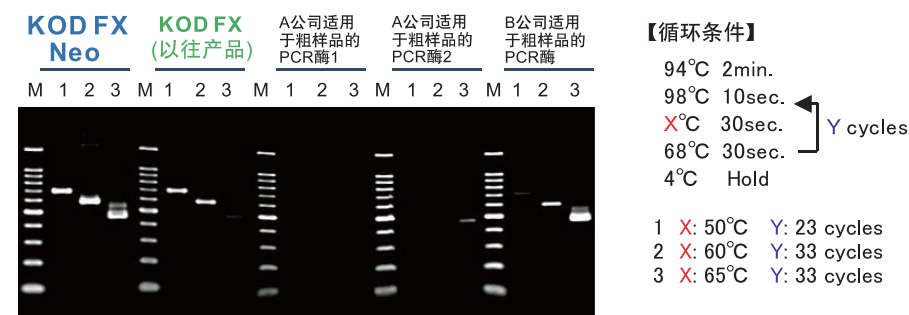


## 应用例 用混合肥料(堆肥)进行亚基因组分析

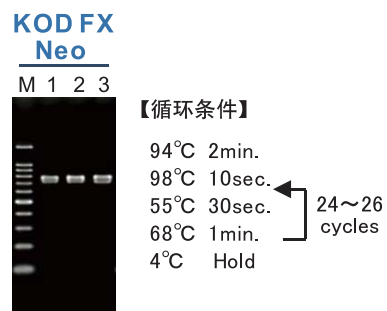
用各种方法从混合肥料(堆肥)中抽提出粗DNA溶液,以该DNA溶液处理后的上清为样品,用原核生物共同的引物进行rDNA扩增。结果可见,用碱裂解法和一步法配制的样品,与常见的CTAB法得到的样品,可得到同等的扩增效果(右图)。继续探讨,由于KOD FX Neo的PCR产物末端已被平滑化,用专用的TA克隆试剂「TARget Clone -Plus-」克隆后再进行测序分析。结果可见,96个克隆均得到了良好的测序结果。同时从分析的结果可知,用各种粗抽提法得到的序列也同样的有好的结果。(碱裂解法、一步法等虽然非常简便,但初次使用时,为避免被污染的风险,建议事先与以往的方法进行比较后再开始实验)。

此外,使用碱裂解法得到的上清、各种扩增试剂、3种通用引物进行rDNA扩增,结果可见,用KOD FX Neo可得到最好的结果(下图)。



M:100bp DNA Ladder  
1: 原核生物由来rDNA(700bp)  
2: *Bacillus* sp. 由来rDNA(600bp)  
3: High GC革兰氏阳性菌由来rDNA(550bp)

【引物】  
1 Fwd ATTAGATACCTDGTAGTCC  
Rev TACCTTGTACGACTT  
2 Fwd AGGGTCATTGGAACTGGG  
Rev CGTGTGTAGCCAGGTGATA  
3 Fwd GGCCTTCGGGTTGTAAACC  
Rev CTTTGAGTTTTAGCCTTGC



M:100bp DNA Ladder  
1: 碱裂解法[24cycles]  
2: 一步法[24cycles]  
3: CTAB法(以往的方法)[26cycles]

【引物】  
Fwd: GTTTGATCCTGGCTCA  
Rev: TACCAGGGTATCTAATCC



【碱裂解法】	【一步法】	【CTAB法】
土壤 100 mg ↓ ←50 mM NaOH 180 μl ↓ Vortex 充分振荡 ↓ 95°C, 10 min. 孵育 ↓ ←1 M Tris-HCl (pH8.0) 20 μl ↓ Vortex 充分振荡 ↓ 离心12,000 rpm, 5 min. 上清 ↓ 灭菌水10倍稀释后,取1 μl 添加到50 μl的PCR反应液中。	土壤 100 mg ↓ ←Buffer A* 100 μl ↓ Vortex 充分振荡 ↓ 95°C, 10 min. 孵育 ↓ 离心12,000 rpm, 5 min. 上清 ↓ 灭菌水10倍稀释后,取1 μl 添加到50 μl的PCR反应液中。  *Buffer A: 100mM Tris-HCl (pH9.5) 1M KCl 10mM EDTA	参照以下论文的实验例操作 J Zhou et al., DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 62:316-322 (1996)

