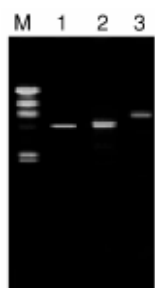
M : λHind III marker  
 1 : 目标物 3 kb  
 2 : 目标物 5 kb  
 3 : 目标物 8 kb

< 模板：基因组 DNA >



M: λHind III marker  
 1 : 人类肌球蛋白重链 8.4 kb  
 2 : 人类β-globin 12.3 kb

< 模板：cDNA (RT 反应液) >



M : λHind III marker  
 1 : 人类转铁蛋白受体 4.5 kb  
 2 : 人类结节性硬化蛋白 5.3 kb  
 3 : 人类多聚酶 ε 6.8 kb

## 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)

## 实例 5

## 通过菌落直接法 PCR 对金黄色葡萄球菌进行基因特性分析

Hisashi Tsuchizaki, Department of Bioactive Molecules,  
National Institute of Infectious Diseases  
Kunimoto Hotta, Technology Department, Japan  
Microbiological Clinic Co., Ltd.  
Department of Bioactive Molecules,  
National Institute of Infectious Diseases

在菌落直接法 PCR (以下简称 CD-PCR 方法) 中, 通过直接从一个菌落中将一个完整的细菌添加到反应混合液中进行 PCR, 而不进行任何其它的变化。CD-PCR 通常是被用作一种检测革兰氏阴性菌株如大肠杆菌的方法, 但是, 到目前为止, 由于尚未取得良好的再现率, 该方法对于革兰氏阳性菌株例如金黄色葡萄球菌并不适用。

在此, 我们介绍一个实例, 在该实例中, 抗药物基因 MRSA 将同时由复合 CD-PCR 方法进行检测, 而该方法是根据将添加到反应混合液中的细菌数量降低到尽可能少的策略来进行制定的, 更准确地说, 就是使用消毒过的牙签来添加不可见量的细菌来实现。

## 方法

使用显示不同目标基因特性的五个菌株来进行 CD-PCR, 另外再选取一个通过临床分离的 MRSA 菌株进行 PCR (图 1)。五个抗药物基因被定义为目标物并且引物被设计用来对于每个目标基因能够生成不同大小的扩增产物 (大约 100 到 150 bp) (参见以下内容)。

其次, 我们研究了可能通过作用于菌落进而对 CD-PCR 产生影响的因素。我们选取了以下三点作为研究对象: “培养基类型的影响”, “后培养与实验中第二次被使用之间的存储期” 以及 “所添加细菌的量”。此外, 针对所添加细菌的量, 我们设置了 12 个装有反应混合液的采样管, 一个在其尖端上具有可见量细菌的牙签被放入第一个采样管之内进行清洗 (图 2, 泳道 1), 随后将牙签的尖端轻轻地依次浸入其余试管的溶液中。(图 2, 泳道 2 - 12)。

## - PCR 混合物 -

成份	最终浓度
10 × KOD -Plus- 缓冲液	1 ×
dNTPs	每种 0.2 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
aac (6') /aph (2'')引物	每种 0.5 μM
aad (9) 引物	每种 0.4 μM
mecA 引物	每种 0.2 μM
aph (3') - III 引物	每种 0.2 μM
add (4',4'') 引物	每种 0.2 μM
KOD -Plus- (1 U/μl)	0.4 U

\* 除了使用了 20 μL 的反应体系之外, 皆根据试剂盒的操作方法来进行 CD-PCR。

## - PCR 循环条件 -

95 (3 分钟)	} <30 次循环>
95 (30 秒)	
50 (30 秒)	
68 (1 分钟)	
68 (3 分钟)	

## 结果及讨论

对上述三个作用因素进行确认的结果表明，培养基的类型或者已经使用培养之后在冷藏库中存储了很长时间的菌落对结果不会产生任何影响。唯一观测到的影响是由所添加细菌的量。因此，在泳道 1 中，PCR 扩增被抑制，表明认为成功适用于从 *E. coli* 出发进行的 CD-PCR 所需要的细菌量未能给 MRSA 菌株带来理想的 CD-PCR 结果，然而，在泳道 2 及其后的每个泳道中都观测到了有效 PCR 扩增，这使我们认为当使用极少量的细菌时，可以得到稳定的 PCR 扩增（图 2）。

