

## 「PCR/RT-PCR」

第2章 目录	2-1
→ 按用途分类的产品流程图	2-2
→ PCR 及 PCR 周边技术	2-4
→ 常见问题	2-13
→ 高速·高效率·高保真 PCR 酶	
KOD One® PCR Master Mix / KOD One® PCR Master Mix -Blue-	2-14
→ 高保真 PCR 酶	
KOD -Plus- Neo	2-18
KOD -Plus- / KOD -Plus- Ver.2	2-20
→ 高成功率 PCR 酶	
KOD FX Neo	2-22
KOD FX	2-24
KOD -Multi & Epi-®	2-26
→ 高效率 PCR 酶	
Blend Taq® / Blend Taq® -Plus-	2-29
KOD Dash	2-30
→ 通用型 PCR 酶	
Quick Taq® HS DyeMix	2-31
rTaq DNA Polymerase	2-33
rTth DNA Polymerase	2-34
Hot Start TTx (DNA) Kit	2-35
→ RT-PCR	
Hot Start TTx (RNA) Kit	2-35
RT-PCR Quick Master Mix	2-36
→ 相关试剂	
anti-Taq High	2-37
Uracil-DNA Glycosylase, Heat-labile	2-38
核苷酸 (dNTP)	2-39
PCR • RT-PCR 用缓冲液	2-39

INDEX

## { 按用途分类的产品流程图 }

想克隆 DNA 片段

### DNA 模板入手

基因组 DNA 抽提试剂盒

→ (5-4 页)

- MagExtractor™ -Genome-
- MagExtractor™ -Plant Genome-

### cDNA 的合成

高效率逆转录酶

→ (3-14 页)

- ReverTra Ace®

高效率 cDNA 合成试剂盒

→ (3-12 页)

- ReverTra Ace -α-®

### 高保真的扩增

高保真性 PCR 酶

→ (2-18 页)

- KOD -Plus- Neo
- KOD -Plus- Ver.2
- KOD -Plus-
- KOD DNA Polymerase



**保真性：约为 Taq 酶的 50-80 倍**

### 高成功率的扩增 (什么都能扩)

高成功率 PCR 酶

→ (2-22 页)

- KOD FX Neo
- KOD FX
- KOD -Multi & Epi-®



→ (2-26 页)

**保真性：约 Taq 酶的 11 倍**

### PCR 产物的纯化

DNA 片段纯化试剂盒

→ (5-10 页)

- MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-

### TA 克隆

高效率 TA 克隆试剂盒 (KOD 系列专用)

→ (4-6 页)

- TArget Clone™ -Plus-

※ 使用 KOD Dash 以外的 KOD 系列酶扩增 DNA 片段，  
请注意 PCR 产物的末端已被平滑化，不可以直接进行  
TA 克隆

### 高效率 PCR 菌落直接 PCR

高效率 PCR 酶 → (2-29 页)

- Blend Taq® / Blend Taq® -Plus-
- KOD Dash®

**保真性：约 Taq 酶的 3 倍**

- Quick Taq® HS DyeMix

想要同时具有超高保真性和高成功率



高速 · 高效率 · 高保真 PCR

全能型 PCR 酶预混液

→ (2-14 页)

• KOD One® PCR Master Mix 系列

想要进行逆转录反应 (cDNA 合成)

RNA 入手

Total RNA 抽提试剂盒

→ (5-6 页)

• MagExtractor™ -RNA-

cDNA 合成试剂盒

高效率 cDNA 合成试剂盒

→ (3-12 页)

• ReverTra Ace -α®

逆转录反应应用试剂

高效率逆转录酶

→ (3-14 页)

• ReverTra Ace®

相关试剂

→ (2-39 页)

• dNTPs

RT-PCR 试剂盒

高效率 RT-PCR 试剂盒

→ (2-36 页)

• RT-PCR Quick Master Mix 【简便】

## 1. 可用于 PCR 的 DNA 聚合酶

### (1) 可用于 PCR 的 DNA 聚合酶

可用于 PCR 的 DNA 聚合酶大体可分为两种，一种是以 Taq DNA polymerase (以下称 Taq) 为代表的从嗜热菌中分离出来的聚合酶，归为 family A (Pol I 型)。

另一种是以 KOD DNA polymerase (以下称 KOD) 为代表的从嗜热 Archaea 中分离出来的聚合酶，归为 family B ( $\alpha$  型)。

这些分类是以组成聚合酶碱基序列的相似性为基础的，从严格意义上来讲，并不能反映各酶的特性。但是，单从可用于 PCR 的聚合酶这一着眼点来看的话，这样的分类是很有用的，如果记住了这样的分类方法，有助于实验中酶的选择。

### (2) 关于 Exonuclease 活性

$\alpha$  型与 Pol I 型 PCR 酶最大的差异在于 Exonuclease 活性 (以下称 Exo 活性) 的有无。该活性是从 DNA 一端开始逐一分解碱基的活性，有从 3' 端开始分解的活性，和从 5' 端开始分解的活性。

DNA 从 5' 端开始向 3' 端合成的情况下，DNA 聚合酶偶尔会出现碱基读取错误，此时，KOD、Pfu DNA polymerase (以下称 Pfu) 等 DNA 聚合酶会反方向从 3' 端开始将读取错误的碱基消除 (图 2)。该活性被称为 3'  $\rightarrow$  5' Exo 活性 (校正活性)。具有该活性的 DNA 聚合酶在 DNA 合成时的保真性要远远高于不具有该活性的酶。这就是该活性被称为校正活性 (Proofreading activity) 的缘故。因此，KOD 系列 (KOD Dash 除外) 可用于基因克隆等对保真性要求很高的实验。

另一方面，Taq、Tth DNA polymerase (以下称 Tth) 等由于不具有校正活性，不能修复读取错误的碱基，因此保真性不高。但这类酶具有从 DNA 的 5' 端分解的 5'  $\rightarrow$  3' Exo 活性。该活性在生物体内，主要是消除后随链 (lagging strand) 的合成起点的 RNA 片段。该活性被应用于 TaqMan<sup>®</sup> Assay (图 3)。

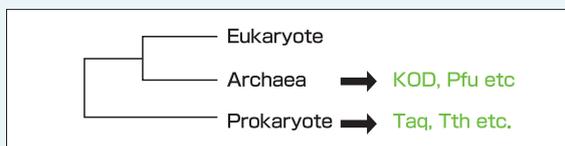


图1 PCR酶的分类

表1  $\alpha$  型PCR酶的特性

Family B ( $\alpha$ 型) : KOD, Pfu etc.	
来源: Archaea	
3' $\rightarrow$ 5' Exonuclease活性 (校正活性)	+
5' $\rightarrow$ 3' Exonuclease活性	-
TdT活性	-

表2 Pol I 型PCR酶的特性

Family A (Pol I型) : Taq, Tth etc.	
来源: Bacteria	
3' $\rightarrow$ 5' Exonuclease活性 (校正活性)	-
5' $\rightarrow$ 3' Exonuclease活性	+
TdT活性	+

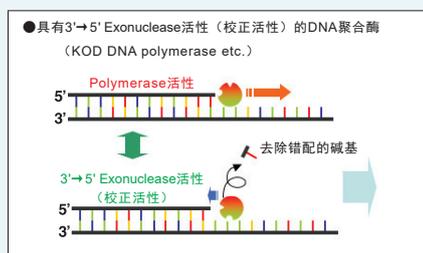


图2 聚合酶活性与校正活性

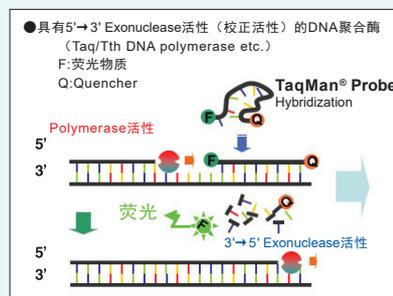


图3 TaqMan<sup>®</sup> Assay的原理

### (3) 关于 TdT 活性

TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) 活性是指在 DNA 的 3' 末端附加多余碱基的活性。实际上，在通过具有 TdT 活性的 Taq 等 PCR 酶扩增的 DNA 片段的 3' 末端，被附加一个腺嘌呤碱基的情况很常见。TA 克隆法就是以该特性为着眼点开发的。

另一方面，用 KOD 等 PCR 酶扩增的 DNA 片段末端已被平滑化。从前述的表中可以看到，KOD、Pfu 的 TdT 活性表示为 (-)，严格来说，这样的表示并不准确，应该是「即使追加碱基 A，也会被校正活性去除」。不管如何表述，其含义是由于用 KOD (除 KOD Dash 外)、Pfu 等扩增的产物 DNA 片段末端已被平滑化、TA 克隆的效率非常低。因此，我公司开发了在 KOD 的扩增产物末端附加新的 A 以后，可进行 TA 克隆的专用试剂盒「TArget Clone -Plus-」。

此外，根据碱基的添加侧与另一侧引物的 5' 末端的碱基种类的不同，各酶的 TdT 活性有所差异。我们通过实验进行了调查。采用 5' 末端分别为 G,A,T,C 的 Reverse Primer 与生物素化的 Forward Primer 进行 PCR，结果如图 4 所示 (具体来讲，就是将 PCR 扩增产物在变性条件下用测序胶进行电泳，转录到尼龙膜上后，用生物素检测系统进行检测后得到的结果)。结果可见，TdT 活性的强弱顺序为 Taq = Tth > KOD Dash >> KOD = Pfu，另外它们对 Reverse Primer 的 5' 末端添加碱基的优先顺序为 A  $\geq$  G > C > T。

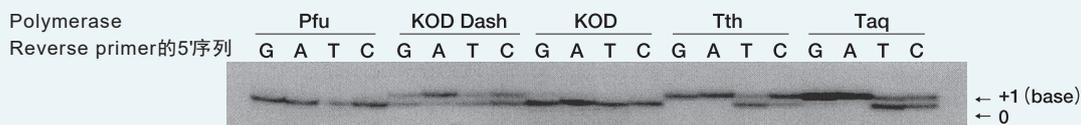


图4 各酶的Terminal Transferase活性

(4) 各聚合酶的特性

KOD 和 Pfu 虽然同被归为  $\alpha$  型聚合酶类，但还是有所差异。比如，Elongation rate (合成速度) 方面 Pfu 是 1 秒钟约 20 碱基，而 KOD 则是约 130 碱基。从总体而言，该类聚合酶被认为合成速度较慢，但 KOD 是例外，它的合成速度很快，非常利于进行 PCR。

表3 Elongation rate的比较

	Elongation rate (bases/sec.)
KOD	约130
Pfu	约20

$\alpha$  型 PCR 酶的特征是具有 3' → 5'Exo 活性 (校正活性)，而该活性却是造成 PCR 效率低下的主要原因。因此，为了提高 KOD (高合成速度) 的 PCR 效率，我们制备了使校正活性失活的变异酶「KOD Exo(-)」。通过这样的改变，降低了保真性，但成功地提高了 PCR 效率。该酶被用于 KOD Dash。

另外，Tth 是同时具有以 RNA 为模板、合成 DNA 的活性 (逆转录活性) 的独特的酶。利用该活性，可在同一体系中完成 RT-PCR。本公司提供两种利用 Tth 的该活性开发的 RT-PCR 用试剂【RNA- direct™ Realtime PCR Master Mix 系列 (→ 1-12 页)、RT-PCR Quick Master Mix (→ 2-36 页)】。

(5) 混合型酶 (Barnes 等方法的解说)

我们知道，在不具备校正活性的 PCR 酶中，混入微量的  $\alpha$  型 PCR 酶，能提高 PCR 效率【Barnes W.M. PNAS 91:2216 (1994)】。利用该原理开发的，有 Blend Taq® (→ 2-29 页) 和 KOD Dash® (→ 2-30 页)。Blend Taq® 是在 Taq 中混合了微量的  $\alpha$  型 PCR 酶，而 KOD Dash 则是在前述的 KOD Exo(-) 中混合了具有校正活性的 KOD。由于混合型酶的效率比较高，可用于菌落直接 PCR 等各种用途。此外，KOD Dash 由于 PCR 的延伸时间可设定为 30sec./kb，因此可用于高速 PCR。但由于其保真性只有 Taq 的 3~4 倍，因此不适用于对保真性有要求的基因克隆等实验。

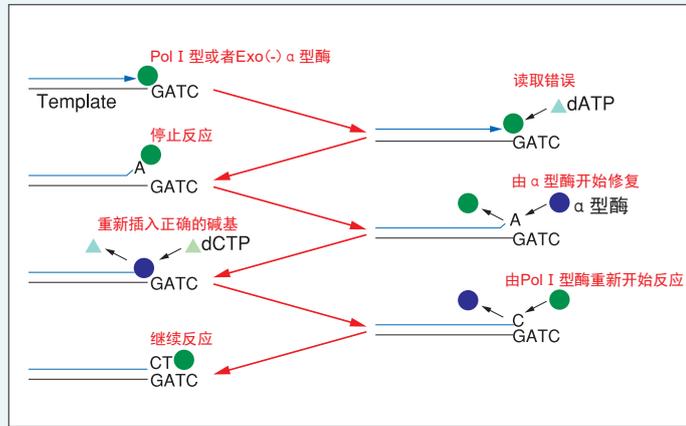


图5 使用混合型酶进行高效率PCR酶的原理

## 2. PCR 性能的改良技术

(1) 热启动技术

从 PCR 反应液配置到热循环仪温度上升之间，PCR 反应液在室温至 50°C 的温度中被加热。由于引物的 Tm 值多被设定为 50°C 以上，在该温度区域，引物的特异性可被充分地发挥出来。而另一方面，在该温度区域，由于聚合酶显示其微弱的活性，在错配的引物基础上进行反应，会产生各种各样的副反应，如杂带、引物二聚体等。

为避免该副反应，开发了使用聚合酶中和抗体的热启动技术。通过预先在聚合酶中混合中和抗体，在室温至 60°C 的温度区域，可以抑制聚合酶活性 (有时为 Exo 活性)。抗体在 PCR 的最初变性步骤即发生失活，不会影响到扩增反应。

本公司的 Blend Taq® -Plus- (→ 2-29 页)、KOD -Multi & Epi® (→ 2-26 页)、KOD -Plus-/KOD -Plus- Ver.2 (→ 2-20 页)、KOD FX Neo (→ 2-22 页)、KOD FX (→ 2-24 页)、RT-PCR Quick Master Mix (→ 2-36 页) 及 Realtime PCR 试剂 (→ 1-19 页) 都使用了该技术。抗 Taq 单克隆抗体 [anti-Taq high (→ 2-37 页)] 与 rTaq DNA Polymerase (→ 2-33 页) 混合即可进行廉价的热启动 PCR。

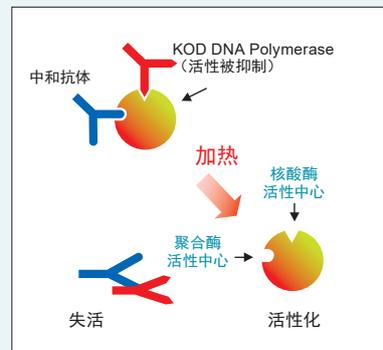


图6 HotStart法原理 (例: KOD -Plus-)

KOD -Plus- Neo, KOD -Plus-, KOD -Plus- Ver.2 及 KOD -Multi & Epi-®, KOD FX Neo, KOD FX 含两种抗体。

(2) 通过改良 Buffer 等提高 PCR 性能

如前面 1. (4) 所述, 具有 3' → 5' Exo 活性 (校正活性) 的 PCR 酶一般 PCR 效率比较低, 因此, 经常会通过热启动、改良酶的组成、改善反应条件等来提高其性能。KOD -Plus- Ver.2、KOD FX、KOD -Plus- Neo、KOD FX Neo、KOD -Multi & Epi- 等都是在 KOD -Plus- 的基础上, 应用了改良后的 buffer, 从而相比 KOD -Plus-, PCR 效率有了大幅的提高。KOD -Plus- Ver.2 和 KOD -Plus- Neo 保持了保真性而 PCR 成功率更高, 而 KOD FX、KOD FX Neo、KOD -Multi & Epi- 的保真性是 Taq 的约 11 倍, 虽然相比 KOD -Plus- 系列较低, 但却具有无可匹敌的 PCR 成功率及综合性能。

(3) 通过延伸增强剂提高 PCR 性能

KOD DNA polymerase 具有强力的 3' → 5' 核酸外切酶活性 (校正活性), 可准确地对目的片段进行扩增, 作为克隆用 PCR 酶获得了广泛的好评。然而, 高保真性 PCR 酶在 20—30 个循环以后, 容易出现扩增无法持续的 < 停滞现象 >。KOD -Plus- Neo 在高保真性 PCR 酶: KOD -Plus- 系列技术的基础上, 应用了本公司新开发的「延伸增强剂」, 保持了 KOD -Plus- 系列高保真性 (约为 Taq 的 80 倍) 的同时, 通过抑制 < 停滞现象 >, 明显提高了对微量模板 DNA、长目的片段的扩增效率。

而 KOD FX Neo 则是在高成功率 PCR 酶: KOD FX 技术的基础上, 应用了「延伸增强剂」, 可对更长的目的片段进行扩增, 也可对土壤、食品等粗样品进行更高效率的扩增。

KOD One 在这个基础上进一步改进延伸增强技术, 实现了最快 1sec./kb 的高速 PCR。

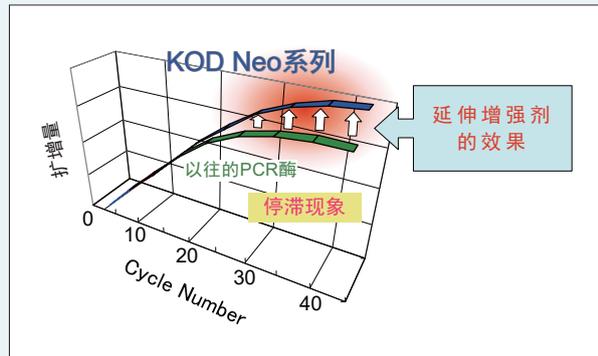


图7 延伸增强剂的效果

### 3. 可用于粗样品的 PCR (基因分型)

「KOD FX」是在具有各种优良特性的 PCR 酶「KOD DNA polymerase」基础上开发的高性能 PCR 试剂。该酶显示了出色的「扩增成功率」、「扩增效率」和「延伸性」, 可对各种长度的目的片段进行 PCR。经典的 KOD -Plus- 系列是以「KOD DNA polymerase」的高保真性为着眼点开发的而「KOD FX」系列则是着重于「扩增成功率」、「扩增效率」和「延伸性」开发的 (图 8)。

「KOD FX Neo」是在「KOD FX」的基础上, 结合新开发的「KOD -Plus- Neo」的「延伸增强剂」等技术, 抑制 < 停滞现象 >, 使长链目的片段·难配序目的片段、粗样品的扩增效率更高。

「KOD One」延续了 KOD FX 高扩增效率的特点, 同时具有超高保真性。这两个产品都具备以粗样品为模板进行 PCR 的能力, 即便将粗样品如全血、培养细胞等直接添加到 PCR 反应液中, 也可得到充分的扩增。也就是说, 无需烦杂的 DNA 纯化步骤, 只需对样品进行简单的前处理, 即可进行 PCR 实验。

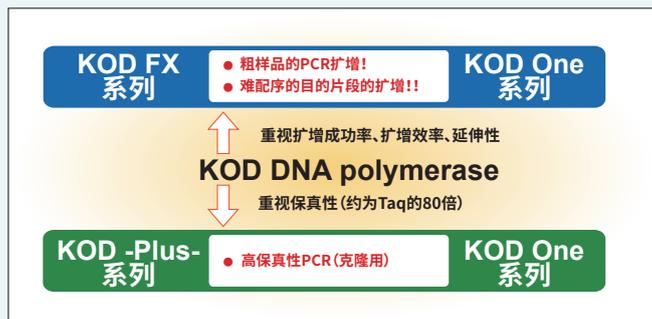


图8 用KOD DNA polymerase的试剂

到目前为止我们已收集了许多粗样品的扩增例（如表 4）。样品直接扩增是 KOD FX 系列的技术特点，能直接扩增其他 PCR 酶所不能扩增的霉菌、酵母等具有细胞壁的生物样品。同时，用 KOD FX 系列还能高效率地扩增通过简单的前处理（图 9、10）配置的各种裂解液，可主要用于基因分型。

除表 4 所列举的样品外，KOD FX Neo 能扩增的还有：添加果酱的样品、添加腐殖酸的样品、用堆肥进行亚基因组分析及老鼠指甲等。

针对这些粗样品，KOD One 具有与 KOD FX 类似的扩增能力，更多实验例可在官方网站产品详情页获取。

表4 可用KOD FX、KOD One 系列 扩增的样品

样品种类	样品来源
裂解液扩增	小鼠尾巴
	植物（稻叶、米粒、烟草叶、番茄叶等）
	人发根
	果蝇翅膀
直接扩增	人血液
	小鼠·大鼠滤纸血
	人·老鼠指甲
	培养细胞
	霉菌
	酵母
	真菌（隐球菌等）
	精液、鼻涕、眼泪、汗液
	植物浮游生物（隐藻）
	烟草叶
	堆肥
杂质较多的DNA	粪便纯化得到的DNA