品名	包装*	保存温度	Code No.	目录价
高效率·高成功率PCR酶 KOD FX Neo	200U×1支 [200次用]	-20°C	KFX-201	¥2,400
	(200U×1支)×5 [1000次用]	-20°C	KFX-201B	¥11,040
	20U×1支 [20次用]	-20°C	KFX-201S	试用价¥200 数量有限

\*50μl反应体系的使用次数

品名	包装	保存温度	Code No.	目录价
高效率TA克隆试剂盒(KOD用) TARget Clone -Plus-	10次份	-20°C	TAK-201	¥380

由于用KOD FX Neo扩增的DNA片段末端已被平滑化,因此需对末端进行限制性内切酶处理,或采用平滑末端克隆法等进行克隆。KOD系列专用的TA克隆试剂盒「TARget Clone -Plus-(Code No.TAK-201)」通过在扩增产物上加A,可直接进行TA克隆。

代理商信息

东洋纺(上海)生物科技有限公司  
上海市浦东新区张杨路188号汤臣商务中心310室 邮编: 200122  
TOYOBO (Shanghai) Biotech Co.,Ltd.  
Room 310, TOMSON Business Center,  
No.188,Zhangyang Rd.Shanghai, 200122  
TEL:021-58794900 FAX:021-58794901



TSB-023/2011/03

## 被PCR困扰的您,还在犹豫吗?

高效率·高成功率PCR酶

# KOD FX Neo



● 延伸性UP  
● 对粗样品的扩增性能UP!

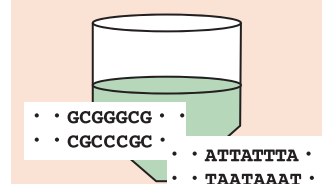
# 史上最牛的PCR酶诞生了!!

有20次份的小包装  
详询代理商

延伸时间缩短到30sec./kb!  
(粗样品推荐60sec./kb)

### 1 难扩增片段

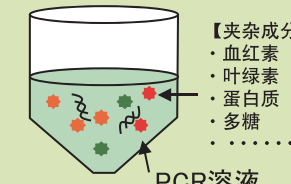
高GC/AT目的片段 长目的片段 (~40kb)



KOD FX系列产品中含有不容易受GC含量影响的成分。因此,对高GC含量片段、及相反的高AT含量片段的扩增均可发挥很好的效果。另外,由于适用于长片段PCR,也可用于长片段难扩增序列的克隆。  
在新品KOD FX Neo中,由于添加了延伸增强剂,更增强了其性能。

### 2 粗样品裂解液的扩增

小鼠尾巴 植物 土壤 昆虫 福尔马林固定组织

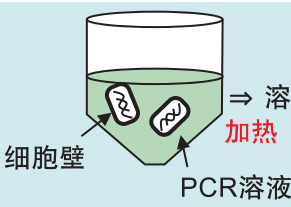
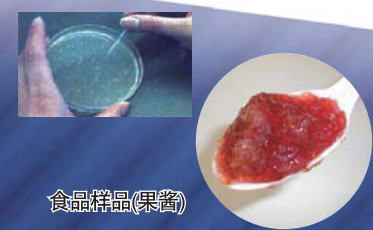


【夹杂成分】  
· 血红素  
· 叶绿素  
· 蛋白质  
· 多糖  
· .....

活体来源的血红素、叶绿素、蛋白质、多糖等物质会抑制PCR。KOD FX系列产品中由于添加了抑制这些物质的成分,因此将小鼠尾巴、植物纤维等简单处理一下,就可用其裂解液进行高效率PCR。特别是对转基因小鼠、植物等的基因分型非常有用。  
在新品KOD FX Neo中,由于添加了延伸剂,更适用于粗样品扩增。

