TOYOBO
Beyond Horizons

TOYOBO LIFE SCIENCE

2021/2022

荧光定量PCR

PCR/RT-PCR

逆转录

基因重组克隆

核酸/蛋白质
抽提・纯化

综合

Appendix

Price List

Index

PCR就选东洋纺

本产品目录的使用说明

本目录分6个章节，分类介绍了2021—2022年度本公司生产并在中国市场销售的生命科学相关试剂、试剂盒及一些器材等信息。

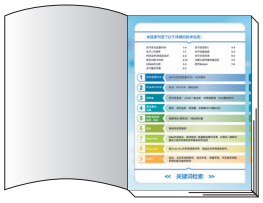
此外，第7—9章刊载了附录、价格表、索引等信息，便于快速、准确地查阅相关产品信息，为广大用户提供一定的实验帮助。

1、产品内容的检索方法

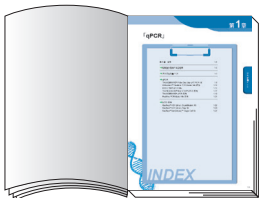
(1) 按目录信息检索



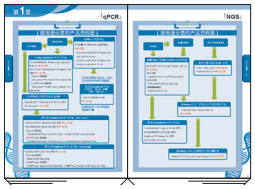
种类检索
(可根据封面的标题检索)



关键词检索
(翻开封面可看到各章的关键词)



目录检索
(每章的第一页都有详细目录和分类)



用途检索
(每章次页有「按用途分类的产品流程图」)

(2) 按Code No.或品名检索

第8章「Price List」分两部分，将本产品目录所刊载的所有产品分别按Code No.和品名的首个字母的英文顺序排列，数字排在最前面。

(3) 按名词术语检索

第9章「Index」将本产品目录所涉及的产品名（如KOD FX）、名词术语（如10×BSA、T载体等）在分类汇总的同时，按数字、希腊字母、中文首字拼音字母的英文顺序排列，方便进行全面的检索。

2、关于本目录中所标注的价格

本目录中所标注的产品价格均为含税价格，具体各产品的售价请咨询当地代理商。我司有可能在未事先通知用户的情况下调整产品价格，敬请事先谅解。本目录的产品价格自2021年1月1日起启用。

3、关于本目录中的略语

毒：字样特指属于日本《毒物及剧毒物取缔法》中列出的医药用品以外的毒性物品。

剧：字样特指属于日本《毒物及剧毒物取缔法》中列出的医药用品以外的剧毒物品。

危：字样特指属于日本《消防法》中列出的危险物品。

申：字样特指订购时须填写申购表的产品。

ISO 9001 注册

JAB CM016

日本东洋纺的敦贺生物工厂/敦贺生物研究所通过了Lloy's Register Quality Assurance(LRQA)的认定，除日本外，在英国、美国、荷兰、德国、澳大利亚等国都通过了ISO 9001认证。本书所刊登的产品，由日本工厂制造的限制酶（Restriction Endonucleases）都根据ISO品质管理系统来实现管理、运营和维持。

ISO 14001 注册

REGISTERED ORGANIZATION No.E004－ISO 14001

JAB CM002

日本东洋纺的敦贺工厂通过了由日本主管环境管理系统的认定机关（财）日本适应性认定协会（JAB）指定的审查机关日本检查QA协会（JIC Quality Assurance Ltd）的认证，由此成功注册了ISO 14001认证，日本东洋纺敦贺生物事业部门致力于工厂环境管理系统的活动，其所制造的生物相关的产品都是在获得ISO 14001认证的工厂/研究所中开发制造的。

本目录刊登了以下详细的技术信息：

关于荧光定量PCR	1-4	关于突变导入	4-4
关于二代测序	1-7	关于核酸抽提	5-3
PCR及PCR周边技术	2-4	关于抗体检测	6-3
常见问题（PCR）	2-13	主要大肠杆菌的基因型	7-2
cDNA的合成	3-3	遗传Marker	7-4
关于基因克隆	4-3		