碱裂解法



图9 Mouse tail的前处理方法

一步法



图10 植物样品的前处理方法

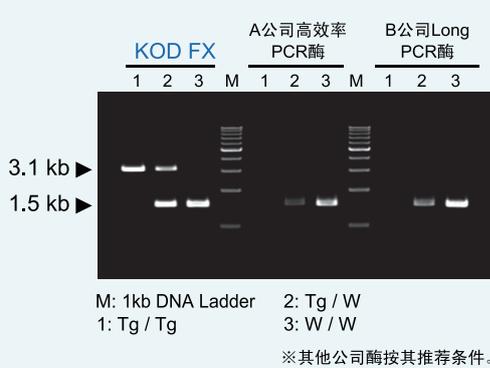


图11 鼠尾裂解液的PCR结果

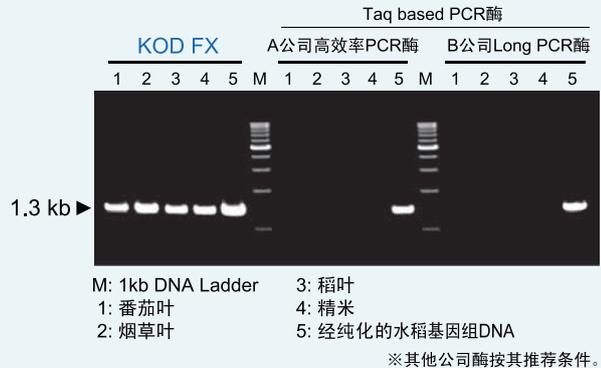


图12 各种植物样品裂解液直接PCR

KOD One 在进行粗样品扩增的同时可实现高速 PCR。以动植物组织的裂解液为模板，在延伸时间 5sec./kb 的条件下，依然可以得到明亮的条带。显示了 KOD One 具有较高的扩增效率以及抗抑制能力。

【循环条件】

98°C, 10sec. →  
60°C, 5sec. → 30cycles  
68°C, 7-13sec. (5sec./kb)

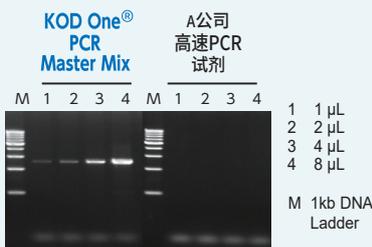


图13 不同模板量的鼠尾裂解液直接PCR



图14 不同模板量的烟草叶裂解液直接PCR

※此为 KOD One 反应条件，其他 PCR 试剂按照各自说明书推荐反应条件进行。

1.3kb  
M: 1kb DNA Ladder  
1: 裂解液 0.25 µL  
2: 裂解液 0.5 µL  
3: 裂解液 1.0 µL

如前所述, KOD FX Neo 更加不容易受粗样品的抑制。首先, 以加工的水果食品为例, 将果酱的悬液液添加到 PCR 反应液中, 观察其对 PCR 的抑制作用。水果中含有很多以多糖为主的 PCR 抑制剂。

结果表明, KOD FX Neo 是抗抑制作用最强的产品 (图 15)。

另外, 众所周知, 腐殖酸是动植物被腐殖质及土壤中的微生物作用后形成的可溶于碱, 在酸中形成沉淀, 呈红褐色或黑褐色的有机物质, 对 PCR 有抑制作用。

在此, 以人基因组 DNA 中混入腐殖酸为例, 进行 PCR 抑制作用相关的探讨。结果显示, KOD FX Neo 是抗腐殖酸抑制能力最强的产品 (图 16)。

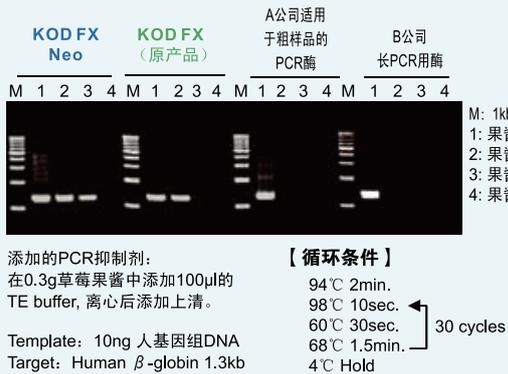


图15 果酱 (食品) 添加实验例

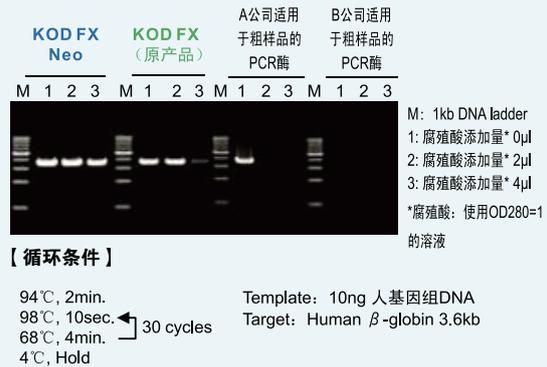


图16 腐殖酸添加实验

下面的实际应用例, 是用各种方法从堆肥中粗提 DNA, 以该粗提 DNA 溶液 (处理上清) 为样品, 用原核生物通用引物对 rDNA 进行扩增。结果可见, 用碱裂解法及一步法得到的样品可得到与一般广泛使用的 CTAB 法相同的扩增结果 (图 17)。此外, 由于 KOD FX Neo 的 PCR 产物末端已被平滑化, 可用 TA 克隆专用试剂 [TArget Clone -Plus-] 进行克隆及测序分析。结果显示, 96 个克隆都得到了良好的测序分析。此外, 根据分析结果, 用各种粗提方法得到的序列, 结果几乎相同 (虽然碱裂解法及一步法非常方便, 但是初次使用时, 由于被检菌落的多样性, 我们建议事先用原来的方法作一下比较)。

另外, 用碱裂解法配制得到的上清, 使用各种扩增试剂, 用 3 种通用引物进行 rDNA 扩增, 结果显示, KOD FX Neo 的结果是最好的 (图 18)。

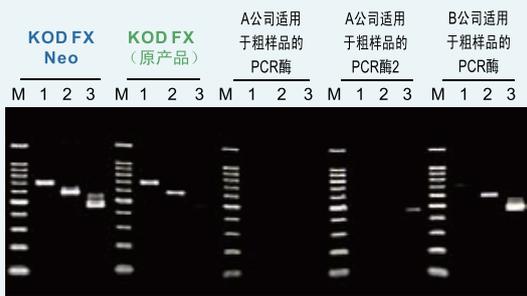


图17 对土壤进行粗提的效果分析

图18 用土壤样品进行PCR效率的比较

**【引物】**

- Fwd ATTAGATACCCCTDGTAGTCC  
Rev TACCTTGTTACGACTT
- Fwd AGGGTCATTGGAAACTGGG  
Rev CGTGTGTAGCCAGGTCATA
- Fwd GGCCCTTCGGGTTGTAAACC  
Rev CTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGC

**【碱裂解法】**

土壤 100 mg  
↓ ←50 mM NaOH 180μl  
↓ Vortex充分搅拌均匀  
↓ 95°C, 10 min. 温育  
↓ ←1 M Tris-HCl (pH8.0) 20μl  
↓ Vortex充分搅拌均匀  
↓ 离心12,000 rpm, 5 min.  
上清  
↓  
用灭菌水作10倍稀释, 取1μl加入到50μl PCR反应液中。

**【一步法】**

土壤 100 mg  
↓ ←Buffer A\* 100μl  
↓ Vortex充分搅拌均匀  
↓ 95°C, 10 min. 温育  
↓ 离心12,000 rpm, 5 min.  
上清  
↓  
用灭菌水作10倍稀释, 取1μl加入到50μl PCR反应液中。

\*Buffer A:  
100mM Tris-HCl (pH9.5)  
1M KCl  
10mM EDTA

**【CTAB法】**

根据下面的论文进行实验。  
J Zhou *et al.*, DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:316-322 (1996)

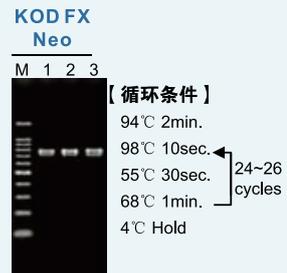


图17 对土壤进行粗提的效果分析

**【引物】**

- Fwd: GTTTGATCCTGGCTCA  
Rev: TACCAGGGTATCTAATCC

## 4. 多重 PCR·亚硫酸氢盐处理后 DNA 的 PCR 等

KOD -Multi & Epi-® 是使用基因改良的 KOD DNA polymerase(UKOD) 而开发的高保真性 PCR 酶。通过改良, 可以使用迄今为止难以扩增的含较多尿嘧啶的模板及含次黄嘌呤核苷的引物。而且由于添加了延伸加速剂等组分, 提高了延伸性, 所以不容易出现因序列及扩增长度等引起的扩增偏差。因此, KOD -Multi & Epi-® 可用于多重 PCR 及亚硫酸氢盐处理过的 DNA 的扩增 (表观遗传学分析)、宏基因组分析等各种用途。

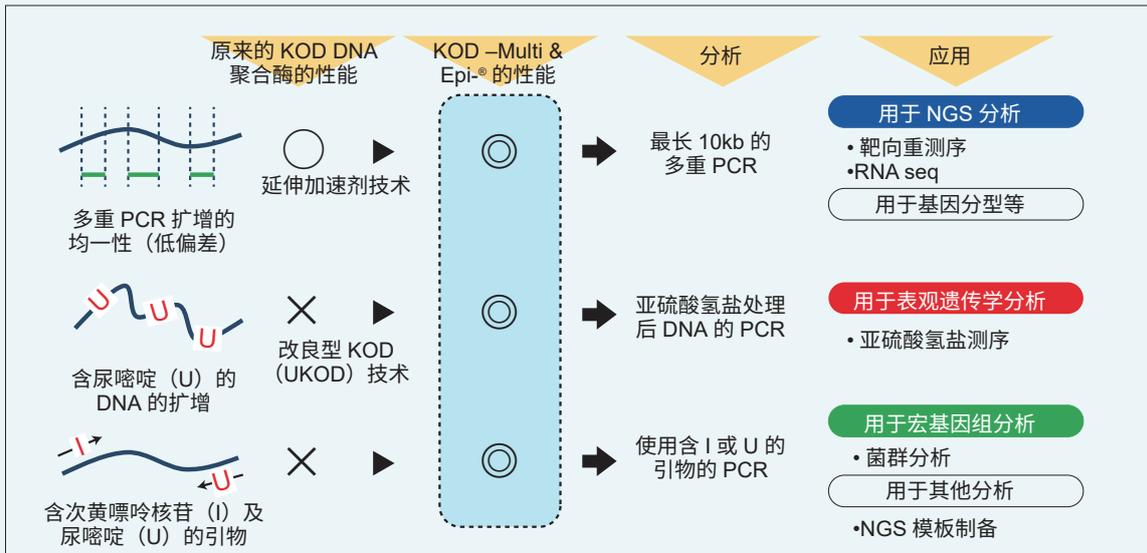


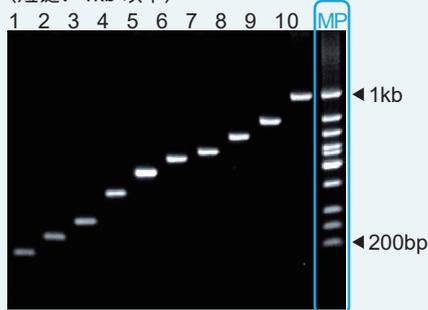
图 19 KOD -Multi & Epi-® 的性能与应用范围

### (1) 多重 PCR

以纯化的人基因组 DNA 为模板, 使用 KOD -Multi & Epi-® 分别对短链 (1kb 以下) 及长链 (1~10kb) 的多个目的片段进行单重及多重扩增。

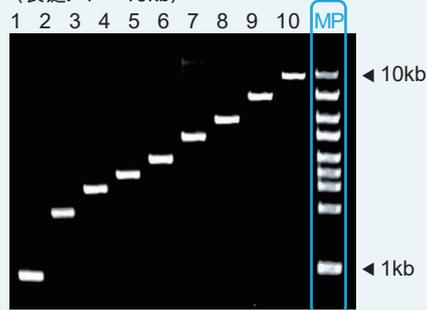
结果显示, 即使在多重 PCR 中, 也显示出像单重 PCR 效率那样偏差小的良好的扩增效果。

〈短链: 1kb 以下〉



1:DDB2 (200 bp), 2:FANCG (250 bp), 3:HBg (300 bp), 4:CDH1 (400 bp), 5:chrome9 (500 bp), 6:ERCC4 (550 bp), 7:HRAS (600 bp), 8:PRF1 (700 bp), 9:BRCA1 (800 bp), 10:CDK4 (1000 bp), MP: Multiplex PCR (1~10)  
模板: 基因组 DNA 50ng/ 50µl 反应

〈长链: 1~10kb〉



1:Chrome9 (1 kb), 2:MSH6 (1.8 kb), 3:BRCA2 (2.3 kb), 4:WT-1 (2.5 kb), 5:FANCE (3 kb), 6:RAD51D (4 kb), 7:KRAS (5 kb), 8:BRCA1 (7 kb), 9:DDB2 (10 kb), MP: Multiplex PCR (1~9)  
模板: 基因组 DNA 50ng/ 50µl 反应

图 20 短链及长链单重及多重 PCR 的比较

### (2) 亚硫酸氢盐 PCR

通过亚硫酸氢盐处理, 将未甲基化的 C (胞嘧啶) 转变为 U (尿嘧啶), 通过 PCR 又转变为 T (胸腺嘧啶)。另一方面, 甲基化的 C (胞嘧啶) 则保持 C (胞嘧啶) 不变。利用该性能的测序方法称为亚硫酸氢盐测序。但是, 众所周知, 这种亚硫酸氢盐处理过的 DNA 是片断化的, AT 含量大大增加了, 这就导致了 PCR 效率会显著降低。KOD -Multi & Epi-® 正是基于提高这种 PCR 效率而开发的产品。

## 5. 利用 PCR 进行突变导入或基因置换 (基因工程)

相比传统酶切连接的方法, 使用 PCR 扩增载体的方式进行突变导入、基因克隆等实验具有操作便捷、不受酶切位点限制等优点。其中的难点在于, 长片段扩增如何得到足够的产物, 以及防止可能引入的随机突变。KOD One® PCR Master Mix 由于其快速·高保真的特点, 非常适合应用于此类场景。以下实验例是在哺乳动物细胞用表达载体中对相关基因进行氨基酸替换, 也即 3 个碱基的突变。结果显示, 突变导入成功率为 100%, 并且周围序列没有检测到意外碱基突变。对于较难扩增的质粒载体, 以往会选择将插入基因分离出来并完成突变, 然后再重新连接到原载体上。现在借助 KOD One 仅需一次 PCR 即可达到目的, 减少了工作量, 也缩短了实验周期。



图 21 难扩增表达载体通过 PCR 法导入突变的实验例

以下实验例介绍了 iVEC 法快速替换载体上的插入基因。8 个转化后的菌株各挑取一个克隆进行检测, 结果显示, 8 个克隆中有 7 个转化成功。从 PCR 开始到转化后涂板只需要 2 个小时即可完成。保证置换成功的关键点包括: 设计合适的引物, 使得既能高效扩增载体和目的片段, 也保证了有足够的 overlap 区域以提高二者融合的几率。其次是高质量的载体 PCR 扩增。进行实验之前可以针对载体扩增优化反应条件和体系, 以提高实验成功率。

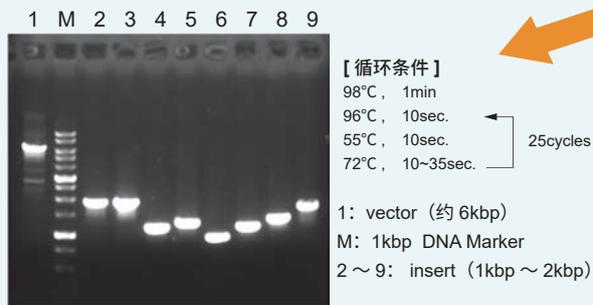


图 22 载体和待插入片段电泳结果

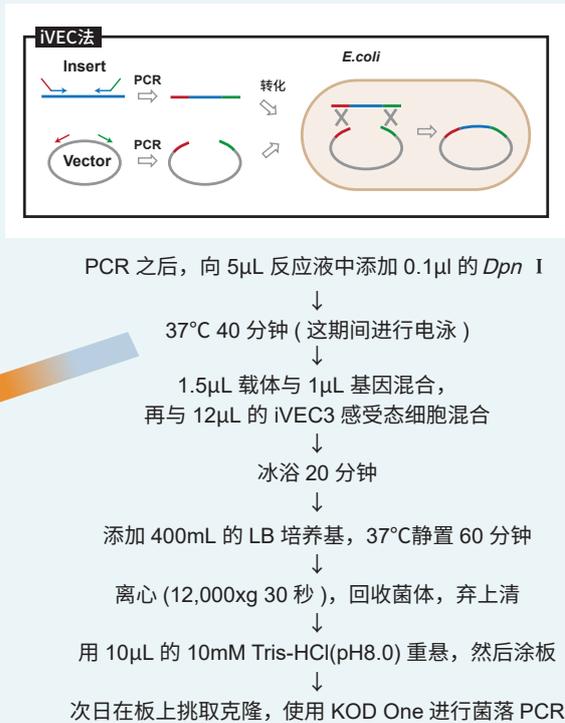


图 23 iVEC 法实验流程

## 6. PCR 用聚合酶的基本性质比较

各 PCR 用聚合酶的基本性质如下表。选择 PCR 酶时请参考。

表 5 PCR 用聚合酶的基本性质比较

	KOD	KOD Exo(-)	Taq	Tth
起源	<i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1	<i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1(Mutant)	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermus Thermophilus</i> HB8
各温度下活性半衰期	12hr.(95°C) 3hr.(100°C)	12hr.(95°C) 3hr.(100°C)	1.6hr.(95°C)	ND
dsDNA 5' → 3' Exonuclease 活性	-	-	+	+
dsDNA 3' → 5' Exonuclease 活性	+	-	-	-
TdT 活性	-	+	+	+
RT 活性 (Mn 存在下)	-	-	-	+
Elongation rate*(bases/sec.)	约 130	约 130	约 60	约 60
Processivity (bases)	>300	>300	ND	ND
用途	高保真性 PCR	高效率 PCR	普通 PCR Realtime PCR	RT-PCR Realtime PCR
相关产品	- KOD One® PCR Master Mix - KOD -Plus- - KOD -Plus- Ver.2 - KOD -Plus- Neo - KOD FX - KOD FX Neo - KOD -Multi & Epi-®	- KOD Dash	- rTaq DNA Polymerase - Realtime PCR Master Mix 系列	- Tth/rTth DNA Polymerase - RNA-direct Realtime PCR Master Mix 系列

ND:Not determined

\*Elongation rate 是指过量的酶存在的情况下每秒钟合成速度的指标。

PCR 的最佳延伸时间根据添加酶量的不同而变化。KOD -Plus- 由于采用了 3' → 5' Exonuclease 活性较高的酶，为了提高 PCR 效率而添加的酶量较低 (1U/50μl reaction)，因此延伸时间应设定为比 KOD Dash 长些。

## 7. PCR 用聚合酶选择的指标

各酶的 PCR 特性表示如下。根据用途的不同对 PCR 酶性能的要求也各有差异，因此根据各酶的特性和商品的价格来选择所需要的酶非常重要。下表所列出的仅为高性能 PCR 酶，根据实际需要也可选择 Taq、Tth 等通用型酶。另外，把 Taq 和抗 Taq 单克隆抗体 [anti-Taq high (→ 2-37 页)] 混合使用，可进行较便宜的热启动 PCR。

表 6 PCR 用聚合酶在 PCR 实验中的特性比较

		保真性	延伸性 (可扩增链长)	扩增效率 (产量)	扩增成功率	高 GC 含量 模板	粗样品应对	PCR 产物 末端	延伸时间 (min./kb)	热启动
因 PCR 不能顺利地 进行而烦恼? < 适用于广泛的 PCR 实验 >	KOD One	★★★★ (Taq的约 80 倍)	★★★★	★★★★★	★★★★★	★★★★★	★★★★★	平滑末端	0.02 ~ 0.2	○
	KOD -Multi & Epi-®	★★ (Taq的约 11 倍)	★★★★	★★★★★	★★★★★	★★★★★	★★★★★	平滑末端	0.25 ~ 0.5 (1)*	○
	KOD FX Neo	★★ (Taq的约 11 倍)	★★★	★★★★★	★★★★	★★★★★	★★★★★	平滑末端	0.5 (1)*	○
	KOD FX	★★ (Taq的约 11 倍)	★★★	★★★★	★★★	★★★★	★★★★	平滑末端	1	○
想进行高保真性的 PCR	KOD -Plus- Neo	★★★★ (Taq的约 80 倍)	★★★	★★	★★★	★★★	★★	平滑末端	0.5	○
	KOD -Plus- Ver.2	★★★★ (Taq的约 80 倍)	★★	★★★	★★	★★	★★	平滑末端	1	○
	KOD -Plus-	★★★★ (Taq的约 80 倍)	★★★	★★	★★	★★★	★★	平滑末端	1	○
想高效率地进行 通用 PCR	Blend Taq® -Plus-	★ (Taq的约 3 倍)	★★	★★★	★★★	★★	★★★	带 A 末端	1	○
	Blend Taq®	★ (Taq的约 3 倍)	★★	★★★	★★	★★	★★	带 A 末端	1	×
	KOD Dash®	★ (Taq的约 3 倍)	★★★	★★★	★★★	★★★	★★★	带 A 末端	0.5	×

\* 处理粗样品时的设定

※ 保真性是利用 rpsL 基因方法测定值计算的结果。[H.MO et al., *J.Mol.Biol.* 222:925-936(1991)]

## 8. PCR 周边技术

### (1) 菌落直接 PCR

进行基因克隆实验时，需要频繁地进行插入确认，而每次对质粒进行抽提再确认插入非常麻烦。因此，最近以菌落直接作为模板样品，使用在载体两端设计的引物进行 PCR，确认插入有无的方法正在被越来越多的实验者接受（参照右边流程图）。适合该方法的 PCR 酶为，高效率且延伸时间较短的 KOD Dash (→ 2-30 页) 或高效率且 PCR 价格实惠的 Blend Taq (→ 2-29 页)、价格便宜且能简便地进行 PCR 的 Quick Taq<sup>®</sup> HS DyeMix (→ 2-31 页) 等。使用这些酶进行菌落直接 PCR 的实验步骤如下所示。另外以 KOD Dash 为基础开发的 InsertCheck<sup>-Ready-</sup> 是为菌落直接 PCR 专用而开发的预混合试剂，可简便地进行菌落直接 PCR。