根据这个结果，我们得出结论，即以下是为 MRSA 能否被成功进行 CD-PCR 的关键因素：允许添加到 PCR 反应中极少量的细菌，准确地说，就是要求在每 20 μl 中有 10<sup>2</sup> 至 10<sup>4</sup> 菌落形成单位。

此外，当使用 Taq DNA 多聚酶以及其它传统 DNA 多聚酶时，未能取得良好的再现率，这表明使用具有良好性能的 DNA 聚合酶也是非常重要的。

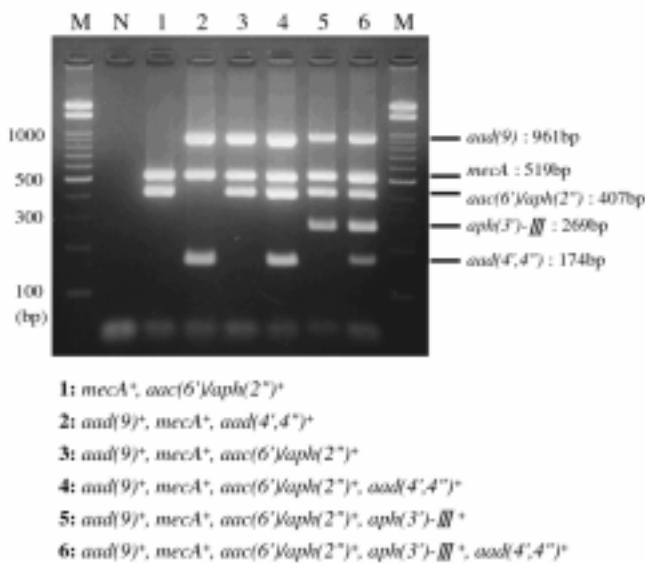


图 1. 使用 5 重复合 CD-PCR 进行的 MRSA 抗药性 DNA 检测

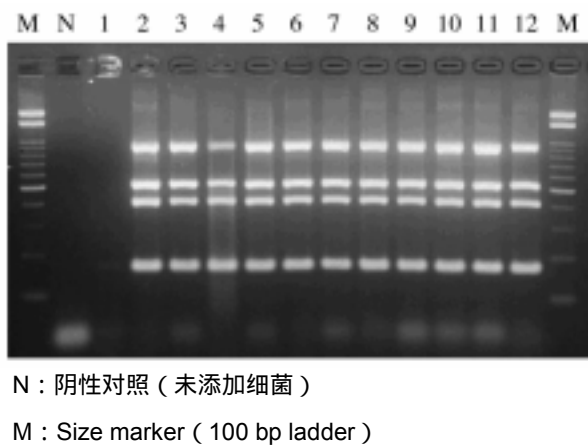


图 2. 所添加细菌量带来的影响

如上所述，将添加到反应混合液中的细菌量减到极少以及使用具有高性能的 DNA 多聚酶例如 KOD-Plus-是进行在金黄色葡萄球菌中产生具有可重复结果的 CD-PCR 的关键。

除了 MRSA 以外，我们也确认了将 CD-PCR 用于放线菌类以及肠球菌（革兰氏阳性细菌）、退伍军人病菌属（革兰氏阴性细菌）以及念珠菌属（真菌）所产生的积极效果。

## 参考文献

1) Tsuchizaki, H., Ishikawa, J., Hotta, K., *Jpn. J. Antibiot*, **53** : 422-429(2000)

## 实例 6

## 使用含 KOD -Plus-的 RT-PCR 试剂盒“ReverTra -Plus-™”进行基因扩增

Masao Kitabayashi, Tsuruga Bio Research Center, Toyobo Co., Ltd.