### 3 微生物·活体成分等的直接PCR

酵母 霉菌 真菌 植物 食品 浮游生物 血液 哺乳类培养细胞



一般情况下,大肠杆菌等革兰氏阳性菌的直接PCR经常要进行质粒的插入确认,以酵母、霉菌等为样品时,由于细胞壁的存在,通常要进行酶处理。KOD FX系列产品中,由于buffer中使用了专利技术,可在热循环中使细胞壁溶解,以多种微生物为样品直接进行PCR。  
另外,血液、哺乳类培养细胞等也可直接扩增。

通过添加延伸增强剂,提高了对长链目的片段、粗样品的扩增效率。

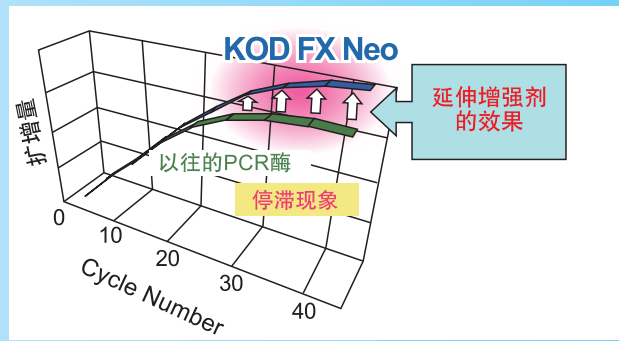


# KOD FX Neo是什么样的酶?



<试剂组成>  
KOD FX Neo (200U)\*  
2xPCR Buffer for KOD FX Neo  
2mM dNTP  
\*含有热启动抗体。

KOD DNA polymerase\*具有优良的延伸性和较强的对抗粗样品阻碍成分的特征。「KOD FX」是利用该酶特性而开发的高成功率PCR酶,在难扩增序列、粗样品的扩增方面受到了广泛的好评。此外, KOD FX采用了在高温下破坏细胞壁成份的特殊buffer,可对革兰氏阳性菌、酵母、霉菌等直接PCR。但是,以往的PCR酶在20~30循环以后,容易出现扩增无法持续的<停滞现象>,无法完全发挥PCR的机能。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。

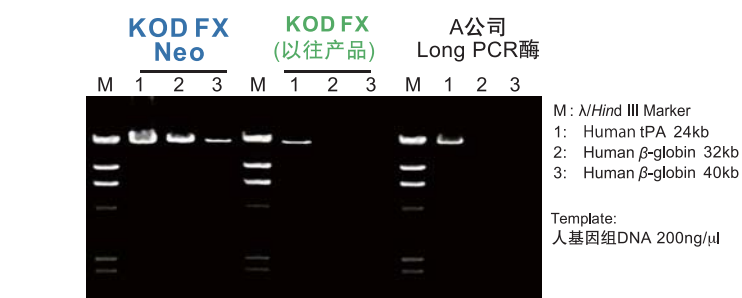


\*M. Takagi et al., Appl. Environ. Microbiol., 63: 4504-4510 (1997)

## 特征 1 优良的延伸性

### 实验例1:人基因组DNA扩增长度的比较

可扩增过去难以扩增的40kb基因。同时,与过去的产品相比,只需要约一半的时间即可完成扩增。

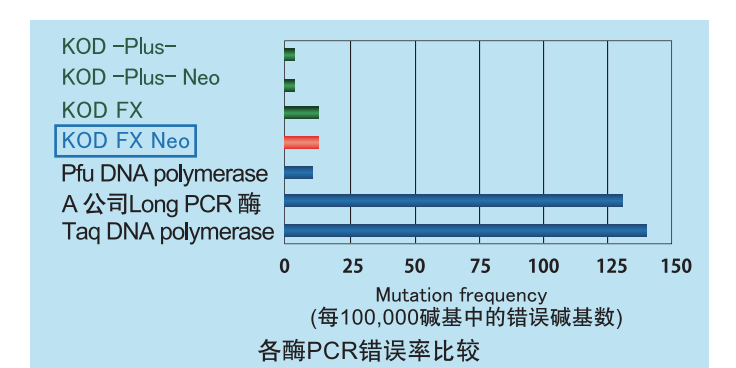
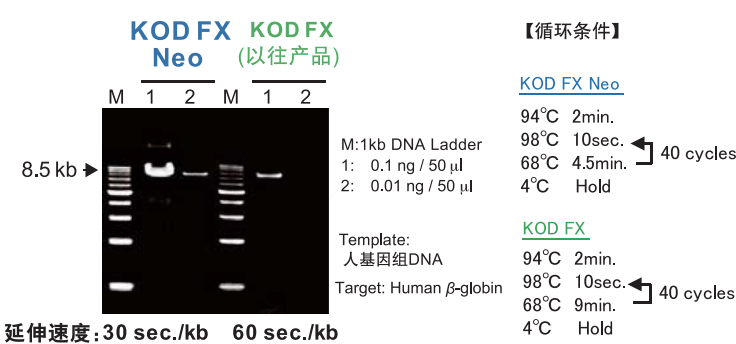