此外，平滑末端克隆或 TA 克隆时，被克隆的 DNA 片段以两个方向插入的概率很高，如图 24 所示，因此有必要进行方向性的确认。将引物设计为一条在载体上，一条在插入片段上，则可简单地确认插入方向（图 25）。



#### Protocol#1: 菌落直接 PCR

##### Blend Taq<sup>®</sup>

	(1份样品)	( )份样品																						
灭菌水	21.9 (μl)	( )	<table border="1"> <tr> <td>94°C</td> <td>94°C</td> <td rowspan="2">× 30 cycles</td> </tr> <tr> <td>4min</td> <td>30sec</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>30sec</td> <td>72°C</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>A/C</td> <td>B min</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td colspan="2">A/C (1kb/1min)</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td colspan="2">(Tm-5~10°C)</td> </tr> </table>	94°C	94°C	× 30 cycles	4min	30sec			30sec	72°C			A/C	B min			A/C (1kb/1min)				(Tm-5~10°C)	
94°C	94°C	× 30 cycles																						
4min	30sec																							
		30sec		72°C																				
		A/C		B min																				
		A/C (1kb/1min)																						
		(Tm-5~10°C)																						
10× Buffer	3	( )																						
2mM dNTPs	3	( )																						
Forward primer (10pmole/μl)	0.9	( )																						
Reverse primer (10pmole/μl)	0.9	( )																						
Blend Taq	0.3	( )																						
	30 (μl)	每30 μl分装																						

##### KOD Dash<sup>®</sup>

	(1份样品)	( )份样品																						
灭菌水	23 (μl)	( )	<table border="1"> <tr> <td>94°C</td> <td>94°C</td> <td rowspan="2">× 30 cycles</td> </tr> <tr> <td>4min</td> <td>30sec</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>5sec</td> <td>72°C</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>A/C</td> <td>B sec</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td colspan="2">A/C (1kb/30sec)</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td colspan="2">(Tm~Tm-5°C)</td> </tr> </table>	94°C	94°C	× 30 cycles	4min	30sec			5sec	72°C			A/C	B sec			A/C (1kb/30sec)				(Tm~Tm-5°C)	
94°C	94°C	× 30 cycles																						
4min	30sec																							
		5sec		72°C																				
		A/C		B sec																				
		A/C (1kb/30sec)																						
		(Tm~Tm-5°C)																						
10× KOD Dash Buffer	3	( )																						
2mM dNTPs	3	( )																						
Forward primer (10pmole/μl)	0.35	( )																						
Reverse primer (10pmole/μl)	0.35	( )																						
KOD Dash	0.3	( )																						
	30 (μl)	每30 μl分装																						

##### Quick Taq<sup>®</sup> HS DyeMix

	(1份样品)	( )份样品																						
灭菌水	13.8 (μl)	( )	<table border="1"> <tr> <td>94°C</td> <td>94°C</td> <td rowspan="2">× 30 cycles</td> </tr> <tr> <td>2min</td> <td>30sec</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>30sec</td> <td>68°C</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>A/C</td> <td>B sec</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td colspan="2">A/C (1kb/30sec)</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td colspan="2">(Tm-5~10°C)</td> </tr> </table>	94°C	94°C	× 30 cycles	2min	30sec			30sec	68°C			A/C	B sec			A/C (1kb/30sec)				(Tm-5~10°C)	
94°C	94°C	× 30 cycles																						
2min	30sec																							
		30sec		68°C																				
		A/C		B sec																				
		A/C (1kb/30sec)																						
		(Tm-5~10°C)																						
Quick Taq HS DyeMix	15	( )																						
Forward primer (10pmole/μl)	0.6	( )																						
Reverse primer (10pmole/μl)	0.6	( )																						
	30 (μl)	每30 μl分装																						

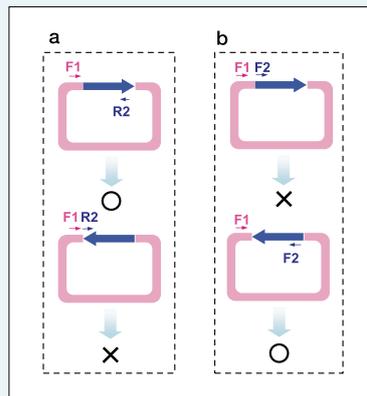


图 24 通过 PCR 进行方向性的确认  
将引物设计为一条在载体上，一条在插入片段上进行 PCR。可通过 a 或 b 的组合得到的扩增图形确认方向性。

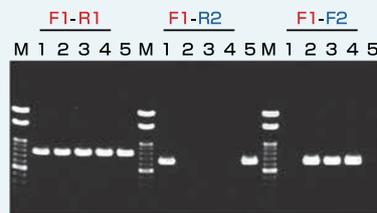


图 25 菌落直接 PCR 法例  
将 0.5kb 的 PCR 产物进行 TA 克隆后，如图 13 所示与各种引物组合进行菌落直接 PCR。R1 为设计在载体上的反向引物。

### (2) PCR 产物的测序

一般情况下，常用纯化后的质粒 DNA 进行测序，但也可以用纯化后的 PCR 产物直接进行测序。此时，在做 PCR 时所使用的引物可直接作为测序引物。即便是使用保真性较差的酶扩增得到的 PCR 产物，其变异也会被平均导入，将该 PCR 产物直接测序没有任何问题。因此，用上述的菌落直接 PCR 法的纯化产物也可进行测序。纯化步骤推荐使用 MagExtractor<sup>™</sup> -PCR&Gel Clean up-(Code No. NPK-601, → 5-10 页)。该试剂盒即便对于已混合了染料的反应液也可高效率地纯化 PCR 产物。

## 1. PCR、RT-PCR 实验中的注意点

## (1) PCR 条件

市面上有各种各样的 PCR 酶销售。根据实验目的选择合适的酶，按照各酶的最适条件进行实验，往往能得到更好的结果。尤其是退火温度、延伸时间以及酶的浓度对实验结果有很大的影响，请务必仔细注意。

表 8 PCR 最适条件

最适条件 / 产品名	KOD -Plus-	KOD -Plus- Ver.2	KOD FX	KOD -Plus- Neo	KOD FX Neo
Mg 浓度	1mM	1.5mM	2mM (含在 buffer 中)	1.5mM	2mM (含在 buffer 中)
dNTP	0.2mM	0.2mM	0.4mM	0.2mM	0.4mM
引物长度	22 ~ 24mer	22 ~ 24mer	22 ~ 35mer	22 ~ 35mer	22 ~ 35mer
退火温度	Tm-5 ~ 10°C	Tm-5 ~ 10°C	Tm-5 ~ 10°C	Tm	Tm
延长时间	1min./kb	1min./kb	1min./kb	30sec./kb	30sec./kb (粗样品: 1min./kb)
酶浓度	1U/50 $\mu$ l*	1U/50 $\mu$ l*	1U/50 $\mu$ l*	1U/50 $\mu$ l*	1U/50 $\mu$ l*
最适条件 / 产品名	Taq / Tth	Blend Taq <sup>®</sup>	KOD One <sup>®</sup>	KOD Dash <sup>®</sup>	KOD -Multi & Epi <sup>®</sup>
Mg 浓度	1.5mM	2mM (含在 buffer 中)	- (含在 buffer 中)	1.2mM (含在 buffer 中)	2mM (含在 buffer 中)
dNTP	0.2mM	0.2mM (长片段 0.3mM)	- (含在 buffer 中)	0.2mM	- (含在 buffer 中)
引物长度	20 ~ 22mer	20 ~ 22mer	22 ~ 35mer	22 ~ 24mer	22 ~ 35mer
退火温度	Tm-5 ~ 10°C	Tm-5 ~ 10°C	Tm-5 ~ 10°C	Tm ~ Tm-5°C	Tm
延长时间	1min./kb	1min./kb	1 ~ 10sec./kb (粗样品: 10sec./kb)	30sec./kb	15 ~ 30sec./kb (粗样品: 1min./kb)
酶浓度	1.25 ~ 2.5U/50 $\mu$ l	1.25U/50 $\mu$ l	-	1.25 ~ 2.5U/50 $\mu$ l	1.25 ~ 2.5U/50 $\mu$ l

\*: 一般情况下酶添加量请设定在该浓度值以下。

## (2) 引物条件

对 10kb 以上的目的片段进行 PCR 时，我们已通过 KOD FX 的实验证明，引物的纯化级别高，则可得到良好的扩增。因此，进行 Long PCR 时，推荐使用 Cartridge 纯化级别以上的引物，而非脱盐纯化级别。

## (3) 难扩增目的片段的扩增

对高 GC 含量的目的片段进行扩增时，在反应液中按 1~5%(V/V) 加入 DMSO (二甲基亚砜) 则可改善扩增结果。用 KOD -Plus- 确认 DMSO 对保真性的影响，可知添加至 5% 的时候没有观察到保真性降低。在本公司 PCR 酶中，KOD FX、KOD FX Neo 最适用于高 GC 含量等难扩增的目的片段。

## (4) 关于 RNA 带入的问题

进行 RT-PCR 反应时，有时会将逆转录反应液直接添加到 PCR 反应溶液中，但如果反应液带入过量，则会造成 PCR 效率低下，请务必注意。其主要原因是，cDNA 溶液中所含的大量 RNA 会与 Mg 离子结合。我们在开发 KOD -Plus- Ver.2、KOD FX、KOD FX Neo 等酶时，为缓和这种现象做了很多努力，但我们仍建议带入到 PCR 中的逆转录反应液在 1/25 以下，最好在 1/50 以下，以便于得到稳定的扩增结果。此外，植物样品等基因组 DNA 中，由于抽提方法不同，有可能会混入大量的 RNA。此时，可通过核糖核酸酶处理、减少基因组 DNA 的添加量等，得到良好的结果。图 26 表示在 PCR 反应液中故意添加 RNA 时，对 PCR 的抑制结果。添加 RNA 的影响，用 KOD -Plus- Ver.2 可得到一定程度的缓和，但在高浓度 RNA 存在的情况下，仍会抑制扩增，而用 KOD FX、KOD FX Neo 则通过组分的优化，受 RNA 的影响较小。

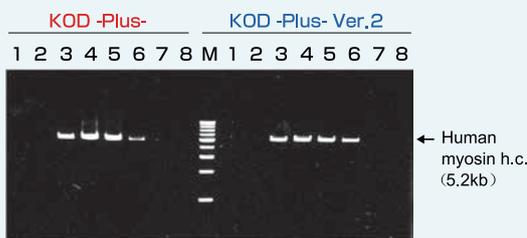


图 26 混入 RNA 对 PCR 反应的影响

Lane M: 1kb DNA Ladder Marker

1: 人基因组DNA	0ng + HeLa Total RNA	0ng
2: 人基因组DNA	0ng + HeLa Total RNA	50ng
3: 人基因组DNA	50ng + HeLa Total RNA	0ng
4: 人基因组DNA	50ng + HeLa Total RNA	50ng
5: 人基因组DNA	50ng + HeLa Total RNA	100ng
6: 人基因组DNA	50ng + HeLa Total RNA	150ng
7: 人基因组DNA	50ng + HeLa Total RNA	200ng
8: 人基因组DNA	50ng + HeLa Total RNA	250ng

\* 反应液 50  $\mu$ l

在保留 KOD 系列卓越性能的同时进一步实现高速 PCR !

高速、高保真、高成功率 PCR Master Mix

## KOD One<sup>®</sup> PCR Master Mix 系列

KOD One<sup>®</sup> PCR Master Mix

Code: KMM-101S	10次份	¥ 100
Code: KMM-101	200次份	¥ 2,000

KOD One<sup>®</sup> PCR Master Mix -Blue-

Code: KMM-201S	10次份	¥ 100
Code: KMM-201	200次份	¥ 2,000

该产品是以改良型 KOD DNA polymerase (UKOD) 为基础开发的 PCR 用 2× Master Mix, 实现了高速 PCR, 同时兼具保真性好和扩增效率高的特点。其中, KOD One<sup>®</sup> PCR Master Mix -Blue- 预混了染料, PCR 后可直接用于电泳上样。



### 产品内容:

<KMM-101>  
2×Master Mix 1ml × 5 支

<KMM-201>  
2×Master Mix(含染料)\* 1ml × 5 支

\* 预混染料对 PCR 反应没有影响。

### 来源:

*E.coli* 重组体

### 保存条件:

-20°C

※ 短期内 (1 个月以内) 连续使用完时, 可在 2~8°C 保存。

### → 特征

#### ① 高速 PCR

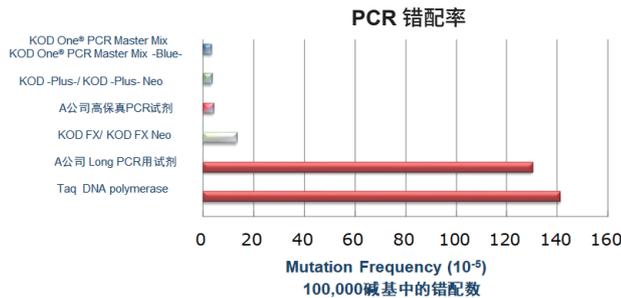
延伸时间设为 1 秒即可扩增 1kb 的片段, 10kb 以内延伸速度为 5 秒 /kb, 高于 10kb 的片段设为 10 秒 /kb, 缩短延伸时间可大幅提高 PCR 实验的总耗时。

#### ② 简便

除了引物和模板之外的 PCR 组分都包含在预混液中, 简化了配液流程, 同时也提高了实验的可重复性。此外, 包含电泳指示剂的 KOD One<sup>®</sup> PCR Master Mix -Blue-(Code No. KMM-201) 可以在 PCR 反应完成后直接点样, 无需另外添加 Loading Dye。

#### ③ 高保真性

保真性为 Taq polymerase 的约 80 倍, 保持了 KOD 系列产品中保真性最高的水准。



\* PCR 错配率是指用人基因组 DNA 为模板, 用各种酶扩增  $\beta$ -globin 基因 (2.4kb), 将 PCR 产物 TA 克隆后, 对 96 个克隆进行测序分析测定得到的值。

#### ④ 可扩增粗样品

不易受粗样品的影响, 可对动植物的裂解液进行基因分型, 还可对土壤、食品样品等进行扩增。

#### ⑤ 可用于含有次黄苷酸 (I) 或尿嘧啶 (U) 的引物和模板

与另一款产品 KOD -Multi & Epi-<sup>®</sup> (Code No. KME-101) 具有类似的扩增能力。

### → 用途: PCR

→ 说明

KOD One® PCR Master Mix 是 KOD 高保真酶系列的最新产品, 按照「一酶多用」的开发理念, 该酶兼具 KOD FX 系列高灵敏度以及 KOD -Plus- 系列超高保真度的特点。通过使用改进的延伸增强剂技术, 可以实现超高速 PCR 反应, 针对含肌苷 (dI) 或尿嘧啶 (dU) 的引物模板或者粗样本都能很好地进行扩增。此外, 因为预添加了抑制酶活性和 3' → 5' 外切酶活性的单抗, 可以进行高特异性的热启动 PCR。

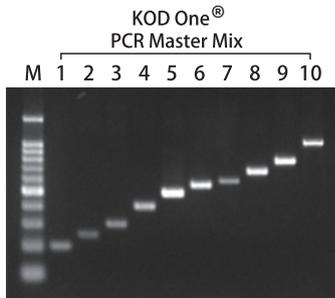
→ 实验例

① 各种长度片段的高速扩增

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。

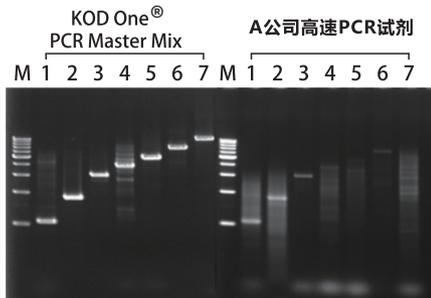
<b>&lt; 反应液 &gt;</b>		<b>&lt; PCR 循环 &gt;</b>		<b>&lt; PCR 循环 &gt;</b>	
灭菌水	21 μl	1kb 以下的目的片段	1 ~ 10kb 的目的片段	1 ~ 10kb 的目的片段	
KOD One® PCR Master Mix 系列	25 μl	98°C 10sec.	98°C 10sec.	98°C 10sec.	X30 cycles
10pmol/μl primer F	1.5 μl	60°C 5sec.	60°C 5sec.	60°C 5sec.	
10pmol/μl primer R	1.5 μl	68°C 1sec.	68°C 1sec.	68°C 5sec./kb	
10ng/μl 人基因组 DNA	1 μl				
<b>Total volume</b>	<b>50 μl</b>	<b>Template: 人基因组 DNA</b>			

[1kb以下:延伸时间1sec]



M : 100bp DNA Ladder  
1 : DDB2(200bp)  
2 : FANCG(250bp)  
3 : HBG(300bp)  
4 : CDH1(400bp)  
5 : chromosome9(500bp)  
6 : ERCC4(550bp)  
7 : HRAS(600bp)  
8 : PRF1(700bp)  
9 : BRCA1(800bp)  
10 : CDK4(1,000bp)

[1~10kb:延伸时间5sec./kb]



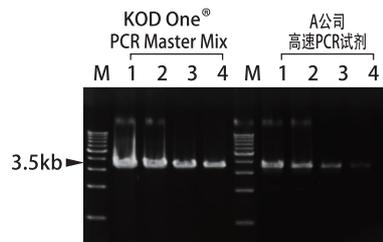
M : 1kb DNA Ladder  
1 : Chrome9(1kb)  
2 : MSH6(2kb)  
3 : FANCE(3kb)  
4 : RAD51D(4kb)  
5 : KRAS(5kb)  
6 : BRCA1(7kb)  
7 : DDB2(10kb)

② 扩增效率和灵敏度的验证

使用人基因组 DNA、cDNA 扩增约 3.5kb 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。

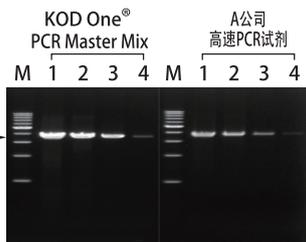
<b>&lt; 反应液 &gt;</b>		<b>&lt; PCR 循环 &gt;</b>	
灭菌水	21 μl	98°C 10sec.	X30 cycles
KOD One® PCR Master Mix 系列	25 μl	60°C 5sec.	
10pmol/μl primer F	1.5 μl	68°C 18sec. (5sec/kb)	
10pmol/μl primer R	1.5 μl		
各模板 DNA	1 μl		
<b>Total volume</b>	<b>50 μl</b>		

[人基因组DNA]



M : 1kb DNA Ladder  
1 : 25 pg  
2 : 6.3 pg  
3 : 1.6 pg  
4 : 0.4 pg

[cDNA]



M : 1kb DNA Ladder  
1 : 25 ng相当  
2 : 5 ng相当  
3 : 1 ng相当  
4 : 0.2 ng相当

基本反应条件:

<b>反应液组成</b>	
灭菌蒸馏水	Xμl
KOD One® PCR Master Mix	25μl
10pmoles /μl Primer F	1.5μl
10pmoles /μl Primer R	1.5μl
模板	~200ng(Genomic DNA) ~50ng( 质粒 ) ~750ng [RNA 相当] (cDNA) ~5μl( 粗样品 )
<b>Total Volume</b>	<b>50μl</b>

Cycle (1)  
< 2 步法循环 >  
98°C, 10sec.  
68°C, 5~10sec./kb } 25~45 cycles

※ 延伸时间请根据扩增片段长度进行设定:  
1 kb 以下: 1sec.  
1~10 kb: 5sec./kb  
10 kb~: 10sec./kb  
进行粗样品扩增时请按照 10sec./kb 进行

Cycle (2)  
< 3 步法循环 >  
98°C, 10sec.  
Tm-5°C, 10sec.  
68°C, 1~10sec./kb } 25~45 cycles

※ 延伸时间请根据扩增片段长度进行设定:  
1 kb 以下: 5sec.  
1~10 kb: 5sec./kb  
10 kb~: 10sec./kb  
进行粗样品扩增时请按照 10sec./kb 进行

引物设计建议:

引物长度尽量设计在 22~35mer 之间 (每条引物的 Tm 值 >63°C)。通过将 GC 含量控制在 45~60% 之间, 其中 5' 端 GC 含量在 60~70%, 3' 端 GC 含量在 40~50%, 可以提高 PCR 反应的特异性。

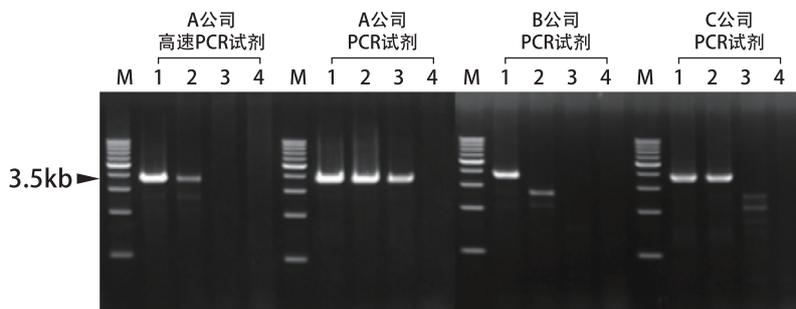
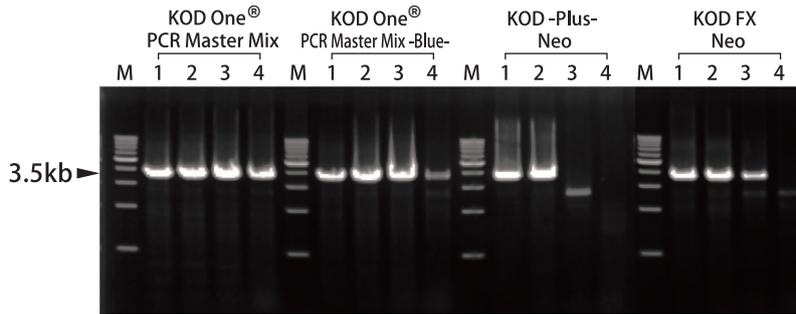
※ 引物 Tm 值使用近邻法 (nearest Neighbour method) 计算。可在官方网站具体产品页面找到相关在线计算工具或本地计算表格。