在此,我们介绍采用 KOD -Plus-的 RT - PCR 试剂盒“ReverTra-Plus-™”的扩增性能,以及来自于其它公司的高保真度 RT-PCR 试剂盒的一些可比较数据。

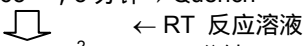
## 方法

1. Oligo (dT)<sub>20</sub> 引物\*

根据每个试剂盒的包装说明书,配制反应溶液。

将从人类 HeLa 细胞中生成的 1 μg 的总 RNA 用作模板并将 50 pmol 的 oligo (dT)<sub>20</sub> 用作引物。

## RT 反应条件

65 , 5 分钟 → Quench\*<sup>1</sup>  
  
 42 (50\*<sup>2</sup>) , 60 分钟  
 85 , 5 分钟  
 在 4 下进行保存

## PCR 循环条件

94 , 2 分钟  
 98 , 10 秒  
 60 , 30 秒  
 68 , X 分钟/kb

35 次循环

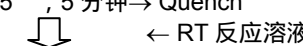
ReverTra -Plus-™ 以及 A、B、D 公司试剂盒: X 分钟 = 1 分钟。  
 C 公司试剂盒:  
 X 分钟 = 3 分钟。

## 2. 基因特异引物\*的使用

如同以上所述,根据每个试剂盒的包装说明书配制反应溶液。

将从人类 HeLa 细胞中生成的 1 μg 的总体 RNA 用作模板并使用 5 pmol 的基因特异引物。

## RT 反应条件

65 , 5 分钟 → Quench\*<sup>1</sup>  
  
 42 (50\*<sup>2</sup>) , 60 分钟  
 85 , 5 分钟  
 在 4 下进行保存

## PCR 循环条件

目标: DMD 4.1, 5.9 kb  
 (dystrophin)

94 , 2 分钟  
 98 , 10 秒  
 55 , 30 秒  
 68 , 6 分钟

35 次循环

目标物: DMD 7.7 kb  
 (dystrophin)

94 , 2 分钟  
 98 , 10 秒  
 65 , 30 秒  
 68 , 7.5 分钟

35 次循环

目标物: DMD 9.5 kb  
 (dystrophin)

94 , 2 分钟  
 98 , 10 秒  
 60 , 30 秒  
 68 , 9.5 分钟

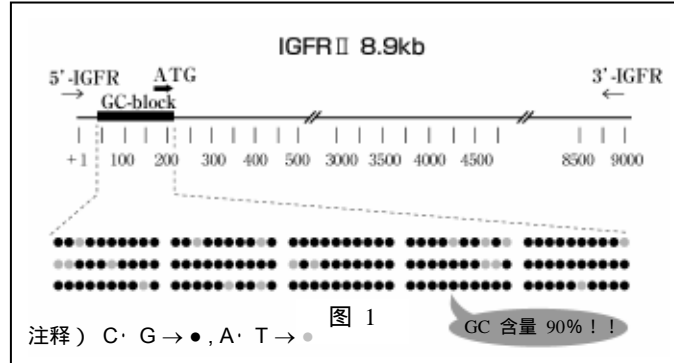
35 次循环

3. 研究了高 GC 含量片断以及长目标物片断的扩增效率。

将 8.9 kb 的类胰岛素生长因子 II 受体 (IGFR II) 基因作为目标物。

IGFR II 基因具有一个被称为 GC-block 的区域, 其在 5' 末端附近有大约 90% 的 GC 含量 (图 1)。

如同以上所述, 根据每个试剂盒的包装说明书配制反应溶液。将从人类 HeLa 细胞中生成的 1 μg 的总 RNA 用作模板并将 50 pmol 的 oligo (dT)<sub>20</sub> 用作 RT 引物。



PCR 循环条件 (Stepdown PCR)

- 94 , 2 分钟
  - 98 , 10 秒
  - 74 , 9 分钟
  - 98 , 10 秒
  - 72 , 9 分钟
  - 98 , 10 秒
  - 70 , 9 分钟
  - 98 , 10 秒
  - 68 , 9 分钟
  - 68 , 7 分钟
- 5 次循环
- 5 次循环
- 5 次循环
- 25 次循环

- \*1: 在 RT 反应之前, 模板 RNA 以及 RT 引物都必须进行热失活。  
本步骤对于增强 RT 延充反应非常重要。
- \*2: 通过遵循为每种公司产品所提供的使用说明来获得反应温度 (循环) 条件。
- \*3: 由于 C 以及 D 公司的试剂盒在使用方法 2 以及方法 3 时只产生少量扩增, 所以未对这两家公司的试剂盒进行结果比较。