1 荧光定量PCR — qPCR(荧光定量PCR)　NGS相关

2 PCR/RT-PCR — PCR　RT-PCR　相关试剂

3 逆转录 — 荧光定量用　cDNA一链合成　培养细胞用　RNA酶抑制剂

4 基因重组 克隆 — 载体　试剂盒类　修饰酶　多聚酶(PCR酶以外)

5 核酸/蛋白质 抽提・纯化 — 核酸纯化(磁珠法)　纯化用仪器

6 综合 — 免疫反应增强液

7 Appendix — DNA片段电泳　遗传密码・氨基酸省略符号表　计算式・换算式
基因工程中常用的培养基和试剂组成

8 Price List — 按Code No.的字母顺序排列　按品名的字母顺序排列

9 Index — 品名、名词术语按数字、英文字母、希腊字母、中文首字拼音字母的英文顺序排列

<< 关键词检索 >>

2021 年～ 2022 年度
中文版产品目录发刊词

感谢大家多年来对东洋纺分子生物学科研试剂的厚爱！

经过半年的准备，「2021 年～ 2022 年度中文版产品目录」终于和大家见面了。

东洋纺（TOYOBO Co., Ltd.）公司 1882 年成立于日本大阪，前身为「大阪纺」。 为处理生产过程中产生的纸浆废液， 公司于 1957 年开始生产饲料用酵母，并以此为契机进入了生物领域；1982 年开始着力于为生命科学研究领域提供各类产品和服务；到今天，东洋纺（TOYOBO）已是日本市场最主要的生物品牌之一 ，尤其是代表性的高保真 PCR 酶， 受到了许许多多用户的好评。

生命科学研究对于医疗、制药、食品以及环境 • 能源等领域有着非凡的意义， 生命科学可以说是当今世界最受期待和瞩目的领域之一。

东洋纺（上海）生物科技有限公司成立于 2003 年 6 月 16 日。承蒙广大用户的厚爱，自进入中国市场以来，我们的事业得到了飞速的发展。在此，我们向广大用户致以诚挚的谢意。

今后， TOYOBO 仍会一如既往地为中国市场提供优质的产品和优良的服务，如果您有任何问题，请拨打 021-5879 4900。谢谢！

TOYOBO Life Science,Feel the Future!