### 3 逆转录反应液 (cDNA) 作模板时添加量的探讨

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>	
灭菌水	17 $\mu$ l
KOD One® PCR Master Mix 系列	25 $\mu$ l
10pmol/ $\mu$ l primer F	1.5 $\mu$ l
10pmol/ $\mu$ l primer R	1.5 $\mu$ l
cDNA	5 $\mu$ l
<b>Total volume</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

<PCR 循环>	
98°C 10sec.	X30 cycles
60°C 5sec.	
68°C 18sec. (5sec/kb)	



M : 1kb DNA Ladder  
 1 : 125 ng(RNA相当量)  
 2 : 250 ng(RNA相当量)  
 3 : 500 ng(RNA相当量)  
 4 : 1,000 ng(RNA相当量)

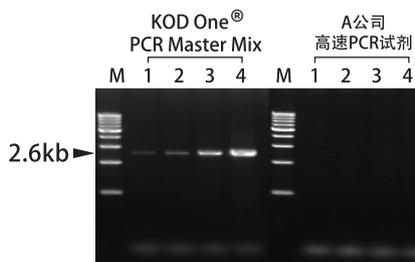
### 4 粗样本的扩增例

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	Y $\mu$ l
KOD One® PCR Master Mix 系列	25 $\mu$ l
10pmol/ $\mu$ l primer F	1.5 $\mu$ l
10pmol/ $\mu$ l primer R	1.5 $\mu$ l
各模板 DNA	X $\mu$ l
<b>Total volume</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

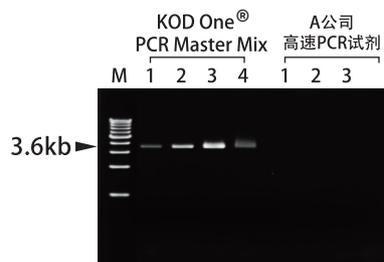
<PCR 循环>	
98°C 10sec.	X30 cycles
60°C 5sec.	
68°C 5sec. (5sec/kb)	

#### [鼠尾裂解液扩增实验]



参考 (→ 2-7 页) protocol 制备上清液  
 M: 1kb DNA Ladder  
 1: 1  $\mu$ l 2: 2  $\mu$ l 3: 3  $\mu$ l 4: 4  $\mu$ l

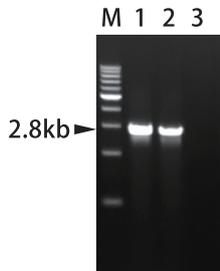
#### [血液直扩实验]



全血  
 M: 1kb DNA Ladder  
 1: 1  $\mu$ l 2: 2  $\mu$ l 3: 3  $\mu$ l 4: 4  $\mu$ l

**5 含次黄（嘌呤核）苷引物的扩增例**

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。



M : 1kb DNA Ladder                      2 : KOD One® PCR Master Mix -Blue-  
1 : KOD One® PCR Master Mix        3 : KOD -Plus- Neo

**< 反应液 >**  
 灭菌水 17 μl  
 KOD One® PCR Master Mix 系列 25 μl  
 10pmol/ μl primer F 1.5 μl\*  
 10pmol/ μl primer R 1.5 μl\*  
 50ng/ μl E.coli 基因组 DNA 5 μl  
**Total volume 50 μl**

**<PCR 循环 >**  
 98°C 10sec.    ↙  
 60°C 5sec.      ↘  
 68°C 15sec.    ↖  
 X30 cycles

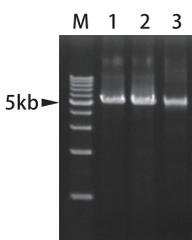
**<Primer 配列 >**  
 Fwd: ATGGTICARATHCCICARAAY  
 Rev: RTGIGCYTRTCCCARTTYTC

\* 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。

**6 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 5kb 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）。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



M : 1kb DNA Ladder  
 1 : 3碱基置换  
 2 : 3碱基缺失  
 3 : 3碱基插入

**< 反应液 >**  
 灭菌水 21 μl  
 KOD One® PCR Master Mix 系列 25 μl  
 10pmol/ μl primer F 1.5 μl  
 10pmol/ μl primer R 1.5 μl  
 50ng/ μl 质粒 1 μl  
**Total volume 50 μl**

**< 突变导入循环条件 >**  
 98°C 10sec.    ↙  
 60°C 5sec.      ↘  
 68°C 25sec. (5sec/kb)    ↖  
 X15 cycles

上述反应液  
 ↓ ← DpnI (10U/ μl; Code No.DPN-101) 2 μl  
 37°C, 1hr.  
 ↓  
 转化 JM109 (Code No.DNA-900)

○ 每组8个克隆的目标突变数和目标外图变数的统计

	突变导入率	目标外图变数
3 碱基置换	8/8 克隆	0 个
3 碱基缺失	8/8 克隆	0 个
3 碱基插入	7/8 克隆	0 个

引物设计例

① 确定需要导入突变的类型和位置

质粒序列	需要导入的变异	5' -ATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'
	碱基置换 ATG→TGC	5' -ATGCATGCATGCATGCATGCATGC <b>TGC</b> CATGCATGCATGCATGCATGC-3'
	碱基缺失 ATG 消除	5' -ATGCATGCATGCATGCATGCATGC.....CATGCATGCATGCATGCATGC-3'
	碱基插入 ATG 前加上 AAA	5' -ATGCATGCATGCATGCATGCATGC <b>AAA</b> 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12~20bp与质粒能退火序列。

质粒序列	5' -ATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'
	5' -TGCATGCATGCATGC <b>TGC</b> CATGCATGCATGCAT-3'    ↗ 替换用Fwd Primer
	5' -TGCATGCATGCATGC.....CATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'    ↗ 缺失用Fwd Primer
	5' -TGCATGCATGCATGC <b>AAA</b> ATGCATGCATGCATGCATGC-3'    ↗ 插入用Fwd Primer

③ 反向引物设计

设计与上述Fwd引物逆向互补的引物。

5' -TGCATGCATGCATGC <b>TGC</b> CATGCATGCATGCAT-3'	↖	替换用Rev Primer
3' -ACGTACGTACGTACG <b>ACG</b> GTACGTACGTACGTA-5'		
5' -TGCATGCATGCATGC.....CATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'	↖	缺失用Rev Primer
3' -ACGTACGTACGTACG.....GTACGTACGTACGTA-5'		
5' -TGCATGCATGCATGC <b>AAA</b> ATGCATGCATGCATGCATGC-3'	↖	插入用Rev Primer
3' -ACGTACGTACGTACG <b>TTT</b> TACGTACGTACGTAC-5'		

→ 相关产品

**1 KOD 系列用高效率 TA 克隆试剂盒 (KOD Dash 除外)**

TARget Clone -Plus-	TAK-201	10 次份	¥380	→ 4-6 页
---------------------	---------	-------	------	---------

改善循环后半部分的扩增停滞现象，延伸时间缩短 (30sec./kb)。保真性 NO.1 !

高保真·高效率·高速 PCR 酶

## KOD -Plus- Neo

Code: KOD-401S 20U × 1支 <20次份> ¥150

Code: KOD-401 200U × 1支 <200次份> ¥1,000

※50 μl 反应体系的使用次数

KOD -Plus- Neo 在高保真性 PCR 酶 KOD -Plus- 系列技术的基础上，应用了本公司新开发的「延伸增强剂」，保持了 KOD-Plus- 系列高保真性 (约为 Taq DNA Polymerase 的 80 倍) 的同时，通过抑制 <停滞现象>，明显提高了对微量模板 DNA、长目的片段的扩增效率。



### 产品内容:

#### <KOD-401>

KOD -Plus- Neo(1U/μl) 200 μl × 1支  
 10 × PCR Buffer for KOD -Plus- Neo 1ml × 1支  
 25mM MgSO<sub>4</sub> 1ml × 1支  
 2mM dNTP 1ml × 1支  
 ※50 μl 反应体系，可以使用 200 次。

### 组成:

50mM Tris-HCl(pH8.0)  
 25mM KCl  
 0.1mM EDTA  
 1mM DTT  
 0.05% Tween® 20  
 0.05% Nonidet® P-40  
 50% Glycerol

### 活性的定义:

在 75°C 活性测定条件下，在 30 分钟内摄入 10nmoles 的全核苷酸使成为酸性不溶物时所需酶的活性定义为 1U。

### 来源:

*E. coli* 重组体

### 保存条件:

-20°C

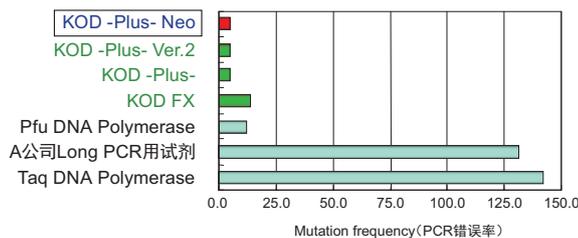
### 参考文献:

- 1) M.Takagi et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4504-4510(1997)
- 2) H.Hashimoto et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, **125**: 983-986(1999)
- 3) H.Mizuguchi et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, **126**: 762-768(1999)
- 4) M.Nishioka et al., *J. Biotechnol.* **88**: 141-149(2001)
- 5) H.Hashimoto et al., *J. Mol. Biol.*, **306**: 469-477(2001)
- 6) T.Imanaka et al., *J. Chin. Inst., Chem. Engrs.*, **32**: 277-288 (2001)

## → 特征

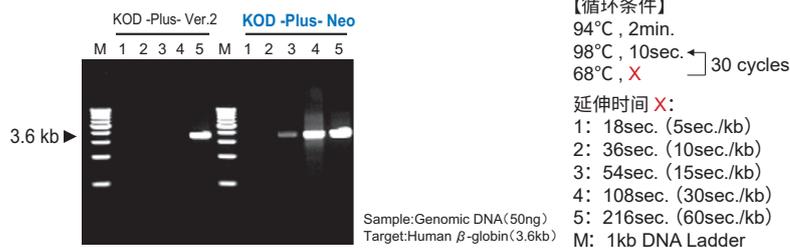
### 1 可对微量模板 DNA 进行高保真·高效率的扩增

KOD -Plus- Neo 中添加了本公司独有的延伸增强剂，即便是微量模板也可对目的基因进行高保真·高效率的扩增。本酶的保真性约为 Taq 酶的 80 倍，也可对低拷贝数模板的目的基因进行高保真性的扩增。



### 2 缩短了延伸时间 <30sec./kb> (长目的片段更方便)

延伸时间从原产品的 1min./kb 缩短到 30sec./kb。由于提高了延伸性，可更迅速地对长片段进行扩增。



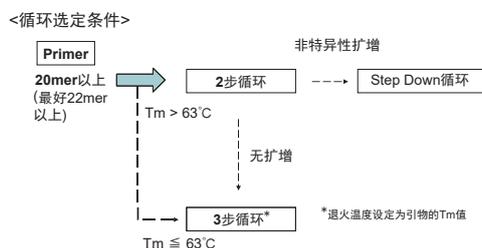
### 3 长链目的片段的扩增

相比以往产品提高了延伸性，可扩增各种长目的片段。已确认可对 24.0kb 的人基因组 DNA 模板进行扩增。

### 4 实现了各种引物同一循环条件

20mer 以上的引物 (T<sub>m</sub> 值 > 63°C) 可先尝试 2 步法。无需摸索条件非常简便。(参照基本反应条件)

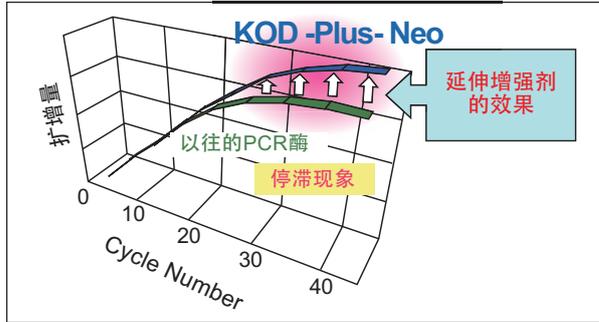
\* 引物 T<sub>m</sub> 值的计算请使用最邻近法 (Nearest Neighbor method)。



→ 用途: PCR

→ 说明

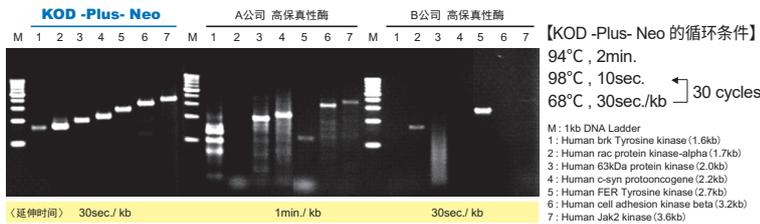
KOD DNA polymerase 具有强力的 3' → 5' 核酸外切酶活性(校正活性), 可准确地对目的片段进行扩增, 作为克隆用 PCR 酶获得了广泛的好评。然而, 高保真性 PCR 酶在 20~30 循环以后, 容易出现扩增无法持续的 < 停滞现象 >。KOD -Plus- Neo 在高保真性 PCR 酶 KOD -Plus- 系列技术的基础上, 应用了本公司新开发的「延伸增强剂」, 保持了 KOD -Plus- 系列高保真性(约为 Taq 的 80 倍)的同时, 通过抑制 < 停滞现象 >, 明显提高了对微量模板 DNA、长目的片段的扩增效率。



→ 结果示例

① Total RNA 的各种基因全长 ORF 的扩增

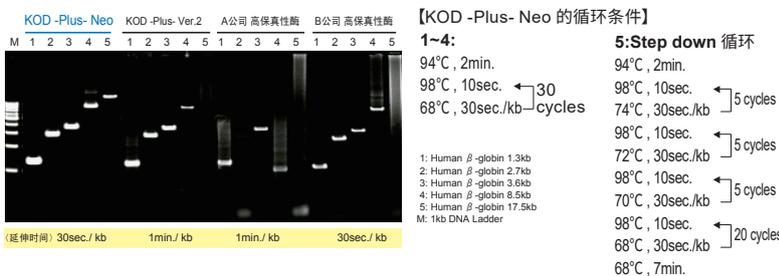
以 HeLa 细胞来源的 Total RNA 逆转录后得到的 cDNA (Total RNA 50ng 相当) 为模板, 对各种蛋白激酶的 ORF (open reading frame) 的全长扩增。反应根据各 PCR 酶的推荐条件进行了 30 个循环。结果可见, 只有用 KOD -Plus- Neo 的情况下, 所有的基因都能得到明亮的扩增产物。



【引物】  
 1 F: ATGGTGTCCCGGACAGCGCT R: GACCTCTGCTGGTTCGTGTAC  
 2 F: TGTGAGCTGGTGCATCAGAG R: GCGTGGCTTCTCAATGCAAC  
 3 F: ACTTGACAGAATGAGGTGCGCG R: ATCCTTCAAGTGTCTGCTCAAC  
 4 F: GTAGAGGGGAGGTTGTTGTGGG R: CAGAGGAGGTTGCGAATTTGGG  
 5 F: AGACTTCACTGCAGTTTCTTC R: TGGAGGACAGAGTCTGAGGC  
 6 F: ACTGCAATGCGGATCTTAGC R: TGCAAAGTGCAAGGGAAGT  
 7 F: GCCCGATCTGTGTAGCCGGTTT R: ATCTTGTCTGCTAGCATCATG

② 各种模板的扩增效率·延伸性的比较

以人基因组 DNA 50ng 为模板, 对各种长度的 β-globin 基因进行扩增。反应按各 PCR 酶的推荐条件, 进行了 30 个循环。结果显示, 只有用 KOD -Plus- Neo 的情况下, 17.5kb 的片段能确认得到明亮的条带。而且, 17.5kb 以下的片段, 用 KOD -Plus- Neo 的得率要高得多。



基本反应条件:

反应液组成		× μl
灭菌蒸馏水		5
10 × PCR Buffer for KOD -Plus- Neo		5
2mM dNTPs		5
25mM MgSO <sub>4</sub>		3
10pmol/μl Primer F		1.5
10pmol/μl Primer R		1.5
KOD -Plus- Neo(1.0U/μl)		1
Genomic DNA	~200ng	
Plasmid DNA	~50ng	
cDNA	~200ng(RNA 相当)	
Total		50

Cycle(1)  
 <2 Step Cycle>  
 94°C 2min.  
 98°C 10sec. ← 25~45 cycles  
 68°C 30sec./kb

Cycle(2)  
 <3 Step Cycle>  
 94°C 2min.  
 98°C 10sec. ← 25~45 cycles  
 Tm°C 30sec.  
 68°C 30sec./kb

Cycle(3)  
 <Step Down Cycle>  
 94°C 2min.  
 98°C 10sec. ← 5 cycles  
 74°C 30sec./kb  
 98°C 10sec. ← 5 cycles  
 72°C 30sec./kb  
 98°C 10sec. ← 5 cycles  
 70°C 30sec./kb  
 98°C 10sec. ← 15~30 cycles  
 68°C 30sec./kb  
 68°C 7min.

※ 引物的 Tm 值在 63°C 以下, 请尝试用三步法。

→ 相关产品

① KOD 系列用高效率 TA 克隆试剂盒(KOD Dash 除外)

Target Clone -Plus-	TAK-201	10 次份	¥ 380	→ 4-6 页
---------------------	---------	-------	-------	---------

② 高效率 DNA 片段抽提试剂盒

MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	NPK-601	200 次份	¥ 1,200	→ 5-10 页
-----------------------------------	---------	--------	---------	----------

在本公司同类产品中，保真性 NO.1 (约为 Taq 的 80 倍)。最适用于克隆。

高效率·高保真性 PCR 酶

## KOD -Plus- / KOD -Plus- Ver.2

KOD -Plus-

Code: KOD-201 200U × 1支 <200次份> ¥ 800

KOD -Plus- Ver.2

Code: KOD-211 200U × 1支 <200次份> ¥ 1,000

※50 μl 反应体系的使用次数

本产品是以 KOD DNA polymerase (→ 2-22 页) 为基础开发的高保真性 PCR 用酶。在本公司的 PCR 酶中保真性最高 (与 KOD -Plus- Neo 同等水平)。



### → 特征

#### 1 优良的保真性 (本公司同类产品中为第一)

KOD DNA polymerase 的特点是具有非常高水准的保真性，而 KOD -Plus- 的保真性有了更大的提高。大约为 Taq DNA Polymerase 的 80 倍，最适用于 DNA 克隆。

#### 2 通过热启动提高了 PCR 反应效率

通过将两种抗 KOD 单克隆抗体预混合在酶中，抑制了 PCR 反应前常温状态下的多聚酶活性和 3' → 5' 核酸外切酶活性。抗体在 PCR 最初的变性步骤即发生失活，但对扩增反应没有任何影响。

#### 3 延伸性、扩增效率的提高

对反应缓冲液的组成进行了最优化的重组，使之较以往的 KOD DNA polymerase 延伸性及扩增效果均有了很大的提高。

#### 4 超群的耐热性

因其耐热性比 Taq DNA Polymerase 更为优良，故可以将热变性步骤的温度设定值提高，对高 GC 含量的模板等具有特异性高级结构的目的片段尤其适用。

#### 5 高 PCR 成功率 [KOD -Plus- Ver.2]

对难扩增的目的片段、长目的片段的扩增成功率比 KOD -Plus- 更高。另外，也降低了逆转录后 cDNA 中残留的 RNA 对 PCR 反应的抑制。

### → 用途: PCR

### → 说明

本酶由于对反应缓冲液的组成进行了改良及通过采用热启动法等，保真性、PCR 效率有了非常显著的提升。KOD -Plus- Ver.2 由于对反应缓冲液进行了进一步的改良，PCR 成功率更高。

### → 原理

有关热启动法的原理，请见 (→ 2-5 页)。

### → 几点建议

#### 1 PCR 产物的克隆

由于本酶的 PCR 产物已被平滑化，因此可以通过平滑末端法进行克隆。此时若载体已进行了脱磷酸化处理，则需要对 PCR 产物也进行磷酸化处理，或者采用带 5' 磷酸基的引物 (→ 3-3 页)。

另外，由于本酶的 PCR 产物已被平滑化，因此不能直接用于 TA 克隆。如要进行简单、高效的 TA 克隆，建议用专用的高效率 TA 克隆试剂盒「TARget Clone -Plus-」(→ 4-6 页)。

#### 2 PCR 条件的设定

本酶的标准使用量为 50 μl 反应体系 1U。

在 68°C 温度条件下进行延伸反应，1kb 目的片段的标准反应时间为 1min.。如产生 smear，则可试着降低 MgSO<sub>4</sub> 的浓度，如未发现扩增现象，则可试着提高 MgSO<sub>4</sub> 的浓度。

### 产品内容:

#### <KOD -Plus->

KOD -Plus-(1U/μl)*	200 μl × 1支
10 × PCR Buffer**	1ml × 1支
25mM MgSO <sub>4</sub>	1ml × 1支
2mM dNTPs***	1ml × 1支

#### <KOD -Plus- Ver.2>

KOD -Plus-(1U/μl)*	200 μl × 1支
10 × PCR Buffer**	1ml × 1支
25mM MgSO <sub>4</sub>	1ml × 1支
2mM dNTPs***	1ml × 1支