**\*RT 引物**

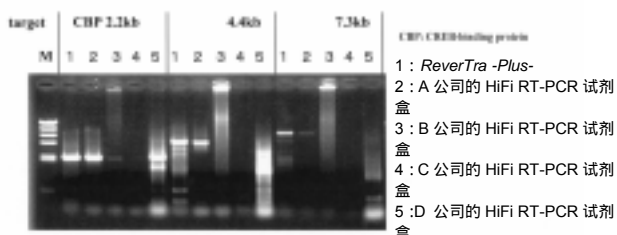
本试剂盒中提供了 oligo (dT)<sub>20</sub> 引物、随机引物以及基因特异引物。

oligo (dT)<sub>20</sub> 引物或者随机引物使用可以通过 PCR 扩增各种基因。如果具有 poly A-tail 的 RNA 被用作为模板, 则建议使用 oligo (dT)<sub>20</sub> 引物。对于没有 poly A-tail 的 5 kb 或者更短的目标物, 应使用随机引物。如果使用基因特异引物, 则其 RT 反应只能被用于单个基因的扩增。

然而, 它同时可能是一种提高 RT-PCR 扩增灵敏度的有效引物。应根据具体用途来选择 RT 引物。

## 结果及讨论

1. ReverTra -Plus-™ 的应用使得能够对每个 CBP ( CREB 结合蛋白 ) 的 2.2, 4.4, 以及 7.3 kb 的目标物进行扩增 ( 图 2 )。Oligo (dT)<sub>20</sub> 引物可以使长链目标物 ( 5 kb 或更长 ) 以及短链目标物得到极好的扩增结果。



2. 当将 oligo (dT)<sub>20</sub> 用作 RT 引物时, 此目标物未能实现充分的扩增。因此, 我们使用了一个基因特异引物来提高扩增的灵敏度。ReverTra -Plus-™ 的应用使得能够对每个 DMD 4.1, 5.9, 7.7, 9.5 kb 的目标物进行扩增 ( 图 3 )。此外, 对于基因特异引物而言, 使用位于下游的 RT 引物能产生比使用其它目标基因序列的 PCR 引物更成功的扩增。

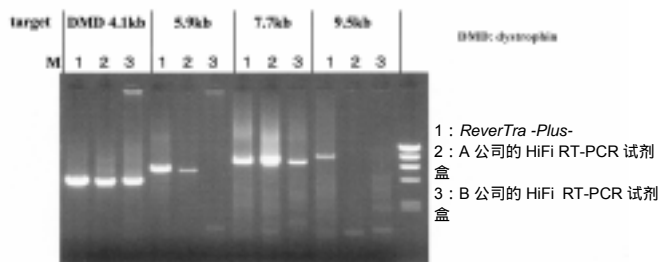


Figure 3. RT-PCR result using gene specific primer

3. 当采用两阶段以及三阶段 PCR 循环条件进行 PCR 时, 观测到了许多杂带。因此, 我们采用了 stepdown PCR 方法, 在这种方法中, 结合温度及伸长温度被逐渐降低。使用其它公司的 HiFi RT-PCR 试剂盒则无法使 PCR 反应进行到 GC - block 区域以上。相反, 我们的 ReverTra -Plus-™ 能够使 PCR 反应顺利通过 GC - block 区域而实现目标物的扩增 ( 图 4 )。

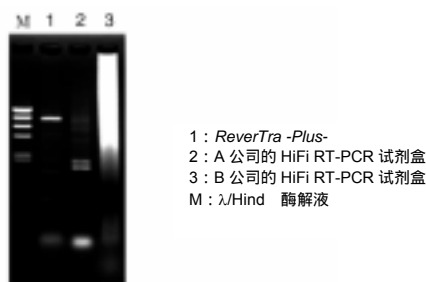


图4. 对高 GC 含量目标物以及长链目标物产生显著扩增的研究结果

## 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) Hashimoto, H., Nishioka, M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., Inoue, T., Kai, Y., *J. Mol. Biol.*, **306**, 469-477 (2001)

## 实例 7

## RT 反应液量对下一步使用 KOD -Plus-进行 PCR 时的影响

Toshihiro Kurosaka, Tsuruga Bio Research Center, Toyobo Co., Ltd.