延伸速度: 30 sec./kb	60 sec./kb	$\leq$ 30 sec./kb
<b>KOD FX Neo</b>	<b>KOD FX (以往产品)</b>	<b>A公司 Long PCR酶</b>
94°C 2min. 98°C 10sec. 74°C 30sec./kb 98°C 10sec. 72°C 30sec./kb 98°C 10sec. 70°C 30sec./kb 98°C 10sec. 68°C 30sec./kb 68°C 7min. 4°C Hold	94°C 2min. 98°C 10sec. 74°C 60sec./kb 98°C 10sec. 72°C 60sec./kb 98°C 10sec. 70°C 60sec./kb 98°C 10sec. 68°C 60sec./kb 68°C 7min. 4°C Hold	94°C 2min. 98°C 10sec. 74°C 30sec./kb 98°C 10sec. 72°C 30sec./kb 98°C 10sec. 70°C 30sec./kb 98°C 10sec. 68°C 30sec./kb 68°C 7min. 4°C Hold

延伸速度可达30sec./kb, 长链目的片段扩增更加便利。

### 实验例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。



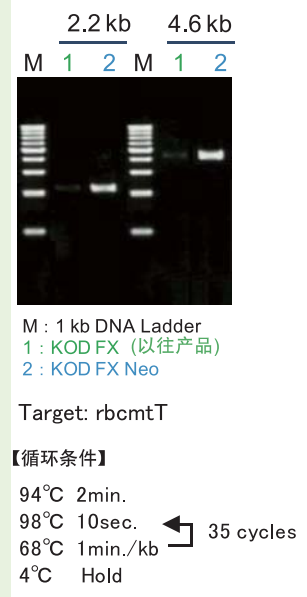
## 特征 2 出色的粗样品扩增能力

### 实验例3:植物裂解液的扩增

**前处理法(一步法)**

1. 叶(3mm角) 精米(1粒)
2. 置入离心管
3. Buffer 100 $\mu$ l添加 Vortex充分振荡  
Buffer A: 100mM Tris-HCl (pH9.5), 1M KCl, 10mM EDTA
4. 95°C, 10 min. Vortex充分振荡
5. 取1 $\mu$ l上清进行PCR反应 (植物组织不会也无需完全溶解) 左: 叶 右: 精米

参考文献: BioTechniques, 19: 394 (1995)



### 实验例4:植物叶片直接PCR

烟草叶(约2mm小块)

直接 PCR 电泳分析

M: 1kb DNA Ladder  
1: rbcL 1.3 kb  
2: rbcmt 2.2 kb  
3: rbcmtT 4.6 kb

【循环条件】  
94°C 2min.  
98°C 10sec.  
68°C 1min./kb  
4°C Hold

以烟草叶为样品直接进行PCR。结果可见,只有用KOD FX和KOD FX Neo的情况下,才能获得良好的扩增,且用KOD FX Neo的效果更好。

## 实验例5:小鼠尾巴裂解液的扩增比较

以用碱裂解法配制的小鼠尾巴裂解液为样品,对3种小鼠基因进行扩增。结果可见,用KOD FX和KOD FX Neo均可对所有目的片段进行良好的扩增。同时,用KOD FX Neo的情况下扩增效率更好。