\* 含 KOD 抗体浓度为 1.6 μg/μl

\*\*KOD -Plus- 和 KOD -Plus- Ver.2 区别仅在于 Buffer 组成的差异。各 Buffer 有单独出售 (→ 2-39 页)。

\*\*\* 用本酶进行 PCR 时，请务必使用本品添附的 dNTPs。如使用其他产品添附的 dNTPs，则可能无法充分发挥本酶的性能。

### 组成:

50mM	Tris-HCl(pH8.0)
0.1mM	EDTA
1mM	DTT
0.001%	Tween® 20
0.001%	Nonidet® P-40
50%	Glycerol

### 活性的定义:

在 75°C 活性测定条件下，在 30 分钟内摄入 10nmoles 的全核苷酸使成为酸性不溶物时所需酶的活性定义为 1U。

### 来源:

*E. coli* 重组体

### 保存条件:

-20°C

### 参考文献:

- 1) J.Mo et al., *J.Mol.Biol.*, **222**: 925-936(1991)
- 2) M.Takagi et al., *Appl.Environ.Microbiol.*, **63**: 4504-4510(1997)
- 3) H.Hashimoto et al., *J.Biochem.* (Tokyo), **125**: 983-986(1999)
- 4) H.Mizuguchi et al., *J.Biochem.* (Tokyo), **126**: 762-768(1999)
- 5) H.Hashimoto et al., *J.Mol.Biol.*, **306**: 469-477(2001)
- 6) M.Watanabe et al., *J.Biochem.* (Tokyo), **131**: 183-191(2002)
- 7) H.Terasaki et al., *Intl.J.Mol.Med.*, **9**: 107-112(2002)

### 备注:

本酶所用的 10 × PCR Buffer 为各产品专用。

**3 高 GC 含量的模板**

将 DMSO 以终浓度 2~5% 添加到反应液中，有时会改善 PCR 的反应结果。

**4 RT 反应液为模板**

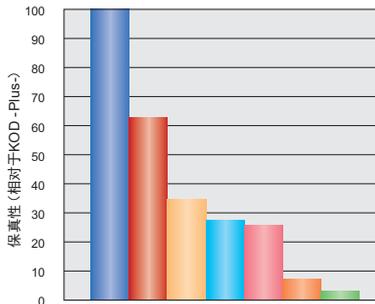
大量的 RT 反应液有时会抑制 PCR 反应。将 RT 反应液加入到 PCR 中时，建议将其量控制在 PCR 最终反应液量的 1/25 以下（最好在 1/50 以下）。此时，不必考虑将 RT 反应液的 Mg<sup>2+</sup> 或 dNTPs 带入到 PCR 反应液中所带来的影响，而只要按照基本反应条件添加本酶添附的 dNTPs 和 MgSO<sub>4</sub> 即可。

**5 引物的设计**

如果在 3' 端有错配引物会受到本酶的校正。

**→ 结果示例**

**1 各公司 PCR 酶保真性的比较(相对于 KOD -Plus-)**

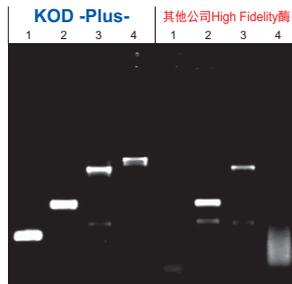


与其他公司 PCR 用酶进行比较，  
可得知 KOD -Plus- 的保真性最高。  
该保真性为 Taq DNA Polymerase 的  
约 82 倍。

**2 与其他公司高保真性 PCR 酶在 PCR 扩增性能方面的比较**

以 Human β-globin 基因 0.6~3.6kb 为目的片段，用 KOD -Plus- 及其他公司的高保真性 PCR 酶进行扩增并比较。

结果可见，与其他公司 High Fidelity 酶相比较，KOD -Plus- 显示了良好的扩增效果。

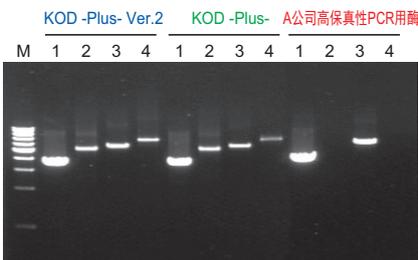


延伸时间  
KOD -Plus-: 1min/kb  
其他公司高保真性 PCR 酶: 30sec/kb  
※ 两种酶对所有目的片段都用了同样的循环条件进行 PCR。

Target  
1: human β-globin 0.6 kb  
2: 1.3 kb  
3: 2.8 kb  
4: 3.6 kb

**3 以各种 cDNA 为目的片段与其他公司 PCR 用酶在 PCR 扩增性能方面的比较**

以 HeLa total RNA 逆转录的 cDNA 为模板，对 4 种目的片段进行 PCR 并比较其效率。结果可见，与其他酶相比，KOD -Plus- Ver.2 显示了良好的扩增效果。特别是对难扩增的 6.8kb 的目的片段，也能得到明亮的扩增条带。



Template: HeLa 细胞来源 cDNA  
1: human transferrin receptor cDNA 3.5kb  
2: human tuberous sclerosis cDNA 5.3kb  
3: human adaptin cDNA 5.7kb  
4: human polymerase ε cDNA 6.8kb  
M: 1kb ladder

**基本反应条件:**

<b>&lt;KOD -Plus-&gt;</b>	
灭菌蒸馏水	X μl
10 × PCR Buffer*	5 μl
25mM MgSO <sub>4</sub>	2 μl(1mM)
各引物	15pmoles each
2mM dNTPs	5 μl(0.2mM)
模板	1~50ng(Plasmid)
	10~200ng(Genomic DNA)
	~1 μl(逆转录反应液)
KOD -Plus-(1U/μl)	1 μl(1U)
Total Volume	50 μl

\*KOD -Plus- 用 Buffer (→ 2-39 页)。

Cycle(1)  
94°C 2min.  
↓  
94°C 15sec.  
Tm-5°C 30sec. ← 25~35 cycles  
68°C 1min./kb

Cycle(2)  
94°C 2min.  
↓  
94°C 15sec. ← 25~35 cycles  
68°C 1min./kb

引物的 Tm 值在 72°C 以上的温度条件下，用 Cycle(1) 如产生了 Smear，改用 Cycle(2) 则可能消除 Smear。

**<KOD -Plus- Ver.2>**

<b>&lt;KOD -Plus- Ver.2&gt;</b>	
灭菌蒸馏水	X μl
10 × PCR Buffer*	5 μl
25mM MgSO <sub>4</sub>	3 μl(1.5mM)
各引物	15pmoles each
2mM dNTPs	5 μl(0.2mM)
模板	1~50ng(Plasmid)
	10~200ng(Genome DNA)
	~2 μl(逆转录反应液)
KOD -Plus-(1U/μl)	1 μl(1U)
Total Volume	50 μl

\*KOD -Plus- Ver.2 用 Buffer (→ 2-39 页)。

Cycle(1)  
94°C 2min.  
↓  
98°C 10sec.  
Tm-5°C 30sec. ← 25~40 cycles  
68°C 1min./kb

Cycle(2)  
94°C 2min.  
↓  
98°C 10sec. ← 25~40 cycles  
68°C 1min./kb

引物的 Tm 值在 72°C 以上的温度条件下，用 Cycle(1) 如产生了 Smear，改用 Cycle(2) 则可能消除 Smear。

**→ 相关产品**

**1 KOD 系列产品专用 TA 克隆试剂盒(KOD Dash 除外)**

Target Clone -Plus-	TAK-201	10 次份	¥380	→ 4-6 页
<b>2 高效率 DNA 片段抽提试剂盒</b>				
MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	NPK-601	200 次份	¥1,200	→ 5-10 页
<b>3 专用 PCR Buffer</b>				
10 × PCR Buffer	-	1ml × 1 支	-	→ 2-39 页

## 延伸性·粗样品扩增能力得到了飞跃式的提高!

高效率·高成功率 PCR 酶

# KOD FX Neo

Code: KFX-201S 20U × 1支 <20次份> ¥200

Code: KFX-201 200U × 1支 <200次份> ¥2,400

※50 μl 反应体系的使用次数

KOD FX Neo 是在高成功率 PCR 酶 KOD FX (→ 2-24 页) 的基础上添加了【延伸增强剂】而开发的 PCR 酶。在保持高扩增效率的同时, 进一步提高了对难扩增序列、微量模板 DNA、长目的片段及粗样品的扩增效率。



### 产品内容:

#### <KFX-201>

KOD FX Neo(1U/μl) 200 μl × 1支  
 2 × PCR Buffer for KOD FX Neo\* [KFX-2B] 1.7ml × 3支  
 2mM dNTPs [NTP-201] 1ml × 2支

※50 μl 反应体系的情况下可使用 200 次。

\*含终浓度 2.0mM 的 Mg<sup>2+</sup>

### → 特征

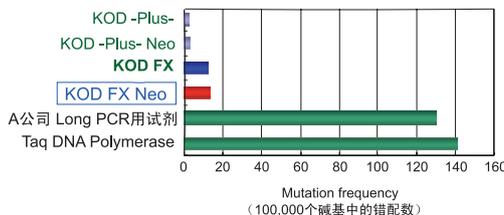
#### 1 卓越的 PCR 性能

以基因组 DNA 为模板最大可扩增 40Kb 的片段。

可实现 30sec./kb 的高速循环。(粗样品推荐 1min./kb。)

最适用于高 GC 目的片段等难扩增序列。

※保真性约为 Taq DNA Polymerase 的 11 倍。



#### 2 提高了粗样品的扩增能力

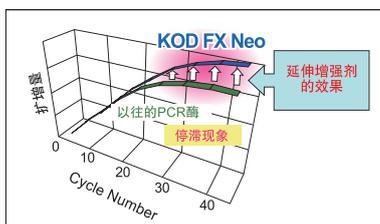
- 提高了对植物裂解液及鼠尾(裂解液)等的扩增效率。
- 革兰氏阳性菌及酵母、霉菌等微生物, 毛发、指甲等的动物组织, 哺乳动物培养细胞及血液等, 可直接进行 PCR。
- 相比以往的产品, 本产品对 PCR 抑制剂的抵抗能力更强, 可对土壤及食品等粗样品进行扩增。

### → 用途: PCR

### → 说明

KOD DNA polymerase 具有卓越的延伸性, 同时对粗样品成分中的抑制物质有很强的抵抗力。KOD FX 就是利用这种特性而开发出来的高成功率 PCR 酶, 该酶在难扩增序列及粗样品的扩增方面受到了广泛的好评。然而, 以 KOD FX 为代表的以往的 PCR 酶在 20 ~ 30 个循环以后, 很容易出现扩增无法持续的 <停滞现象>, PCR 的功能无法完全发挥出来。

[KOD FX Neo] 是在 KOD FX 的基础上, 应用了本公司新开发的[延伸增强剂]技术, 从而成功地抑制了 <停滞现象>, 进一步提高了对长目的片段、难扩增序列及粗样品等的扩增效率。



### → 结果示例

#### 1 扩增长度的比较

使用 KOD FX Neo 及以往的产品, 以人基因组 DNA 为模板进行长链目的片段的扩增。结果显示, 只有使用 KOD FX Neo 的情况下, 才可以确认扩增 40kb 长的目的片段。另外, 与以往产品相比, KOD FX Neo 只需一半的延伸时间 (30sec/kb) \*, 因此, 可以极大地缩短反应时间。

\*粗样品扩增时建议按 1min/kb 进行。

### 活性的定义:

在 75°C 活性测定条件下, 在 30 分钟内摄入 10nmoles 的全核苷酸使成为酸性不溶物时所需酶的活性定义为 1U。

### 来源:

*E. coli* 重组体

### 保存条件:

-20°C

### 参考文献:

- 1) M.Takagi et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4504-4510(1997)
- 2) H.Hashimoto et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, **125**: 983-986(1999)
- 3) H.Mizuguchi et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, **126**: 762-768(1999)
- 4) M.Nishioka et al., *J. Biotechnol.* **88**: 141-149(2001)
- 5) H.Hashimoto et al., *J. Mol. Biol.*, **306**: 469-477(2001)
- 6) T.Imanaka et al., *J. Chin. Inst., Chem. Engrs.*, **32**: 277-288 (2001)

### 基本反应条件:

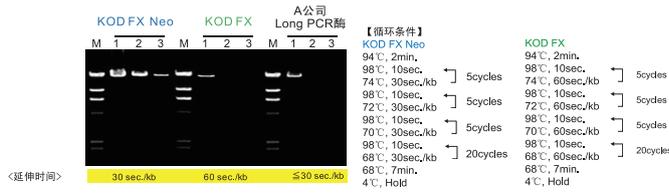
反应液组成	
灭菌水	X μl
2 × PCR Buffer for KOD FX Neo	25 μl
2mM dNTPs	10 μl
10pmoles / μl Primer F	1.5 μl
10pmoles / μl Primer R	1.5 μl
KOD FX Neo(1.0U/μl)	1 μl
Genomic DNA	10~200ng
Plasmid	1~50ng
cDNA	~200ng(RNA 相当)
粗样品	~2 μl
	(一步法植物裂解液 1 μl)
Total Volume	50 μl

\*KOD FX Neo 用 Buffer (→ 2-39 页)

Cycle (1)

#### <2 Step Cycle>\*

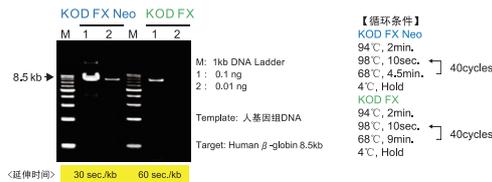
94°C,	2min.	
98°C,	10sec.	← 25~45 cycles
68°C,	30sec./kb	



M:  $\lambda$ /Hind III Marker  
 1: pA 24kb  
 2: Hg52kb  
 3: Hg540kb  
 Template: 人基因组DNA 200ng/50  $\mu$ l

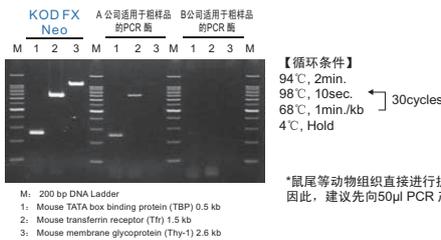
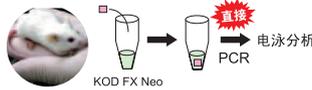
### 2 检测灵敏度的比较

以人基因组 DNA 为模板进行检测灵敏度的比较。结果可见，与原产品相比，KOD FX Neo 的灵敏度提高了约 10 倍。



### 3 鼠尾直接 PCR

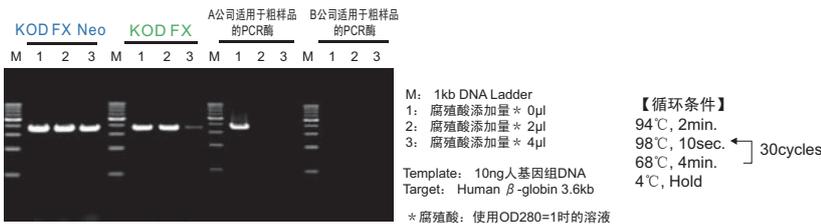
将鼠尾直接添加到 PCR 反应液中，用各种 PCR 酶进行扩增并比较。结果可见，只有用 KOD FX Neo 才能得到良好的扩增。像这样，KOD FX Neo 能够对样品进行直接 PCR，可以省略掉繁杂的纯化过程。



\*鼠尾等动物组织直接进行扩增时，PCR 产物会残留在琼脂糖凝胶电泳的孔里。因此，建议先向50 $\mu$ l PCR 产物中加入10 $\mu$ l 20mg/ml 的 Proteinase K 再进行电泳。

### 4 腐殖酸添加实验

腐殖酸 (humic acid) 是存在于腐殖土及土壤等中的红褐色或黑褐色有机物质，对 PCR 有抑制作用。通常进行的 DNA 纯化过程中不能去除这种腐殖酸，因此，以环境、生态体系中的样品作为模板进行 PCR 非常困难。这里，以人基因组 DNA 中混入腐殖酸为例，探讨了其对 PCR 的抑制作用。结果显示，KOD FX Neo 对抗腐殖酸的能力最强。因此，使用 KOD FX Neo 可以对环境、生态体系中的样品进行 PCR。



### Cycle (2)

#### <3 Step Cycle>

94°C, 2min.  
 98°C, 10sec.  
 (Tm) $^{\circ}$ C, 30sec.  
 68°C, 30sec./kb

25~45 cycles

### Cycle (3)

#### <Step Down Cycle>\*

94°C, 2min.  
 98°C, 10sec. 5 cycles  
 74°C, 30sec./kb  
 98°C, 10sec. 5 cycles  
 72°C, 30sec./kb  
 98°C, 10sec. 5 cycles  
 70°C, 30sec./kb  
 98°C, 10sec. 15~30 cycles  
 68°C, 30sec./kb  
 68°C, 7min.

\*引物的 Tm 值在 63°C 以下，请尝试用三步法。

### < 碱裂解法 >

(动物组织裂解液的配制)

- 1) 将鼠尾(约 3mm)放入离心管中。
- 2) 添加 50mM NaOH 180  $\mu$ l。
- 3) Vortex 充分振荡。
- 4) 95°C \*10min。
- 5) 添加 1M Tris-HCl(pH8.0) 20  $\mu$ l。
- 6) Vortex 充分振荡。
- 7) 离心(12,000rpm, 10min)
- 8) 取 0.5~2  $\mu$ l 上清进行 PCR 反应。(鼠尾不会也无需完全溶解)

### < 一步法 >

(植物组织裂解液的配制)

- 1) 将叶片(3mm)或精米1粒放入离心管中。
- 2) 添加 Buffer A\* 100  $\mu$ l。
- 3) Vortex 充分振荡。
- 4) 95°C \*10min。
- 5) Vortex 充分振荡。
- 6) 离心(12,000rpm, 10min)
- 7) 取 1  $\mu$ l 上清进行 PCR 反应。(植物组织不会也无需完全溶解)

\*Buffer A:  
 100mM Tris-HCl(pH9.5)  
 1M KCl  
 10mM EDTA

## → 相关产品

### 1 (单独另售的部分)

2 × PCR Buffer for KOD FX Neo	KFX-2B	1.7ml × 1 支	¥100	→ 2-39 页
2mM dNTPs Mixture	NTP-201	1ml × 1 支	¥65	→ 2-39 页

### 2 KOD 系列产品专用高效率 TA 克隆试剂盒 (KOD Dash 除外)

Target Clone -Plus-	TAK-201	10 次份	¥380	→ 4-6 页
---------------------	---------	-------	------	---------

### 3 高效率 DNA 片段抽提试剂盒

MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	NPK-601	200 次份	¥1,200	→ 5-10 页
-----------------------------------	---------	--------	--------	----------

## 高成功率 PCR 酶。轻松扩增粗样品、难扩增序列！

High Performance DNA polymerase

# KOD FX

Code: KFX-101 200U × 1支 <200次份>  
 ※50 μl 反应体系的使用次数

¥ 1,200

在 KOD DNA polymerase 基础上开发的高性能 PCR 试剂。本酶具有出色的「扩增成功率」、「扩增效率」和「延伸性」，可对各种长度的目的片段进行 PCR。



### → 特征

#### ① 高扩增成功率

对高 GC 含量的目的片段、细胞悬液、鼠尾 / 植物裂解液、全血、真菌、酵母等粗样品也可进行高成功率扩增。

#### ② 超群的扩增效果

由于得率很高，因此即便模板量很少也可进行扩增。

#### ③ 出色的延伸性

以 λDNA 为模板可以扩增出 40kb；以人类基因组为模板可扩增出 24kb；以 cDNA 为模板可扩增出 13.5kb。

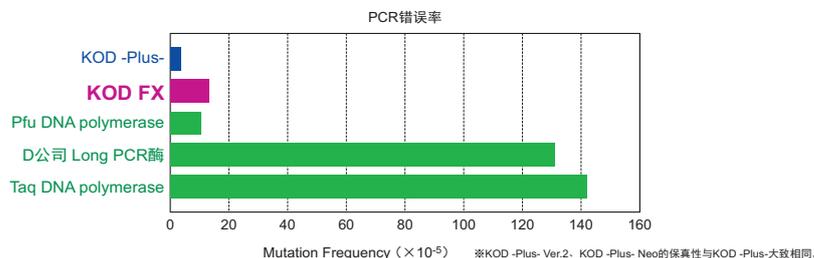
#### ④ 通过热启动提高了 PCR 反应效率

通过将两种抗 KOD 单克隆抗体预混合在酶中，抑制了 PCR 反应前常温状态下的多聚酶活性和 3' → 5' 核酸外切酶活性。抗体在 PCR 最初的变性步骤即发生失活，但对扩增反应没有任何影响。

### → 用途: PCR

### → 说明

KOD FX 是 PCR 成功率非常高，适合于所有实验的 PCR 酶。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）144535 个碱基中仅为 19 个（保真性是 Taq DNA polymerase 的约 11 倍）。由此可见，KOD FX 的保真性虽比 KOD -Plus-、KOD -Plus- Ver.2 和 KOD -Plus- Neo 要差一些，但仍可进行充分的克隆。通过本酶扩增的 DNA 片段的末端基本上都被平滑化。



### → 原理

有关热启动法的原理，请见（→ 2-5 页）。

### → 几点建议

#### ① 引物的设计

对 10kb 以上长目的片段进行扩增时，建议使用 Cartridge 柱以上纯化级别，27mer 以上的引物。另外，如果在 3' 端有错配引物会受到本酶的校正。

### 产品内容:

KOD FX DNA Polymerase(1U/μl) 200 μl × 1支  
 2 × PCR Buffer\* 1.7ml × 3支  
 2mM dNTPs 1ml × 2支  
 \*含终浓度 2.0mM 的 Mg<sup>2+</sup>  
 请注意节约使用 2 × PCR Buffer

### 组成:

50mM Tris-HCl(pH8.0)  
 0.1mM EDTA  
 1mM DTT  
 0.001% Tween® 20  
 0.001% Nonidet® P-40  
 50% Glycerol