针对 RT-PCR 的应用，我们探讨了 RT 反应液量对于扩增的影响。根据相应的研究结果，确定了最适合的 RT 反应液量。

## 方法

在本实例中，将 TOYOBO 的 ReverTra Ace<sup>®</sup>\* 与一个 oligo dT 引物一起加以使用，以便在 42 °C 下进行 RT 反应 30 分钟。接下来，在 50 µl 的 PCR 反应系统中分别添加 1、2、以及 10 µl 的本反应混合液以便进行 PCR。在本研究中，我们通过将 0.5 µg 的 HeLa 细胞总 RNA 用作模板来对 3.5 kb 的转铁蛋白受体基因进行扩增，而通常该扩增被认为是很难进行的。我们根据以下条件，配制了 PCR 混合液以便进行 PCR。

\* ReverTra Ace<sup>®</sup>（编号：TRT-101，1 × 10,000 单位）是一种用于 RT-PCR 的酶。

有关详细内容，请参见本书第 24 页。

## - PCR 混合液 -

D.W.	34.5 (µl)
10 × KOD -Plus- 缓冲液	5
2 mM dNTPs	5
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2
引物 (每个 10 µM )	1.5
模板 DNA <sup>*2</sup>	1
KOD -Plus- (1 U/µl)	1
50 µl	

## - PCR 循环条件 -

94 (2 分钟)	} <C 次循环>
94 (15 秒)	
A (30 秒)	
68 (B 分钟)	

A : Tm- (5 - 10)

B : 1 分钟/kb

C : 25 - 35 次循环

\*1 : 由于 KOD -Plus- 是一种抑制 DNA 聚合酶以及 3' 到 5' 核酸外切酶活动的抗体，所以无需使用冰块来配制样品。

\*2 : 对于模板 DNA 的数量，将每 50 µl 的反应混合物的 10 到 200 ng 的基因组 DNA 以及 1 到 50 ng 的质粒 DNA 用作相应的标准。

## 结果及讨论

RT-PCR 反应的结果发现, 对于在 PCR 反应系统中使用 1  $\mu$ l (2%) RT 反应液量, 得到了最强烈的扩增, 然而对于 10 $\mu$ l (20%) 或更多的 RT 反应液量, 则未观测到任何扩增 (图 1)。在使用随机引物以及特异引物的 RT 反应中观测到了类似的趋势。当我们研究在 RT-PCR 中应用 KOD -Plus-的情况时, 表明 PCR 反应混合液中的 RT 产物可能会极大地降低 PCR 效率。因此, 如果未能取得一个满意的 RT-PCR 结果时, 应考虑减少 PCR 反应混合液中的 RT 产物的量。若欲将全量的 RT 反应混合液用作模板, 则需在乙醇沉淀清除残盐之后再使用该模板。

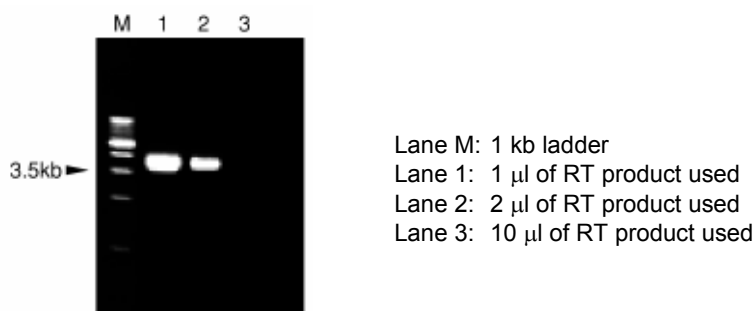


图 1. 在 RT-PCR 后的 RT 反应液量产生的影响

## 参考文献

- 1) T. Imanaka et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4504-4510 (1997)
- 2) T. Imanaka et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, **125**: 983-986 (1999)
- 3) T. Imanaka et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, **126**: 762-768 (1999)