东洋纺（上海）生物科技有限公司
2020 年 12 月于中国 • 上海



▲1950 年代的工厂



▲当时的酵母发酵池



▲敦贺生物研究所



▲敦贺生物工厂

TOYOBO 的
生物制剂研究所和工厂

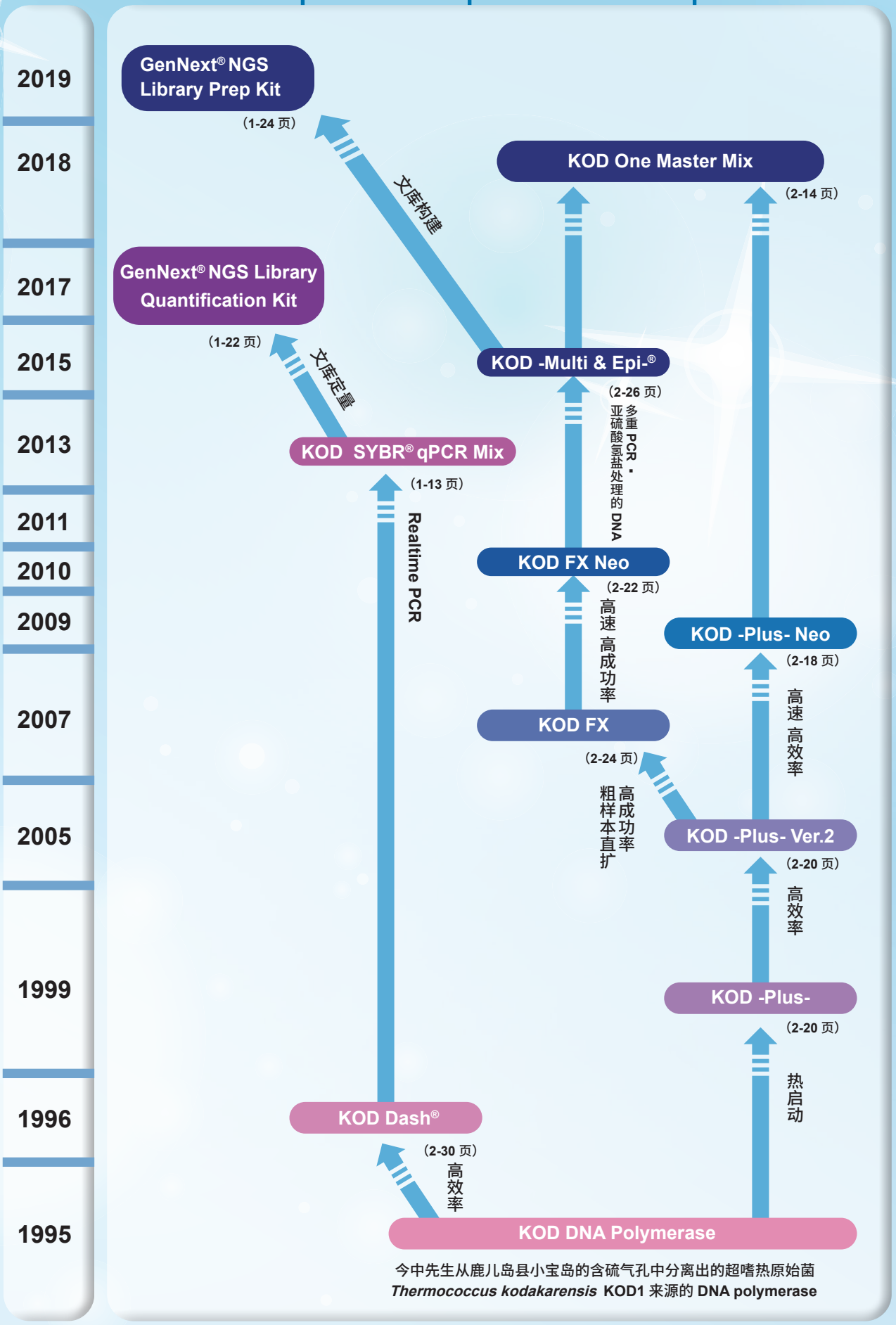
福井县的敦贺市，位于京都的东北部，北临日本海，长期以来，就是与中国发展贸易的重要窗口。近年来， 除了港口贸易之外，又以夏天的海水浴和冬天的滑雪吸引了大量的游客。

我们的生物制剂研究所就设在这座美丽的滨海城市，与研究所毗邻的是我们的生物制剂工厂。TOYOBO 生物试剂的所有产品都是在这里研究、开发、生产，然后运送到全球各地， 所有 -20℃低温冷冻品的运输条件均为食品级干冰。因此，我们可以保证全球所有用户所使用的 TOYOBO 生物试剂的品质都是一致的。

为了满足更多客户的需求，从本版目录开始，我们对部分产品的包装进行了调整，同时推出了一系列新产品和升级版产品，以期带给您更多的选择。

《PCR 酶 KOD 系列的发展》

NGS 用试剂 | Realtime PCR | 高效率・高成功率 | 高保真



今中先生从鹿儿岛县小宝岛的含硫气孔中分离出的超嗜热原始菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 来源的 DNA polymerase

New Line up 2021～2022



使用简便，性能卓越的荧光定量 PCR 用 Master Mix，可兼容绝大多数 qPCR 仪器。

▶P1-17 页

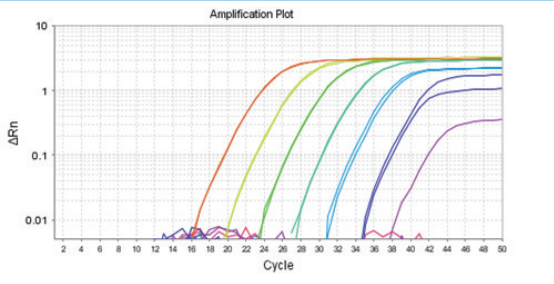
新一代高效率 Realtime qPCR 预混液

THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix

◎ 更高的特异性、扩增效率及检测灵敏度
◎ 兼容高速 PCR
◎ 含 dUTP 可进行防污染
◎ 配制完成的预混液可稳定保存
◎ 含 passive reference 校正染料及着色剂