### 活性的定义:

在 75°C 活性测定条件下，在 30 分钟内摄入 10nmoles 的全核苷酸使成为酸性不溶物时所需酶的活性定义为 1U。

### 来源:

*E. coli* 重组体

### 保存条件:

-20°C

### 参考文献:

- 1) M.Takagi et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4504-4510(1997)
- 2) H.Hashimoto et al., *J.Biochem. (Tokyo)*, **125**: 983-986(1999)
- 3) H.Mizuguchi et al., *J.Biochem. (Tokyo)*, **126**: 762-768(1999)
- 4) H.Hashimoto et al., *J.Mol.Biol.*, **306**: 469-477(2001)
- 5) M.Watanabe et al., *J.Biochem. (Tokyo)*, **131**: 183-191(2002)
- 6) H.Terasaki et al., *Intl.J.Mol.Med.*, **9**: 107-112(2002)

### 商品使用文献:

- 1) K.Wakahara et al., *Mol Cancer Res* **6**: 1937-1945(2008)
- 2) N.Yamada et al., *Mol Vis.*, **15**: 974-979(2009)

## 2 PCR 产物的克隆

由于本酶的 PCR 产物已被平滑化,因此可以通过平滑末端法进行克隆。此时若载体已进行了脱磷酸化处理,则需要对 PCR 产物也进行磷酸化处理,或者采用带 5' 磷酸基的引物(→ 4-3 页)。

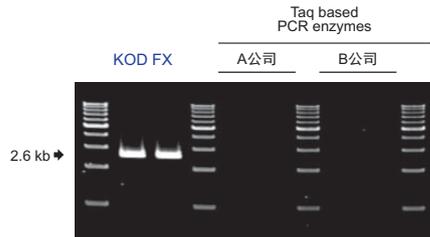
另外,由于本酶的 PCR 产物已被平滑化,因此不能直接用于 TA 克隆。如要进行简单、高效的 TA 克隆,建议使用专用的高效率 TA 克隆试剂盒「TARget Clone -Plus-」(→ 4-6 页)。

## → 结果示例

### 1 用碱裂解法配制的 Mouse tail lysate 的扩增例

将碱裂解法(请参照右边的反应条件)配制的 Mouse tail lysate 0.5 μl, 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。

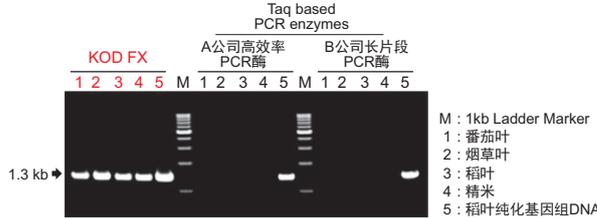
结果可见,只有在用 KOD FX 的情况下,才能确认到明亮的扩增条带。相比使用 Proteinase K 的方法,碱裂解法所花工夫较少,可更简便地进行转基因小鼠的基因分析。



### 2 用一步法配制的植物 lysate 的扩增例

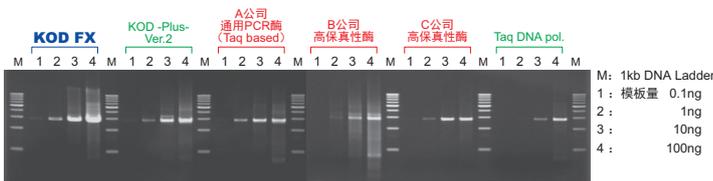
将一步法(请参照右边的反应条件)配制的番茄叶、烟草叶、稻叶以及精米的裂解液各 1 μl, 直接添加到 PCR 反应液中,以 rbcL 为目的片段,采用两步法,进行 30 个循环的扩增。

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。



### 3 模板 DNA 量的探讨

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 μl 反应体系中,用 15pmoles 引物、KOD FX 1U、2 step cycle 进行 30 cycles 扩增反应。结果可见,与其他公司的 PCR 酶相比较,用 KOD FX 可得到更明亮更好的效果。



模板: human 基因组 DNA 0.1ng ~ 100ng/50 μl 反应体系 PCR 循环条件: 94°C 2min, 98°C 10sec, 68°C 3min. □ 进行了 30 个循环。  
目的片段: β-globin 2.8kb

### 基本反应条件:

反应液组成	X μl
灭菌蒸馏水	
2 × PCR Buffer for KOD FX	25 μl
2mM dNTPs	10 μl(0.4mM)
各引物	15pmoles each
模板	1~50ng(Plasmid)
	10~200ng(Genomic DNA)
	~200ng「RNA 相当」(cDNA)
	~2 μl(粗样品)
	<一步法配制的植物裂解液 1 μl>
KOD FX(1U/μl)	1 μl(1U)
Total Volume	50 μl

### 2 Step Cycle\*

94°C	2min.	
98°C	10sec.	← 25~40 cycles
68°C	1min./kb	

### 3 Step Cycle\*

94°C	2min.	
98°C	10sec.	← 25~40 cycles
(Tm-5)°C	30sec.	
68°C	1min./kb	

### Step Down Cycle\*

94°C	2min.	
98°C	10sec.	← 5 cycles
74°C	1min./kb	
98°C	10sec.	← 5 cycles
72°C	1min./kb	
98°C	10sec.	← 5 cycles
70°C	1min./kb	
98°C	10sec.	← 15~25 cycles
68°C	1min./kb	
68°C	7min.	

\*引物的 Tm 值在 63°C 以下,请尝试用三步法。

### < 碱裂解法 >

- 1) Mouse tail(约 3mm)放入离心管中。
- 2) 添加 50mM NaOH 180 μl。
- 3) Vortex 充分振荡。
- 4) 95°C • 10min。
- 5) 添加 1M Tris-HCl(pH8.0) 20 μl。
- 6) Vortex 充分振荡。
- 7) 离心(12,000rpm, 10min)
- 8) 取 0.5~2 μl 上清进行 PCR 反应。(Mouse tail 不会也无需完全溶解)

### < 一步法 >

- 1) 叶(3mm 小块)或精米(1粒)放入离心管中。
- 2) 添加 Buffer A\* 100 μl。
- 3) Vortex 充分振荡。
- 4) 95°C • 10min。
- 5) Vortex 充分振荡。
- 6) 离心(12,000rpm, 10min)
- 7) 取 1 μl 上清进行 PCR 反应。(植物组织不会也无需完全溶解)

### \*Buffer A:

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

※ 更多实验例请参考我司中文网站:  
[www.bio-toyobo.cn](http://www.bio-toyobo.cn)

## → 相关产品

### 1 KOD 系列产品专用 TA 克隆试剂盒(KOD Dash 除外)

TARget Clone -Plus-	TAK-201	10 次份	¥380	→ 4-6 页
2 高效率 DNA 片段抽提试剂盒				
MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	NPK-601	200 次份	¥1,200	→ 5-10 页
3 专用 PCR Buffer				
2 × PCR Buffer for KOD FX	KFX-1B	1.7ml × 1 支	¥100	→ 2-39 页

最适于特异性且均一的多重 PCR，以及亚硫酸氢盐处理过的 DNA 扩增。

多重 PCR · 亚硫酸氢盐处理过的 DNA 用高保真性 PCR 酶

## KOD -Multi & Epi-<sup>®</sup>

Code: KME-101S	20次份	¥200
Code: KME-101	200次份	¥2,000

KOD -Multi & Epi-<sup>®</sup> 是使用基因改良的 KOD DNA polymerase (UKOD) 而开发的高保真性 PCR 酶。  
该酶可用于以往的高保真性 PCR 酶不能实现的各种用途。



### 产品内容:

<b>&lt;KME-101&gt;</b>	
KOD -Multi & Epi- <sup>®</sup>	200 μl × 1支
2 × PCR Buffer for KOD -Multi & Epi- <sup>®</sup>	1.7ml × 3支
Nuclease free Water	1ml × 3支

### 活性的定义:

在75°C活性测定条件下，在30分钟内摄入10nmoles的全核苷酸使成为酸性不溶物时所需酶的活性定义为1U。

### 来源:

*E. coli* 重组体

### 保存条件:

-20°C

### 基本反应条件:

(1) 单重 PCR 反应条件	
反应液组成	
灭菌蒸馏水	X μl
2 × PCR Buffer for KOD -Multi & Epi- <sup>®</sup>	25 μl
10pmoles / μl Primer F	1.5 μl
10pmoles / μl Primer R	1.5 μl
模板	~200ng(Genomic DNA)
	~50ng(质粒)
	~200ng[RNA 相当](cDNA)
	~5 μl(粗样品)
KOD -Multi & Epi- <sup>®</sup> (1.0U/μl)	1 μl
Total Volume	50 μl

### Cycle (1)

< 2 步法循环 >

[引物的 T<sub>m</sub> 值超过65°C时]

94°C,	2min.	} 30 cycles
98°C,	10sec.	
68°C,	15~60sec./kb	

### Cycle (2)

< 3 步法循环 >

[引物的 T<sub>m</sub> 值在 65°C 以下时]

94°C,	2min.	} 30 cycles
98°C,	10sec.	
T <sub>m</sub> °C,	10sec.	
68°C,	15~60sec./kb	

## → 特征

### ① 均一性扩增 (低偏差)

1 kb 以下的短片段至 10 kb 左右的长链目的片段的范围内，本产品均可进行高特异性且均一的多重 PCR。将因 GC 偏差引起的对扩增的影响降到了最低程度，可均一地扩增基因组及转录组的各种区域的片段。

利用这一特性，可制备用于二代测序分析的扩增产物。

### ② 含有较多尿嘧啶 DNA 的扩增

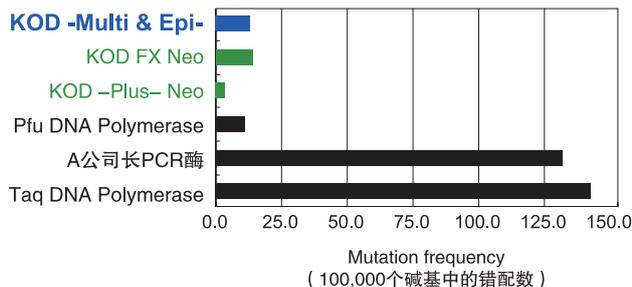
可对亚硫酸氢盐处理后的含有较多尿嘧啶的 DNA 进行高效率的扩增，已确认最大可扩增长度约为 1.5 kb。

### ③ 可用于含有次黄苷酸 (I) 或尿嘧啶 (U) 的引物

以往的高保真性 PCR 酶用含有 I 或 U 的引物难以扩增，而 KOD -Multi & Epi-<sup>®</sup> 则可以使用这类引物进行分析。

### ④ 高保真性

保真性为 Taq polymerase 的约 11 倍 (与 KOD FX Neo 相同)，扩增产物可用于各种用途。



\* PCR 错配率是指用人基因组DNA为模板，用各种酶扩增β-globin 基因 (2.4kb)，将 PCR 产物TA克隆后，对96个克隆进行测序分析测定得到的值。

### ⑤ 可扩增粗样品

不易受粗样品的影响，可对动植物的裂解液进行基因分型，还可对土壤、食品样品等进行扩增。

### ⑥ 高效率

通过添加延伸加速剂，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、亚硫酸氢盐处理过的 DNA 样品时，以及进行长链多重 PCR 时，为了提高效率，延伸速度建议设为 30~60 sec./ kb。详细信息请参考使用说明书。

## → 用途

### ① 多重 PCR

### ② 亚硫酸氢盐处理过的 DNA 的扩增

→ 说明

KOD -Multi & Epi-® 通过使用基因改良的 KOD DNA polymerase (UKOD), 可以使用迄今为止难以扩增的含较多尿嘧啶的模板及含次黄嘌呤核苷的引物。而且由于添加了延伸加速剂等组分, 提高了延伸性, 所以不容易出现因序列及扩增长度等引起的扩增偏差。

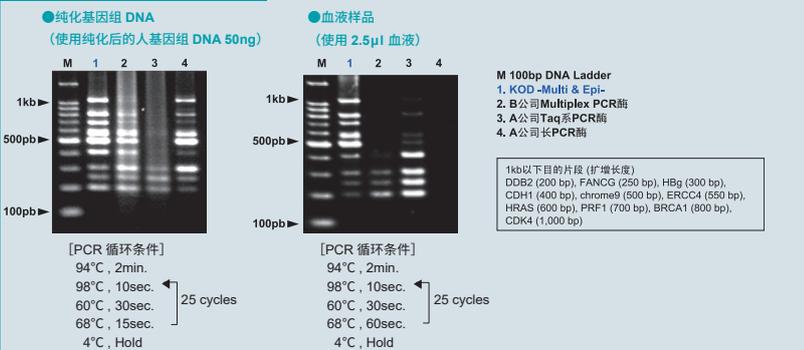
因此, KOD -Multi & Epi-® 可用于多重 PCR 及亚硫酸氢盐处理过的 DNA 的扩增 (表现遗传学分析)、宏基因组分析等各种用途。另外, 本酶的保真性是 Taq polymerase 的 11 倍, 得到的扩增产物可通过克隆, 用于以往的测序分析及二代测序等广泛用途。

→ 实验例

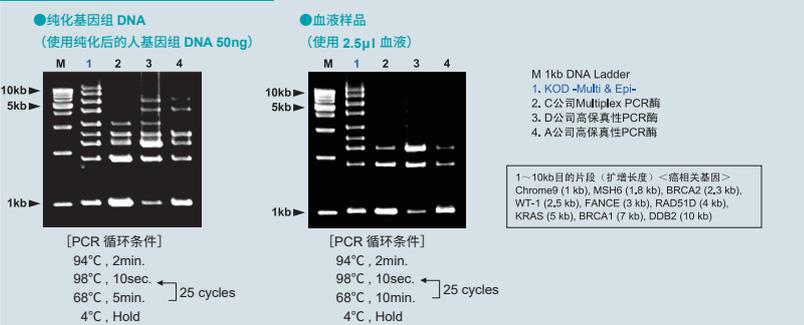
① 多重 PCR 性能比较

使用纯化的人基因组 DNA 及血液样品, 对 1kb 以下及 1~10kb 的多数的目的片段, 用各种 PCR 酶进行多重 PCR 性能的比较 (50 μl 反应体系)。结果显示, 只有使用 KME 时, 才能在所有的条件下得到偏差性小的良好的结果。KME 不易受血液成分的抑制作用, 可以得到与用纯化的基因组 DNA 扩增相同的偏差性小的扩增结果。

多重 PCR (短链: 1kb 以下)

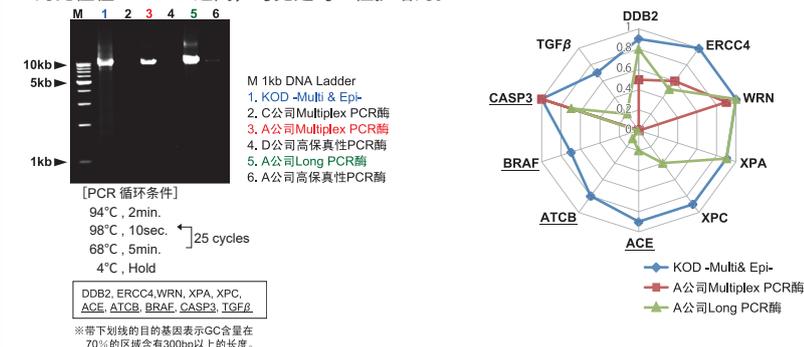


多重 PCR (长链: 1~10kb)



② 使用 NGS 对长链 (10kb) 目的片段的多重扩增时偏差性的验证

使用 6 种 PCR 试剂对 10 种 10kb 的目的片段 (其中 5 种目的片段的 GC 含量在 70% 的区域含有 300bp 以上的长度) 进行扩增, 把确认能扩增的试剂的 PCR 产物纯化后用 Covaris 片段化, 使用 Truseq nano LT kit 制备文库, 使用 Miseq (illumina 公司) 进行测序分析。以读取数最多的目的基因为基准 (1.0), 将各个读取数的比值作成图。电泳结果显示, 虽然用 B 公司试剂的 3、5 泳道也得到了良好的扩增, 但是 NGS 分析的结果中, 产生了扩增偏差。另一方面, KOD -Multi & Epi-® 在 10 种目的基因中的读取数的比值在 0.6~1.0 之间, 可见是均一性扩增的。



(2) 多重 PCR 反应条件

反应液组成	
灭菌蒸馏水	X μl
2 × PCR Buffer for KOD -Multi & Epi-®	25 μl
10 pmoles / μl Primer F	1.5 μl
10 pmoles / μl Primer R	1.5 μl
Genomic DNA	~200 ng
Plasmid DNA	~50 ng
cDNA	~200 ng (RNA 相当)
粗样品	~5 μl
KOD -Multi & Epi-® (1.0U/μl)	1 μl
Total Volume	50 μl

Cycle (1)

< 2 步法循环 >

[引物的 Tm 值超过 65°C 时]  
94°C, 2min.  
98°C, 10sec.  
68°C, 15~60sec./kb

25 cycles

Cycle (2)

< 3 步法循环 >

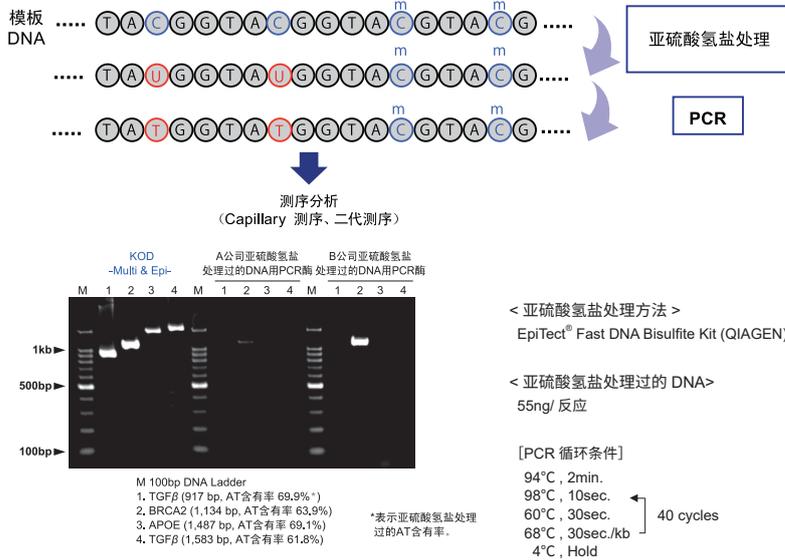
[引物的 Tm 值在 65°C 以下时]  
94°C, 2min.  
98°C, 10sec.  
Tm°C, 30sec.  
68°C, 15~60sec./kb

25 cycles

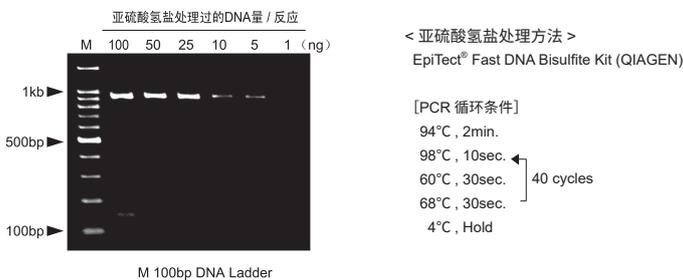
### 3 亚硫酸氢盐处理过的 DNA 扩增效率的比较

未被甲基化的胞嘧啶 (C) 通过亚硫酸氢盐处理转变为尿嘧啶 (U)，PCR 反应后通过测序分析可以与甲基化的 C 区分开。通过这种处理，目的基因的序列中 AT 得到富集，而且被片段化，所以通常亚硫酸氢盐处理过的 DNA 扩增起来比较困难。

以亚硫酸氢盐处理过的 Jurkat 细胞来源的甲基化 DNA 为模板，用各种 DNA 聚合酶对 900~1500bp 的片段进行扩增比较。结果显示，1.5kb 以内的目的片段用 KOD -Multi & Epi-® 基本上都能得到良好的扩增结果。然后，进一步对 1583bp 的扩增产物用 TA 克隆试剂盒 (Target Clone -Plus-) 克隆之后，进行测序分析，可以确认用亚硫酸氢盐处理过的目的片段也得到了扩增 (具体请参考使用说明书)。

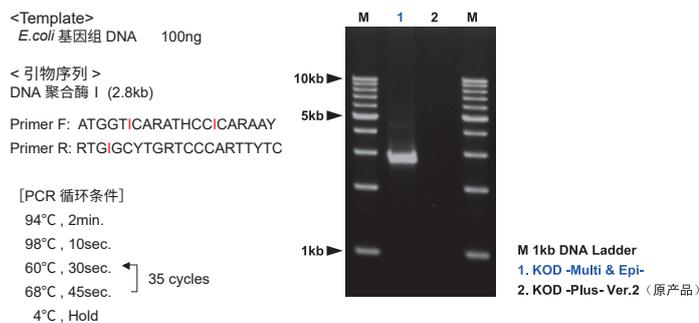


另外，对 TGFβ(917bp) 进行模板量的探讨。结果显示，可以检测到最低 5ng 的量。通过亚硫酸氢盐处理，虽然 DNA 已被片段化，但使用 KOD -Multi & Epi-®, 仍可以高灵敏度地检测到约 1kb 的目的片段。



### 4 可用于含次黄苷酸 (I) 的引物

根据 *E. coli* 的 DNA 聚合酶 I 的氨基酸序列设计含次黄苷酸 (I) 的兼并引物，用 KOD -Multi & Epi-® 和 KOD -Plus- Ver.2 (原产品) 进行扩增。结果显示，用原来的 KOD DNA 聚合酶等高保真性 PCR 酶不能用含有次黄苷酸 (I) 的兼并引物进行扩增，而使用 KOD -Multi & Epi-® 则可以得到良好的结果。同样也适用于含尿嘧啶 (U) 的引物。



(3) 使用亚硫酸氢盐处理过的 DNA 的 PCR 反应条件

反应液组成	X μl
灭菌蒸馏水	
2 × PCR Buffer for KOD -Multi & Epi-®	25 μl
10pmoles / μl Primer F	1.5 μl
10pmoles / μl Primer R	1.5 μl
亚硫酸氢盐处理过的 DNA	~200ng
KOD -Multi & Epi-® (1.0U/μl)	1 μl
Total Volume	50 μl

Cycle

< 3 步法循环 >

94°C, 2min.