**问题.** 在循环时，可以将失活温度达到几度？

**解答.** 最多可到 98 、30 秒以及 30 次循环。

**问题.** 最佳的伸长反应温度是几度？

**解答.** 68 比 72 更好。

**问题.** 是否可以使用其它 PCR 酶的 dNTPs？

**解答.** 应使用所添附的 dNTPs。

**问题.** 在进行 RT-PCR 时，应注意些什么？

**解答.** 建议将 RT 反应液量调整为 PCR 反应混合液量的 2%或更低。

**问题.** 如何计算 PCR 中的 Tm 值？

**解答.** 用来计算低聚核苷酸的 Tm 值的公式如下：

[1] 对于长度为 18 b 或更短的低聚核苷酸，

$$T_m = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$$

[2] 对于长度为 18 b 或更长的低聚核苷酸，

$$T_m = 81.5 + 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.4 (\%G+C) - (600/N)$$

\* A : 低聚核苷酸内 A 的数量

C : 低聚核苷酸内 C 的数量

G : 低聚核苷酸内 G 的数量

T : 低聚核苷酸内 T 的数量

%G + C : 低聚核苷酸内 G + C 的百分比

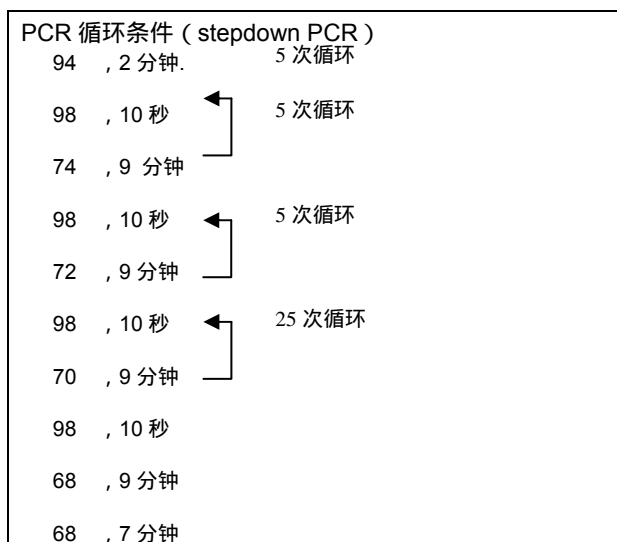
N : 低聚核苷酸的长度 (mer)

[Na<sup>+</sup>] : 溶液中的浓度 (M)

**问题.** 如何在 stepdown PCR 中进行使用？

**解答.** 以下方法作为实例进行参考。

关于详细内容，请参见本书的第 12 到 13 页。





## V TOYOBO PCR 酶以及 RT-PCR 试剂盒的目录

TOYOBO DNA 多聚酶的比较表

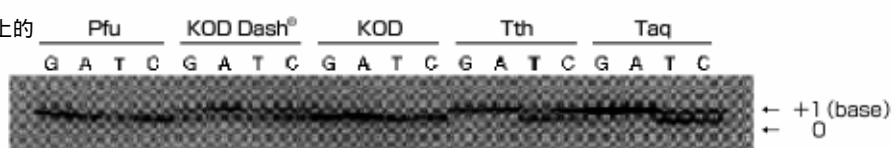
产品名称	KOD -Plus-	KOD Dash®	KOD DNA 多聚酶	rTth DNA 多聚酶	rTaq DNA 多聚酶
编号	KOD-201 (1 × 200 单位)等	LDP-101 (1 × 250 单位) 等	KOD-101 (1 × 250 单位)	TTH-301 (1 × 250 单位) 等	TAP-201 (1 × 250 单位) 等*1
所使用的酶	KOD + 抗 KOD 抗体	KOD + 变异型的 KOD	KOD DNA 多聚酶	rTth DNA 多聚酶	rTaq DNA 多聚酶
扩增的极限值 : 基因组 DNA	12 kb	10 kb	2 kb	4 kb	4 kb
扩增的极限值 : cDNA	10 kb	10 kb	2 kb	4 kb	4 kb
扩增的极限值 : λ 以及质粒 DNA	21 kb *2	15 kb	6 kb	4 kb	4 kb
反应速度[碱基/每秒]	100 - 120	100 - 120	100 - 120	30 - 60	30 - 60
高 GC 含量的模板的扩增	○	○	○	△	×
准确度 (与 Taq 相比)	大约 82 倍	3.4 倍	20 - 50 倍	1 倍	1 倍
热启动方法的效果	○	×	×	×	×
TA 克隆 *3	×	△	×	○	○
备注	具有极高的准确度	具有极高的扩增效率	具有极高的准确度	高性价比	-