**【用96孔PCR板进行小鼠尾巴处理的方法(碱裂解法)】**

把小鼠尾巴(约3 mm)放入96孔板  
↓  
←加入50 mM NaOH 180 $\mu$ l, 盖上盖子, Vortex充分振荡  
↓Spin down (轻轻振荡使液体落下即可)  
↓95°C, 10 min. 孵育 (用PCR仪)  
↓←1 M Tris-HCl (pH 8.0) 加入20 $\mu$ l, 盖上盖子, Vortex充分振荡  
↓Spin down (轻轻振荡使液体落下即可)  
↓上清(模板) ⇒ 取0.5-2 $\mu$ l添加到50 $\mu$ l的PCR反应液中

※小鼠尾巴切片时,请浸入碱溶液中再切。  
※接触热碱性溶液时,请十分注意。  
※处理后,小鼠尾巴不会也无需完全溶解。小鼠尾巴表面溶解即可。  
※本方法可用1.5ml离心管

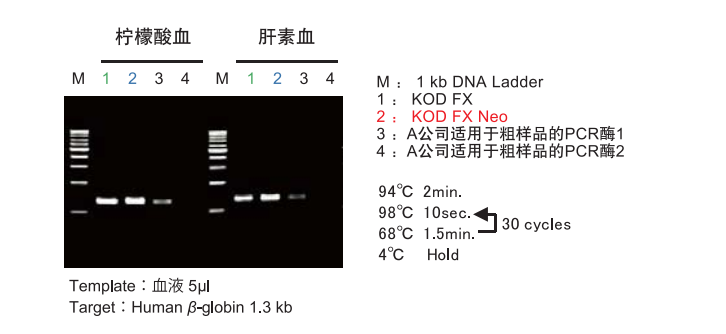
M 1 2 3 M 1 2 3 M 1 2 3 M 1 2 3

【循环条件】  
94°C 2min.  
98°C 10sec..  
68°C 1min./kb  
4°C Hold

Sample:小鼠尾巴裂解液(碱裂解法) 0.5  $\mu$ l  
M: 100 bp DNA Ladder, 1 kb DNA Ladder  
1: Mouse TATA box binding protein (TBP) 0.5 kb  
2: Mouse transferrin receptor (Tfr) 1.5 kb  
3: Mouse membrane glycoprotein (Thy-1) 2.6 kb

## 实验例6:血液的直接PCR分析

用刚采集的血液直接进行PCR。结果可见,用KOD FX和KOD FX Neo均可获得良好的结果。扩增含肝素的血时,用KOD FX Neo可得到更多的扩增量。



## 添加PCR 阻碍物质实验

### 实验例7:添加果酱(食品)实验

本例作为加工食品的一个例子,往PCR反应液中添加果酱悬浊液,探讨其对PCR的抑制。水果中含有多糖等各种抑制PCR的物质。结果可见, KOD FX Neo可最大程度地对抗抑制物质。

M: 1kb DNA Ladder  
1: 果酱上清 0 $\mu$ l  
2: 果酱上清 2 $\mu$ l  
3: 果酱上清 4 $\mu$ l  
4: 果酱上清 6 $\mu$ l

【循环条件】  
94°C 2min.  
98°C 10sec.  
60°C 30sec.  
68°C 1.5min.  
4°C Hold

添加PCR阻碍物质  
草莓酱0.3g中添加100ml的TE beffer, 离心后取上清添加

Template: 10ng人基因组DNA  
Target: Human  $\beta$ -globin 1.3kb

### 实验例8:添加腐殖酸实验

腐殖酸(humic acid)是植物等成分受腐植土/土壤中的微生物的作用形成的可溶于稀碱不溶于稀酸(形成沉淀)的红褐色或黑褐色有机物,会阻碍PCR反应。在本实验中,作为例子,将人基因组DNA与腐殖酸混合,评价其对PCR的阻碍作用。结果可见, KOD FX Neo可最大程度地对抗腐殖酸的阻碍。

M: 1kb DNA Ladder  
1: 腐殖酸添加量 0  $\mu$ l  
2: 腐殖酸添加量 2  $\mu$ l  
3: 腐殖酸添加量 4  $\mu$ l

【循环条件】  
94°C 2min.  
98°C 10sec.  
68°C 4min.  
4°C Hold

Template: 10ng人基因组DNA  
Target: Human  $\beta$ -globin 3.6kb

\*腐殖酸: OD280=1的溶液