98°C, 10sec.

Tm°C, 30sec.

68°C, 15~30sec./kb

40 cycles

在本公司同类产品中, 性价比 NO.1。扩增效率、延伸性均很出色的高性能 Taq。

高性能 Taq DNA polymerase

## Blend Taq / Blend Taq -Plus-

Blend Taq

Code: BTQ-101 250U × 1支 <200次份> ¥300

※50 μl 反应体系的使用次数

Blend Taq -Plus- (Hot Start)

Code: BTQ-201 250U × 1支 <200次份> ¥500

本酶是在 Barnes 法 (→ 2-5 页) 的基础上开发的高性能 Taq DNA polymerase。通过将 rTaq DNA Polymerase 与具有校正活性的 DNA polymerase 按照最合适的比例进行混合, 扩增效率与延伸性等 PCR 性能得到了显著提高。



### → 特征

#### ① 出色的 PCR 扩增效率

和普通的 Taq DNA polymerase 相比, 本酶在 PCR 的扩增效率及延伸性方面有更好的表现。

#### ② 可用于 TA 克隆

经本酶反应后的 PCR 产物可直接进行 TA 克隆。保真性为 Taq DNA polymerase 的约 3 倍。

#### ③ 简单的条件设定

以 Taq DNA Polymerase 为基础, 用一般的 Taq 循环条件即可进行 PCR。

#### ④ 通过热启动反应提高了 PCR 效率 [Blend Taq -Plus-]

Blend Taq -Plus- 采用热启动, 更提高了 PCR 反应的灵敏度和特异性。

### → 用途: PCR

### → 说明

本酶与普通 Taq DNA polymerase 相比, PCR 效率有了非常显著的提升。由于 Blend Taq -Plus- 又在酶溶液中预混了抗 Taq 单克隆抗体, 采用热启动法, 更提高了 PCR 反应的灵敏度和特异性。

### → 原理

有关热启动法和 Barnes 等的方法请见 (→ 2-5 页)。

### 产品内容:

#### <Blend Taq: BTQ-101>

Blend Taq(2.5U/μl) 100 μl  
10 × Buffer\* 1ml  
2mM dNTPs 1ml

#### <Blend Taq -Plus-: BTQ-201>

Blend Taq -Plus-(2.5U/μl) 100 μl  
10 × Buffer\* 1ml  
2mM dNTPs 1ml

\* 含终浓度 2.0mM 的 Mg<sup>2+</sup>(Blend Taq, Blend Taq -Plus- 通用)

### 组成:

20mM Tris-HCl(pH8.0)  
100mM KCl  
0.1mM EDTA  
1mM DTT  
0.5% Tween® 20  
0.5% Nonidet® P-40  
50% Glycerol

### 活性的定义:

在 75°C 活性测定条件下, 在 30 分钟内摄入 10nmoles 的全核苷酸使成为酸性不溶物时所需酶的活性定义为 1U。

### 保存条件:

-20°C

### 参考文献:

1) W.M.Barnes, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **91**:2216-2220(1994)

### 商品使用文献:

1) E.Higashi et al., *Drug Metab Dispos*, **35**(10):1935-1941.(2007)  
2) I.Ogiwara et al., *J.Neurosci.*, **27**(22):5903-5914.(2007)  
3) I.Nishimura et al., *Endocrinology*, **149**(2):774-782.(2008)

### 网络版追加信息:

• 简要备注  
• 实验例  
• 基本反应条件

### → 相关产品

#### ① 高效率 TA 克隆试剂盒

Target Clone	TAK-101	10 次份	¥300	→ 4-6 页
<b>② 使用 ReverTra Ace 的 cDNA 合成试剂盒</b>				
ReverTra Ace -α <sup>®</sup>	FSK-101	100 次份	¥1,950	→ 3-12 页
<b>③ 高效率逆转录酶</b>				
ReverTra Ace <sup>®</sup>	TRT-101	10,000U	¥800	→ 3-14 页
<b>④ 高效率 DNA 片段抽提试剂盒</b>				
MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	NPK-601	200 次份	¥1,200	→ 5-10 页

在本公司同类产品中合成速度 No.1。扩增效率、延伸性优良的 PCR 酶。

高效率 PCR 酶

# KOD Dash

Code: LDP-101 250U × 1支 <100~200次 > ¥350  
 ※50 μl 反应体系的使用次数

本酶是在 Barnes 法(→ 2-5 页)的基础上开发的高效率 PCR 酶。本酶通过将具有强力 3' → 5' 核酸外切酶活性(校正活性)的 KOD DNA Polymerase, 与利用基因工程手段使 3' → 5' 核酸外切酶活性失活的改良型 KOD DNA Polymerase 按照最合适的比例进行混合, 实现了绝佳的反应效率和延伸性等 PCR 性能。

## → 特征

### 1 延伸时间 30sec./1kb

延伸时间可以设定为 Taq DNA polymerase 的一半, 最适合于快速 PCR。

### 2 优良的 PCR 反应效率

用微量的模板也可进行高效率的 PCR 反应, 故除用于通常的 PCR 反应外, 还可用于直接法 PCR 以及病毒 / 细菌的检测。

### 3 优良的耐热性

由于耐热性比 Taq DNA polymerase 要好, 在热变性步骤温度可以设定为很高, 对 GC-rich 等高级结构的目的片段很有效。

### 4 可用于 TA 克隆

扩增产物可直接用于 TA 克隆, 保真性约为 Taq DNA polymerase 的 3 倍。

## → 用途: PCR

## → 说明

KOD Dash 是由 KOD DNA 多聚酶的单一酶种「KOD DNA polymerase 和 Exo(-) KOD DNA polymerase」组成的, 在最佳反应条件、保存条件、稳定性及热稳定性方面均非常具有同一性, 从而可以发挥更加稳定的性能和效果。

## → 原理

有关热启动法和 Barnes 等的方法请见(→ 2-5 页)。

### 产品内容:

KOD Dash(2.5U/μl)	100 μl
10 × Buffer*	1.2ml
2mM dNTPs	1ml
*含终浓度 1.2mM 的 Mg <sup>2+</sup>	

### 组成:

50mM	Tris-HCl(pH8.0)
0.1mM	EDTA
50mM	KCl
1mM	DTT
0.1%	Tween® 20
0.1%	Nonidet® P-40
50%	Glycerol

### 活性的定义:

在 75°C 活性测定条件下, 在 30 分钟内摄入 10nmoles 的全核苷酸使成为酸性不溶物时所需酶的活性定义为 1U。

### 来源:

*E. coli* 重组体

### 保存条件:

-20°C

### 参考文献:

- 1) M.Morikawa et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 4559-4566(1994)
- 2) M.Takagi et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4504-4510(1997)
- 3) M.Nishioka et al., *J. Biotechnology.*, **88**: 141-149(2001)
- 4) W.M.Barnes., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 2216-2220(1994)
- 5) H.Kanzaki, *J. Bone and Mineral Res.* **17**: 210-220(2002)
- 6) H.Nakayashiki et al., *Genetics*, **153**: 693-703(1999)
- 7) A.Kikuchi et al., *Gene*, **236**: 293-301(1999)

### 商品使用文献:

- 1) H.Sawai et al., *Chem. Commun.*, 2604-2605.(2001)
- 2) Y.Ogawara et al., *J. Bio. Chem.*, **277**(24):21843-21850.(2002)
- 3) T.Ohbayashi et al., *Org. Biomol. Chem.*, **3**:2463-2468.(2005)

### 网络版追加信息:

- 简要备注
- 实验例
- 基本反应条件

## → 相关产品

### 1 高效率 TA 克隆试剂盒

TARget Clone	TAK-101	10 次份	¥300	→ 4-6 页
--------------	---------	-------	------	---------

采用热启动的 Taq Master Mix。由于添加了染料，反应液可直接用于电泳检测。

采用热启动·添加染料的 Taq Master Mix

## Quick Taq<sup>®</sup> HS DyeMix

Code: DTM-101 100次份 ¥375

Quick Taq<sup>®</sup> HS DyeMix 为预混了 Taq DNA polymerase 的 2× Master Mix (采用热启动、添加了电泳染料)。



### → 特征

#### ① 2×Master Mix (添加染料)

本品为 2× Master Mix，只需加入模板和引物，即可方便地使用。由于预混了染料 (BPB)，PCR 后可直接用于电泳上样。

#### ② 优良的 PCR 性能

通过对 Buffer 组分的最优化，与 Taq DNA polymerase 相比，PCR 性能有了大幅度的提高。

#### ③ 采用热启动 PCR

采用使用抗 Taq DNA polymerase 抗体的热启动法，显示了高灵敏度和高特异性。

#### ④ 保存稳定性高

经验证，反复冻融 30 次、4°C 状态下保存 3 个月对品质没有影响。

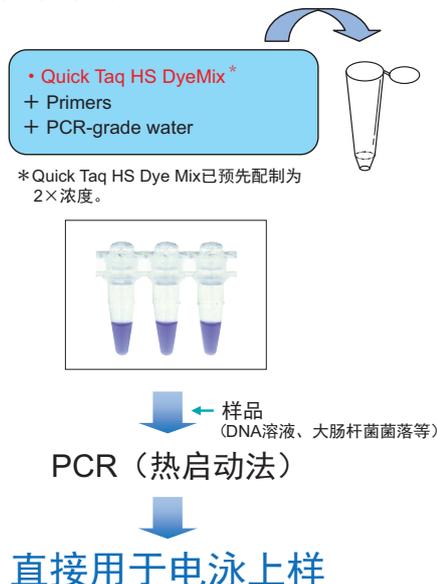
#### ⑤ 高性价比

价格低，可轻松地进行高效率的 PCR。

### → 用途: PCR

### → 说明

本品为预混了 DNA polymerase (Taq DNA Polymerase)、PCR 用反应 Buffer、dNTP Mixture 的 2× 预混 PCR 试剂。只要将其分装到离心管中，加入模板 DNA 和引物，即可进行 PCR。由于添加了电泳染料 (BPB)，反应溶液可直接用于电泳分析。此外，通过在 Master Mix 中预混抗 Taq 抗体，通过热启动法，大幅提高了特异性，可进行高效率的扩增。



### 产品内容:

Quick Taq<sup>®</sup> HS DyeMix 1.25ml×2支  
※50 μl 反应体系可使用 100 次。

含有以下组分

rTaq DNA Polymerase  
抗 Taq 抗体  
dNTPs  
电泳用染料 (BPB)  
Reaction Buffer

### 保存条件:

-20°C  
※ 短期内 (3 个月以内) 连续使用完时，可 4°C 保存。

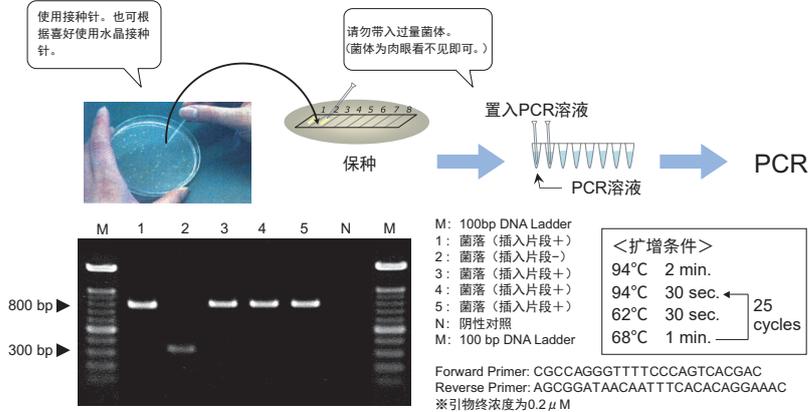
### 参考文献:

- 1) F.C.Lawyer et al., *J.Biol. Chem.*, **264**:6427-6437(1989)
- 2) D.E.Kellogg et al., *Bio Techniques*, **16**:1134(1994)

## → 结果示例

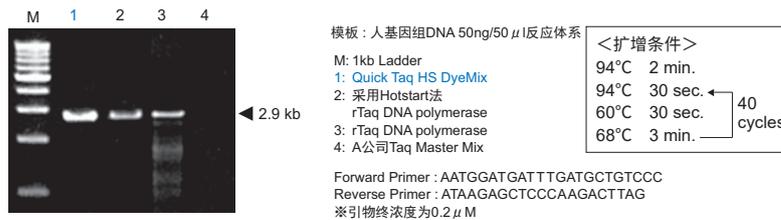
### 1 用菌落直接 PCR 法进行插入确认

以对质粒 pTA2(包含 500bp 的插入片段)进行转化的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  的菌落为样品, 使用在载体上设计的引物进行 PCR。结果可见, 不同大小的目的片段均可获得明亮的条带。本试剂最适用于菌落直接 PCR 法。



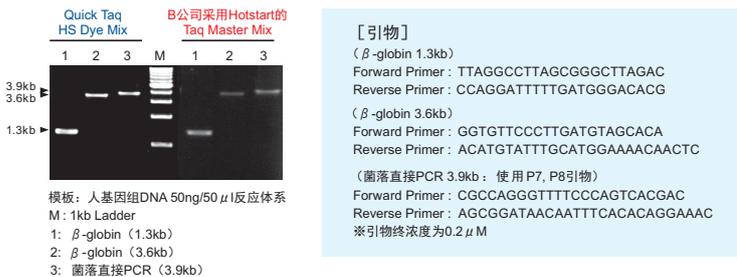
### 2 人 p53 基因(2.9kb)的扩增

以人基因组 DNA(50ng)为模板, 以较难扩增的人 p53 基因(2.9kb)为目的片段进行扩增。结果可见, 使用 Quick Taq<sup>®</sup> HS DyeMix 可得到最高效率和最高特异性。另外, 可知在不采用热启动法的情况下(3、4 泳道), 特异性及灵敏度都很低(Quick Taq HS DyeMix 采用热启动法)。



### 3 各种条件的扩增效率的比较

以人基因组(50ng)及大肠杆菌菌落为模板,  $\beta$ -globin 基因(1.3kb, 3.6kb)及插入质粒(3.9kb)为目的片段的扩增实验例。反应根据各试剂的最适条件设定。结果可见, Quick Taq HS DyeMix 对所有目的片段的扩增均能显示高效率且高特异性的结果。



#### 基本反应条件:

反应液组成	
灭菌蒸馏水	X $\mu$ l
2 $\times$ Quick Taq <sup>®</sup> HS DyeMix	25 $\mu$ l
10pmol/ $\mu$ l Primer F	1.0 $\mu$ l
10pmol/ $\mu$ l Primer R	1.0 $\mu$ l
Genomic DNA(50ng/ $\mu$ l)	~200ng
Plasmid DNA	~50ng
菌落(※参照实验例)	
DW up to 50 $\mu$ l	

#### 2 Step Cycle\*

94°C	2min.	} 25~40 cycles
94°C	30sec.	
68°C	1min./kb	

#### 3 Step Cycle\*

94°C	2min.	} 25~40 cycles
94°C	30sec.	
(Tm-5)°C	30sec.	
68°C	1min./kb	

\*引物的 Tm 值未满 73°C 的情况下, 请尝试用三步法。

## → 相关产品

### 1 高效率 TA 克隆试剂盒

TARget Clone	TAK-101	10 次份	¥300	→ 4-6 页
<b>2 高效率 DNA 片段抽提试剂盒</b>				
MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	NPK-601	200 次份	¥1,200	→ 5-10 页

广泛应用的标准 PCR 酶。

标准 DNA 聚合酶

# rTaq DNA Polymerase

Mg<sup>2+</sup> 另外添附

Code: TAP-201 250U × 1支 <100~200次> ¥ 150

<工业包装请询价>

Mg<sup>2+</sup> 含于溶液

Code: TAP-211 250U × 1支 <100~200次> ¥ 150

※50 μl 反应体系的使用次数

本酶是由 *Thermus aquaticus* YT-1 克隆出的耐热性 DNA polymerase 基因经大肠杆菌表达生成的重组型酶，可广泛应用于各种 PCR 实验。

→ 特征

① 备有两种 PCR 反应用的缓冲液

备有另附 Mg<sup>2+</sup> 和含有 Mg<sup>2+</sup> 的两种缓冲液，可结合实验目的从中进行选择。

→ 用途: PCR

→ 说明

本酶是由克隆出的 Taq DNA Polymerase 基因经大肠杆菌表达生成，与天然产物具有相同的性能。

→ 几点建议

① 热启动 PCR

本酶与抗 Taq DNA polymerase 抗体 [anti-Taq high(→ 2-37 页)] 混合使用，可用于热启动 PCR(→ 2-5 页)。

② PCR 产物的克隆

本酶的 PCR 产物，可以用 TA 克隆法进行克隆。  
可使用高效率 TA 克隆试剂盒 [TArget Clone(→ 4-6 页)]。因本酶不具备 3' → 5' 核酸外切酶活性，所以在 PCR 反应时不如 KOD DNA Polymerase 和 Pfu DNA 多聚酶的保真性高。

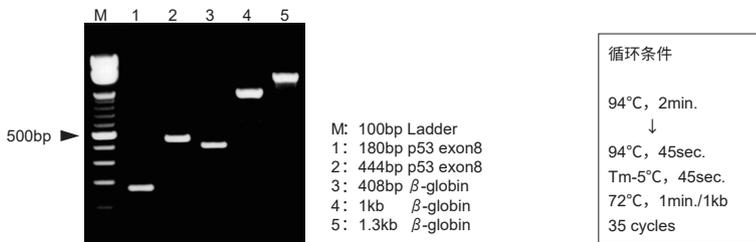
③ PCR 条件的设定

延伸反应对每 1kb 的目标物标准反应时间为 1min。退火温度应设定为比 T<sub>m</sub> 值低 5-10°C。如果无法识别条带，可再降低退火温度。如果出现杂带时可提高退火温度。

→ 结果示例

① 基因组 DNA 的 PCR 反应示例

以 Human 基因组 DNA(50ng) 为模板，在 Primer 20pmoles、酶 1.25U 的条件下，按 50 μl 的反应体系进行扩增。Mg<sup>2+</sup> 和 dNTPs 的终浓度分别为 1.5mM 和 0.2mM，退火温度为 55°C。结果可见，从 180bp 到 1.3kb 的目的片段均可得到高效率的扩增。



→ 相关产品

① 高效率 TA 克隆试剂盒

TArget Clone	TAK-101	10 次份	¥300	→ 4-6 页
--------------	---------	-------	------	---------

② 热启动 PCR 用抗体

anti-Taq high	TCP-101	100 μl × 1 支	¥500	→ 2-37 页
---------------	---------	--------------	------	----------

产品内容:

rTaq DNA Polymerase(5U/μl)  
10 × Buffer  
25mM MgCl<sub>2</sub>(仅适用另附 Mg<sup>2+</sup> 类型)  
2mM dNTPs

组成:

20mM Tris-HCl(pH8.0)  
100mM KCl  
0.1mM EDTA  
1mM DTT  
0.5% Nonidet® P-40  
0.5% Tween® 20  
50% Glycerol

10×Buffer 组成:

<另附 Mg<sup>2+</sup> 类型>  
100mM Tris-HCl(pH8.3)  
500mM KCl

<含 Mg<sup>2+</sup> 类型>  
100mM Tris-HCl(pH8.3)  
500mM KCl  
15mM MgCl<sub>2</sub>

活性的定义:

在 75°C 活性测定条件下，在 30 分钟内摄入 10nmoles 的全核苷酸使成为酸性不溶物时所需酶的活性定义为 1U。

来源:

*E. coli* 重组体

保存条件:

-20°C

参考文献:

- 1) F.C.Lawyer et al., *J. Biol. Chem.*, **264**: 6427-6437(1989)
- 2) T.Nagahama et al., *Stem cells*, **19**: 425-435(2001)

基本反应条件:

<另附 Mg <sup>2+</sup> 类型>	
灭菌蒸馏水	X μl
10 × Buffer	5 μl
25mM MgCl <sub>2</sub>	3 μl(1.5mM)
各引物	5~50pmoles each
2mM dNTPs	5 μl(0.2mM)
Taq(5U/μl)	0.25~0.5 μl(1.25~2.5U)
模板	1~50ng(Plasmid)
	10~1000ng(Genomic DNA)
	~1 μl(逆转录反应液)
Total	50 μl

具有逆转录活性的独特 PCR 多聚酶。

# rTth DNA Polymerase

rTth Code: TTH-301 250U × 1支 <100~200次> ¥350  
 ※50 μl 反应体系的使用次数

本酶是来源于高度嗜热菌 *Thermus thermophilus* HB8 的耐热性 DNA 多聚酶，经大肠杆菌表达生成的重组型酶。

另外，它还具有逆转录活性，该活性在  $Mn^{2+}$  存在的情况下会得到强化。利用该性能，可以用同一酶在同一试管中进行逆转录反应和 PCR 反应。

## → 特征

### ① 高效率

相比 Taq DNA polymerase，对 GC-rich 目的片段及粗样品的扩增效率更出色。

### ② 可用单酶完成 RT-PCR

由于本酶在  $Mn^{2+}$  离子存在条件下显示 RTase 活性，只用本酶即可完成 RT-PCR。且本酶在 60°C 时可进行 RT 反应，因此适用于 GC-rich 目的片段、容易形成高级结构的目的片段的扩增。

## → 用途: PCR、RT-PCR

## → 说明

本酶耐热性比 Taq DNA 多聚酶要高，因此对 GC 含量高的模板的 PCR 也具有较好的效果。

另外，在  $Mn^{2+}$  存在的条件下具有逆转录活性，利用该性能，可以用于 1-step RT-PCR。

## → 几点建议

### ① PCR 产物的克隆

本酶的 PCR 产物，与 Taq DNA 多聚酶反应产物一样，可以通过 TA 克隆法进行克隆。其进行 PCR 反应时的保真性几乎与 Taq DNA 多聚酶相同。可使用高效率 TA 克隆试剂盒 [Target Clone (→ 4-6 页)]。

### ② PCR 条件的设定

基本上与 Taq DNA 多聚酶反应条件相同。如果反应不顺利时，从变性到退火的过程中，以每 1sec. 下降 1°C 的斜率进行设定，情况有可能改善。

### ③ RT-PCR 反应

本酶在有  $Mn^{2+}$  存在的条件下可同时用作逆转录反应和 PCR 反应，但保真性会降低，因此不建议用于 RT-PCR 产物的测序和克隆用途。

## 产品内容:

rTth DNA Polymerase(5U/μl)  
 10 × Buffer  
 Dilution Buffer  
 2mM dNTPs

## 组成:

10mM Tris-HCl(pH7.5)  
 300mM KCl  
 0.1mM EDTA  
 1mM DTT  
 1% Triton® X-100  
 500 μg/ml BSA  
 50% Glycerol

## 10×Buffer 组成:

100mM Tris-HCl(pH8.9)  
 800mM KCl  
 15mM  $MgCl_2$   
 1% Triton® X-100  
 1% 胆酸钠  
 5mg/ml BSA

## Dilution Buffer 组成:

与组成相同

## 活性的定义:

在 75°C 活性测定条件下，在 30 分钟内摄入 10nmoles 的全核苷酸使成为酸性不溶物时所需酶的活性定义为 1U。

## 来源:

<rTth>  
*E. coli* 重组体

## 保存条件:

-20°C

## 参考文献:

- 1) T.W.Myers and D.H.Gelfand, *Biochem.*, **30**: 7661-7666(1991)
- 2) K.Yamada et al., *J.Biochem.(Tokyo)* **130**: 335-340(2001)

## 网络版追加信息:

- 实验例
- 基本反应条件

## → 相关产品

### ① 高效率 TA 克隆试剂盒

Target Clone	TAK-101	10 次份	¥300	→ 4-6 页
<b>② 使用 rTth 多聚酶的一步法 RT-PCR 试剂盒</b>				
RT-PCR Quick Master Mix	PCR-311F	50 次份	¥1,800	→ 2-36 页
<b>③ 高效率 DNA 片段抽提试剂盒</b>				
MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	NPK-601	200 次份	¥1,200	→ 5-10 页

与 Tth 酶相比, PCR 扩增效率·逆转录活性·粗样品检测能力均得到改良!