\*1 rTaq DNA 多聚酶 (TAP - 201) 与  $Mg^{2+}$  液分离开来销售, 但也可提供含  $Mg^{2+}$  的产品型号。

\*2 还未对 10 kb 或者更长的目标物进行过研究。

\*3 每种酶的末端转移酶特性

结合多聚酶的 5' 末端上的  
反义引物序列。



对于大多数使用 Taq 以及 Tth 进行扩增的 PCR 产物, 其在 5' 末端上有 G 或 A 的一个多余碱基。  
但是对于 KOD (与 KOD -Plus-相同的) 或者 Pfu, PCR 结果却很少产生多余碱基。

TOYOBO 的 RT-PCR 试剂盒的比较表

产品名称	ReverTra -Plus-™	ReverTra Dash®	RT-PCR High -Plus-	RT-PCR High
编号	PCR-501T (20 次份) 等	PCR-401T (100 次份) 等	PCR-301T (50 次份) 等	PCR-201T (100 次份) 等
所使用的 cDNA 合成酶	ReverTra Ace®	ReverTra Ace®	rTth DNA 多聚酶	M-MLV RTase RNase H-
所使用的 PCR 酶	KOD -Plus-	KOD Dash®	rTth DNA 多聚酶	rTaq DNA 多聚酶
准确度 (PCR [Taq 比])	大约 82 倍	3.4 倍	大约 1 倍	1 倍
伸长性	大约 10 kb	大约 5 kb	大约 1.5 kb	大约 4 kb
扩增效率	高	高	低	中
阶段	2 阶段, 2 管	2 阶段, 1 管	1 阶段, 1 管	2 阶段, 1 管
在 RT-PCR 生成物末端上进行的 A-添加	很少	少许	未经确认	已被确认

## VI 价目表 (KOD -Plus-以及相关的产品)

TOYOBO DNA 多聚酶的价目表

(存储温度: -20 )

产品以及内含物的名称	包装	编号	价格
KOD -Plus-	1 × 200 单位	KOD-201	¥30,000
	5 × 200 单位	KOD-202	¥120,000
	11 × 200 单位	KOD-203	¥230,000
KOD Dash®	1 × 250 单位	LDP-101	¥25,000
	5 × 250 单位	LDP-102	¥100,000
	11 × 250 单位	LDP-103	¥190,000
KOD DNA 多聚酶	1 × 250 单位	KOD-101	¥28,000

\* KOD -Plus-的标准数量为 50 µl PCR 反应混合物中有 1 U。

\* 归 F. Hoffmann-La Roche Co.所有的 PCR (多聚酶链反应) 美国专利 (专利号 4,683,195 以及 4,683,202) 下的许可。使用 PCR 过程须有许可。本产品不间接表明关于归 F. Hoffmann-La Roche Co.所有的 PCR 的专利使用权转让协定。

\* 本产品依据日本专利号 2647794 许可的合同以及协议进行制造和销售。

\* 所有价格都是以 2003 年 10 月所提供的最新信息为基础。请注意价格如有更改, 恕不另行通知。

### 相关产品

TOYOBO Rtaase 的价目表

(存储温度: -20 )

产品以及内含物的名称	包装	编号	价格
ReverTra Ace®	1 × 10,000 单位	TRT-101	¥15,000
	1 × 50,000 单位	TRT-102	¥60,000

TOYOBO RT-PCR 试剂盒的价目表

(存储温度: -20 )

产品以及内含物的名称	包装	编号	价格
ReverTra -Plus-™	使用 20 次份	PCR-501T	¥19,000
	使用 100 次份	PCR-501	¥70,000
ReverTra Dash®	使用 100 次份	PCR-401	¥68,000
ReverTra Ace -α-®*	使用 100 次份	FSK-101	¥53,000
RT-PCR High-Plus-	使用 50 次份	PCR-301	¥39,000
RT-PCR High	使用 100 次份	PCR-201	¥70,000

\* ReverTra Ace -α-® 适用于所有 PCR 酶。应使用由客户自己配制的 PCR 酶。

\* 所有价格都是以 2003 年 10 月所提供的最新信息为基础。请注意价格如有更改, 恕不另行通知。