# Hot Start TTx (DNA) Kit

# Hot Start TTx (RNA) Kit

DNA用: Code: HSTTX-101 250U × 1支 ¥1,000  
 RNA用: Code: HSTTX-111 250U × 1支 ¥1,200

<工业包装请询价>

本品是使用本公司独家的 TTx DNA Polymerase 酶而开发的的 PCR/RT-PCR 试剂, 与同类产品相比具有更高的扩增效率, 还可进行高速 PCR 且可扩增含有 PCR 抑制剂的粗样品。另外, 该酶在  $Mn^{2+}$  存在条件下具有逆转录活性, 因此可使用 1 酶体系进行 RT-qPCR 反应。适用于 TaqMan® 分析等使用探针法的荧光定量 PCR 中。

## → 特征

### ① 卓越的 DNA 扩增效率

以本公司独有的酶 TTx DNA Polymerase 为基础进行了反应组分的优化。TTx DNA Polymerase 比广泛使用的 Taq DNA Polymerase 或 Tth DNA Polymerase 具有更强的延伸性能, 可在短时间的循环条件下进行高效扩增。

### ② 粗样品扩增能力强

在扩增含有 PCR 抑制剂的粗样品(生物样品材料、土壤、食品等)时性能卓越。血液等样品无需提取核酸, 直接向反应液中进行添加, 即可充分扩增。

### ③ 可进行高效率的 1 酶体系 · 1-step RT-PCR [HSTTX-111]

Hot Start TTx DNA Polymerase 具有很高的逆转录活性, 即使微量模板也可高效地进行 RT-PCR。扩增效率高, 短时间的循环条件下也能够高效地扩增。也可用于 DNA 的检测。

### ④ 含有 dUTP [HSTTX-101]

本试剂 2x buffer for rTth/TTx(DNA) 中含有 dUTP。通过添加 Uracil-N-Glycosylase (UNG)\*, 可防止因携带污染产生的假阳性。

\* 本品中不含有 UNG。

## → 用途: qPCR、RT-qPCR

## → 几点建议

### ① PCR 反应体系的设定

建议的引物终浓度范围是 0.2-0.6 $\mu$ M, TaqMan® 探针的添加量请在终浓度 0.05-0.3 $\mu$ M 的范围内调整。扩增效率不理想的情况下, 提高添加量可能会改善。相反, 过量添加可能会引起非特异扩增, 从而导致检出率降低。在高速循环及粗样品的检测中, 扩增率不理想的情况下, 增加酶量(最大 2 倍), 可以得到改善。

### ② PCR 反应条件的设定

退火/延伸的温度建议设定在 55~65°C 的范围。

根据 qPCR 仪的不同, 也可进行高速循环。循环内的变性时间以及退火/延伸时间最短可设为 1 秒, 请根据实际情况确定合适的反应条件。

### ③ RT-PCR 反应 [HSTTX-111]

$Mn(OAc)_2$  的添加量在最终浓度 2.5 mM 的基础上, 根据 RNA 样品的浓度及目的片段的序列进行增减, 可以获得更好的效果。

## 产品内容:

### <HSTTX-101>

Hot Start TTx DNA Polymerase(4U/ $\mu$ l) 62.5 $\mu$ l × 1支  
 2×Buffer for rTth/TTx (DNA)\* 1.25ml × 2支  
 \* 2×Buffer for rTth/TTx (DNA) 中含有 dUTP

### <HSTTX-111>

Hot Start TTx DNA Polymerase(4U/ $\mu$ l) 62.5 $\mu$ l × 1支  
 5×Buffer for rTth/TTx (DNA/RNA) 1ml × 1支  
 2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 1ml × 1支  
 50mM  $Mn(OAc)_2$  250 $\mu$ l × 1支

## 活性的定义:

在 75°C 活性测定条件下, 在 30 分钟内摄入 10nmoles 的全核苷酸使成为酸性不溶物时所需酶的活性定义为 1U。

## 保存条件:

-20°C

## 备注:

LightCycler® 是 Idaho Technology Inc. 的商标。

TaqMan® 是 Roche Molecular Systems Inc. 的注册商标。

## 网络版追加信息:

- 实验例
- 基本反应条件

一步法 RT-PCR 试剂盒。与原来产品相比，检测灵敏度高了约 100 倍。

One Step RT-PCR 试剂盒

## RT-PCR Quick Master Mix

Code: PCR-311F 50次份 ¥ 1,800

本产品为使用 rTth DNA polymerase (→ 2-34 页) 的单酶·一步法 RT-PCR 试剂盒。采用了热启动法，可进行高灵敏度的检测。



### 产品内容:

2 × RT-PCR Quick Master Mix	625 μl × 2
50mM Mn(OAc) <sub>2</sub>	200 μl
Nuclease-free Water	1100 μl

### 保存条件:

-20°C

### 参考文献:

1) T.M.Myers and D.H.Gelfand,  
*Biochem.*, **30**: 7661-7666(1991)

### 基本反应条件:

灭菌蒸馏水	X μl
2 × Master Mix	25 μl
50mM Mn(OAc) <sub>2</sub>	2.5 μl
各引物	10pmoles each
RNA 样品	
Total RNA	<2.5 μg
Poly(A) <sup>+</sup> RNA	<500ng
Total Volume	50 μl

### Cycle

90°C	30sec.	↓
60°C	30min.	
94°C	1min.	↓
94°C	30sec.	
50~70°C	30sec.	← 30~40 cycles
72°C	1min.	
72°C	7min.	↓

※ 退火温度请根据引物的 T<sub>m</sub> 值在 50~70°C 之间进行调整。

## → 特征

### ① 高灵敏度

通过采用使用中和抗体的热启动法、对反应缓冲液进行改良等，与原来产品相比，检测灵敏度提高了约 100 倍，且重复性更佳。

### ② 简便的一步法

以 RNA 为模板，由于逆转录反应和 PCR 在同一离心管内连续进行，适合用于高通量分析。另外，由于反应液是 Master Mix，可更简便地进行实验。

### ③ 适用于容易形成高级结构或高 GC 含量的目的片段

由于逆转录反应在高温下进行，适用于容易形成高级结构的模板 RNA 的反应。而且，由于 Tth DNA polymerase 对高 GC 含量的序列的扩增很有效，因此可进行高效率的扩增。

## → 用途: RT-PCR

## → 说明

由于 Tth DNA polymerase 在 Mn<sup>2+</sup> 存在的条件下表示出 RTase 的活性，因此使用本酶可在同一离心管内连续进行 cDNA 合成反应和 PCR。本试剂盒是广受好评的 1-step RT-PCR 试剂盒「RT-PCR high -Plus-《逆转录一次成功》」的升级版，RT-PCR 的效率有了非常大的提高，因此可用于各种用途。

## → 几点建议

### ① 引物的设计

RT-PCR 用引物的设计方法请参照 2-13 页 的说明

### ② 关于逆转录时引物的设计

PCR 用的 Reverse Primer 可直接作为逆转录反应的引物，无需另外添加。另外，不能使用 oligo dT 和 Random Primer。

### ③ RT-PCR 产物的克隆

由于本试剂盒在 Mn<sup>2+</sup> 存在的条件下能进行 PCR，然而使用 Mn<sup>2+</sup> 与普通的 PCR 相比保真性较低，因此，本产品不适合用于克隆用 PCR。

热启动 PCR 用 Taq DNA polymerase 中和抗体。提高特异性及灵敏度。

# anti-Taq high

Code: TCP-101 100  $\mu$ l  $\times$  1支 ¥500

<工业包装请询价>

本试剂是针对 Taq DNA polymerase 的单克隆抗体，与 Taq DNA polymerase 混合即可简便地进行热启动 PCR (→ 2-5 页)。

## → 特征

### ① 确保抑制 Polymerase 活性

抑制 PCR 反应前常温条件下的 polymerase 活性 45°C 时可达 95% 以上。

### ② 简便

在 PCR 反应前仅需加入到 Taq DNA Polymerase 中，即可实现热启动。也可事先加入到 Taq DNA Polymerase 内，在 -20°C 条件下可确保六个月稳定。

## → 用途：使用 Taq DNA Polymerase 进行热启动 PCR

## → 说明

抗 Taq DNA Polymerase 抑制非特异性反应的原因是在常温下抑制了 Taq DNA Polymerase 的活性。抗体在 PCR 最初的步骤即可失活，对 PCR 反应没有影响。本抗体在 70°C 以上情况下可迅速失活，与化学修饰的热启动法不同，不需要较长的变性步骤，在通常第一循环中的变性步骤下即可完全失活。

## → 原理：有关热启动法的原理，请见 (→ 2-5 页)。

## → 几点建议

### ① 适用于以 Taq DNA 多聚酶为基础的混合型酶体系

本抗体也可用于以 Taq DNA 多聚酶为基础的 Long PCR 酶。此时需要使用酶所添附的反应液。

## → 结果示例

### ① 以 Human 基因组 DNA 为模板的 PCR 示例

以  $\beta$ -globin (3.6kb) 为目的片段，使用 A 公司生产的长片段 PCR 酶，抗体采用 anti-Taq high 以及 B 公司生产的热启动专用抗体。结果显示，仅用 A 公司的酶无法确认到条带，而使用 anti-Taq high 进行热启动 PCR 则可确认到条带。此外，使用 anti-Taq high 比使用 B 公司抗体可获得更好的结果。由此可见，anti-Taq high

对以 Taq DNA polymerase 为基础的 Long PCR 用酶进行热启动的效果要比其他抗体好。



## → 相关产品

### ① 高性能 Taq DNA polymerase

Blend Taq -Plus-	BTQ-201	250U x 1 支	¥500	→ 2-29 页
<b>② rTaq DNA 多聚酶</b>				
rTaq DNA Polymerase	-	-	-	→ 2-33 页

### 产品内容：

Antibody (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)\* 100  $\mu$ l  
10  $\times$  PCR Buffer 1ml

\* 相当于 Taq DNA 多聚酶 500U 的使用量。

### 组成：

10mM Tris-HCl (pH7.0)  
50mM KCl  
50% Glycerol

### 10 $\times$ PCR Buffer 组成：

100mM Tris-HCl (pH8.3)  
500mM KCl  
15mM MgCl<sub>2</sub>

### 保存条件：

-20°C

### 纯度：

通过 PCR 反应，确认未受到 mouse 基因组的污染。

### 参考文献：

- 1) R.T.D'Aquila et al., *Nucl.Acids. Res.*, **19**:3749(1991)
- 2) Q.Chou et al., *Nucl.Acids. Res.*, **20**:1717(1992)
- 3) D.E.Kellogg et al., *Bio.Techniques*, **16**: 1134(1994)

### 基本反应条件：

[ Taq DNA Polymerase 1U ]  
[ anti-Taq high 0.2  $\mu$ l ]

or

[ Taq DNA Polymerase (5U/ $\mu$ l) ]  
[ = 添加等量的 anti-Taq high ]

↓

室温，5min.

※ 混合后可以在 -20°C 长期保存。

用于应对 PCR 反应前的 carryover 污染，降低假阳性率。

# Uracil DNA Glycosylase (UNG), heat-labile

Code: UNG-101 200μl × 1支 ¥1,000  
 <工业包装请询价>

本试剂是热敏型尿嘧啶 DNA 糖基化酶，与 dUTP 配合，用于 PCR 反应中防止 carryover 污染。

## → 特征

### ① 简便

只需简单添加，即可分解含 dUTP 的 PCR 产物，防止了污染。

### ② 高热敏性

不仅可用于 PCR，还可用于 RT-PCR（RT 反应应在 42°C 或更高温度下进行）。

## → 用途: qPCR, RT-qPCR

## → 说明

在 PCR 中，carryover 污染是由于模板中含有非样品来源的 DNA 并且被扩增导致的，其中的重要污染源是之前 PCR 的扩增产物。在这种情况下，常常可以从阴性对照中看到靶基因的扩增。如果进行定量 PCR，可能会出现假阳性，或者放大定量的结果。针对这个问题，可以通过使用预先含 dUTP 的 dNTPs 进行 PCR，然后在进行 PCR 之前用 UNG 酶进行处理来防止 carryover 污染。

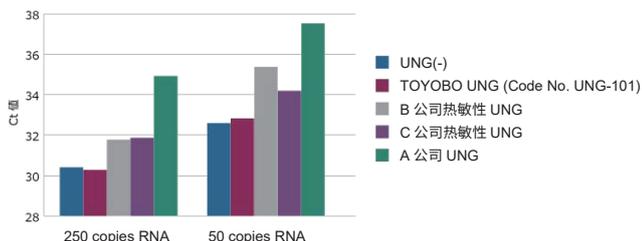
## → 原理

Uracil DNA Glycosylase (UNG) 能够水解断裂脱氧核糖与尿嘧啶碱基之间的 N-糖苷键，形成有缺失碱基的 DNA。该酶能够与单链或双链 DNA 的尿嘧啶反应，但是不与 RNA 发生反应。带有缺失碱基的 DNA 受热可分解，而正常不含有 dUTP 的模板不受影响。因此，只有作为污染源的 PCR 产物才会被降解，而不会影响模板 DNA 的扩增。另外，本酶属于 heat-labile 型酶，50°C，10 分钟可完全且不可逆地失活，不影响后续反应的进行。

## → 结果示例

### ① UNG 处理对 RT-PCR 反应的影响

将 2U 的 UNG 添加到 THUNDERBIRD® Probe One-Step qRT-PCR kit (Code No. QRZ-101) 的 qRT-PCR 反应溶液中，并在 UNG 处理后定量检测肠道病毒 RNA。结果显示，不使用热敏 UNG 时 Ct 值明显延迟，使用该产品时 Ct 值未受影响。



## → 相关产品

### ① 核苷酸

dNTPs Mixture(2 mM each)	NTP-501	1ml × 1 支	-	→ 2-39 页
dUTP(100 mM)	UTP-101	0.5ml × 1 支	-	→ 2-39 页
<b>② 高性能 1-step qRT-PCR Kit</b>				
THUNDERBIRD® Probe One-Step qRT-PCR kit	QRZ-101	100 次份	¥2,400	→ 1-8 页

### 产品内容:

Uracil DNA Glycosylase(1U/μl)\* 200μl  
 \* 也提供不含甘油的产品。

### 组成:

20mM	Tris-HCl(pH7.5)
50mM	NaCl
1mM	DTT
0.1%	Tween® 20
50%	Glycerol

### 活性的定义:

在 25 °C、30 分钟内能够将 1μg 含 dU 的 dsDNA 完全分解所需的酶量定义为 1U。

### 保存条件:

-20°C

### 基本反应条件:

0.4U/20μl 或 1.0U/50μl 25°C，10 分钟。

用于应对 PCR 反应前的 carryover 污染，降低假阳性率。

## 核苷酸

本产品是适于进行 DNA 合成反应、PCR 和测序的核苷酸。经过 HPLC 分析对其纯度进行了确认。

### → 用途

- ① DNA 多聚酶合成反应时所需的核苷酸
- ② PCR 反应、测序、逆转录反应时所需的核苷酸

组成:

溶液

保存条件:

-20°C

### → Deoxyribonucleotides

dNTPs Set	■浓度: 各 100mM	NTP-101	50 $\mu$ moles / 0.5ml $\times$ 4 支	¥ 1,200
	■备注: 本品为 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 溶液各一支			
dNTPs Mixture (2mM)	■浓度: 各 2mM	NTP-201	各 2 $\mu$ moles / 1.0ml $\times$ 1 支	¥ 65
	■备注: 本品为 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 混合液一支			
dNTPs Mixture (10mM)	■浓度: 各 10mM	NTP-301	各 2 $\mu$ moles / 0.2ml $\times$ 1 支	¥ 200
	■备注: 本品为 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 混合液一支			
dNTPs Mixture (2mM)	■浓度: 各 2mM	NTP-501	各 2 $\mu$ moles / 1.0ml $\times$ 1 支	¥ 200
	■备注: 本品为 dATP、dGTP、dCTP、dUTP 混合液一支			

申

## PCR·RT-PCR 酶中添附的专用缓冲液

## PCR·RT-PCR 用缓冲液 申

→ 用途: PCR·逆转录反应

组成:

溶液

保存条件:

-20°C

### → PCR 用反应缓冲液

2 $\times$ PCR Buffer for KOD FX	KFX-1B	1.7ml $\times$ 1 支	¥ 100
2 $\times$ PCR Buffer for KOD FX Neo	KFX-2B	1.7ml $\times$ 1 支	¥ 100
KOD -Plus- 用 25mM MgSO <sub>4</sub>	KOD-2S	1ml $\times$ 1 支	¥ 50
KOD -Plus- Ver.2 用 Buffer	KOD-3B	1ml $\times$ 1 支	¥ 100
KOD -Plus- Neo 用 Buffer	KOD-4B	1ml $\times$ 1 支	¥ 100

## PCR 试剂选择指导

东洋纺使用 3 种耐热性聚合酶生产出了各种各样的 PCR 试剂。  
根据用途不同进行使用分类可有效地推动实验进程。

产品名称	保真性	扩增效率 (得率)	延伸时间	扩增长度	可扩增 粗样品	可扩增 bisulfite 样品	逆转录 活性	可进行 热启动	产物 末端	页面
KOD One® PCR Master Mix	++++ [80倍]	+++++	++++ (1~10sec./kb)	~40kb	++++	✓	-	✓	平滑	2-14
KOD -Plus-	++++ [80倍]	++	+ (1min/kb)	~12kb	+	-	-	✓	平滑	2-20
KOD -Plus- Neo	++++ [80]	+++	+++ (≤0.5min/kb)	~24kb	+	-	-	✓	平滑	2-18
KOD FX	+++ [11]	++++	+ (1min/kb)	~24kb	+++	-	-	✓	平滑	2-24
KOD FX Neo	+++ [11]	+++++	+++ (≤0.5min/kb)	~40kb	++++	-	-	✓	平滑	2-22
KOD -Multi & Epi®	+++ [11]	+++++	+++ (≤0.5min/kb)	~40kb	++++	✓	-	✓	平滑	2-26
KOD Dash®	+ [3]	+++	+++ (≤0.5min/kb)	~18kb	++	-	-	-	平滑·A附加 (混合)	2-30
rTth DNA Polymerase	- [1]	+	+ (1min/kb)	~2kb	+	-	✓ (Mn <sup>2+</sup> )	-	A附加	2-35
Hot Start TTx DNA Polymerase	- [1]	+	++	~2kb	++	-	✓ (Mn <sup>2+</sup> )	✓	带A	2-34
RT-PCR Quick Master Mix	- [1]	+	+ (1min/kb)	~2kb	+	-	-	✓	A附加	2-36
rTaq DNA Polymerase	- [1]	+	+ (1min/kb)	~2kb	+	✓	-	-	A附加	2-33
Quick Taq® HS DyeMix	- [1]	+	+ (1min/kb)	~4kb	+	-	-	✓	A附加	2-31
Blend Taq®	+ [3]	++	+ (1min/kb)	~23kb	++	-	-	-	平滑·A附加 (混合)	2-29
Blend Taq® -Plus-	+ [3]	++	+ (1min/kb)	~23kb	++	-	-	✓	平滑·A附加 (混合)	2-29

【 】：假设 Taq DNA polymerase 的保真性为 1 时的保真性。