相比上一代 THUNDERBIRD 系列性能大幅提升！

★含有蓝色染料作为视觉辅助，加样更轻松！



灵活高效的 qPCR 检测方案！！ TTx 酶、buffer、热启动抗体等核心原料均可独立购买

▶P2-34 页

基于热启动 TTx 酶的高灵敏度 qPCR/qRT-PCR kits

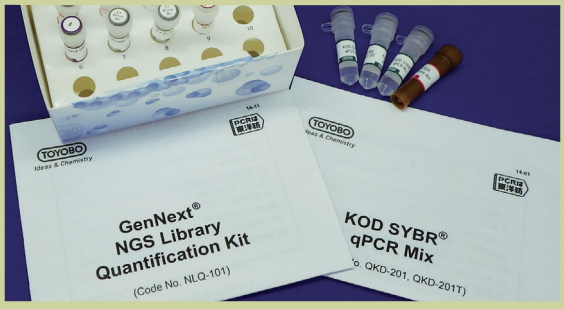
Hot Start TTx (DNA) Kit
Hot Start TTx (RNA) Kit

◎ 兼具逆转录及 DNA 聚合酶活性
◎ 灵敏度及 PCR 反应速度均优于 Taq
◎ 可进行血液直扩，耐受能力强

特别适合粗样品直扩等要求准确快速的场景

★使用含 Mg^{2+} 的 buffer 可进行 DNA 的扩增定量，
使用含 Mn^{2+} 的 buffer 可进行 RNA 一步法定量检测。

GenNext® NGS Library Quantification Kit



使用了 KOD SYBR® qPCR Mix 的 Illumina 公司二代测序仪用文库定量试剂盒。

▶P1-22 页

GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit



应用「RT-RamDA™ 法」从单细胞或微量 RNA 开始的全长 cDNA 合成试剂盒

▶P1-26 页

Hot Item 2021~2022



同时也适用于 mRNA 的表达分析，以及多重检测。

使用高效率逆转录酶 ReverTra Ace® 和 PCR 酶 Tth DNA Polymerase 的双酶一步法实时荧光定量试剂盒。

▶P1-8 页

高效率 One-step qRT-PCR Kit

THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit

◎ 快速·高灵敏度
◎ 降低了序列偏差性
◎ 提高了对 PCR 抑制物的抗性
◎ 使用 dUTP 的防污染体系

特别适合于 RNA 病毒的快速·高灵敏定量

★逆转录和 PCR 在同一反应体系中连续进行，适合进行高通量分析。



含有热启动抗体的即用型 2x PCR Master Mix，另有预混了 loading dye 的版本 (KMM-201)，方便直接电泳。

▶P2-14 页

高速·高保真·高效率 PCR 酶预混液，在保留 KOD 系列卓越性能的同时进一步实现高速 PCR

KOD One® PCR Master Mix

◎ 延伸速度最快可达 1kb/s
◎ 保真性达到 KOD 系列最高
◎ 适合微量模板及粗样本扩增
◎ 适配含 dU、dI 的模板和引物

适合各种长度片段的鉴定、克隆与改造

★兼具 KOD FX 系列高灵敏度以及 KOD Plus 系列超高保真度的优点。



方便·快速的 cDNA 合成！！

从细胞裂解液开始，高效率合成用于实时荧光定量的 cDNA

▶P3-5 页

qPCR 用细胞裂解 & cDNA 合成试剂盒（培养细胞用）

SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR

◎ 无需纯化 RNA（大幅缩短操作时间）
◎ 从裂解液开始合成高质量 cDNA
◎ 降低了高通量分析时的误差
◎ 可以与各种荧光定量 PCR 试剂组合使用

非常适合进行高通量分析

★即使从 RNase 活性高的培养细胞中，也可以合成高质量的 cDNA。

东洋纺（上海）生物科技有限公司——《网站及公众号说明》

网站说明



以货号为搜索关键词查询对应产品信息

填写订购信息后我们会帮您和当地代理商取得联系

在线查看电子版产品目录（科研 / 工业）

快速查询产品信息

公众号说明



查看东洋纺基本信息

通过在线提问告诉我们您的需求和建议

获取各区域销售代理商信息

获取最新产品促销活动、现场活动等

查询当前大致的库存状态

点击获取常见问题的自助解决方法

获取最新技术咨询，产品资料等

查看各分类下热销产品的简介，包括货号，包装等

「qPCR」

第 1 章　目录 1-1

➔ 按用途分类的产品流程图 1-2

➔ 关于荧光定量 PCR 1-4

➔ 二代测序相关问题 1-7

➔ **qPCR**

THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit 1-8
RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix 系列 1-12
KOD SYBR® qPCR Mix 1-13
THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR 系列 1-17
THUNDERBIRD® qPCR 系列 1-19
Realtime PCR Master Mix 系列 1-21

➔ **NGS 相关**

GenNext® NGS Library Quantification Kit 1-22
GenNext® NGS Library Prep Kit 1-24
GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit 1-26

INDEX

「qPCR」

{ 按用途分类的产品流程图 }

培养细胞

提纯 RNA

cDNA 合成试剂盒

荧光定量 PCR 用 cDNA 合成试剂盒

➔ (3-8 页)

- ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover
- ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix
- ReverTra Ace® qPCR RT Kit

1-step Realtime PCR 试剂盒

THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit

➔ (1-8 页)

***RNA-direct*™ Realtime PCR Master Mix 系列**

➔ (1-12 页)

【TaqMan® 探针用】

- *RNA-direct*™ Realtime PCR Master Mix

【SYBR® Green 染料用】

- *RNA-direct*™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix

针对困难靶标（高 GC、长链）以及临床样品等困难模板。

高效率 Realtime PCR 试剂盒（高 GC 含量・长链・粗样本）

- KOD SYBR® qPCR Mix

➔ (1-13 页)

从培养细胞开始高效合成 cDNA

- *SuperPrep*® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (RT Reagent) ➔ (3-5 页)

在通用条件下进行高性能、准确的定量。

高效率 Realtime PCR 试剂盒（性能＋性价比）

THUNDERBIRD® Next qPCR Mix 系列 ➔ (1-17 页)

THUNDERBIRD® qPCR Mix 系列 ➔ (1-19 页)

【TaqMan® 探针用】

新产品 THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix・THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix

【SYBR® Green 染料用】

新产品 THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix・THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix

高效率 Realtime PCR 试剂盒（性能稳定可靠）

Realtime PCR Master Mix 系列 ➔ (1-21 页)

【TaqMan® 探针用】

- Realtime PCR Master Mix

【SYBR® Green 染料用】

- SYBR® Green Realtime PCR Master Mix・SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-

「NGS」

{ 按用途分类的产品流程图 }

单细胞

微量 RNA

常规 DNA/RNA

微量 RNA/ 单细胞 cDNA 合成试剂盒

GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit
➔ (1-26 页)

【NGS 用】
- GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit

【qPCR 用】
- RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit

【单细胞裂解液】
- RamDA Cell Lysis Kit

高效多重 PCR/cDNA 合成

- KOD -Multi & Epi-® ➔ (2-26 页)
- ReverTra Ace -α-® ➔ (3-12 页)

Illumina 平台二代测序用文库构建试剂盒

- GenNext® NGS Library Prep Kit

➔ (1-24 页)

高效率 Realtime PCR 预混液

THUNDERBIRD® Next qPCR Mix 系列
THUNDERBIRD® qPCR Mix 系列
Realtime PCR Master Mix 系列
KOD SYBR® qPCR Mix

Illumina 平台二代测序用文库定量剂盒

GenNext® NGS Library Quantification Kit ➔ (1-20 页)

1 关于荧光定量 PCR

1. 关于荧光定量 PCR 的检测方法

（1）各种检测方法

Realtime PCR检测方法，通常有使用SYBR® Green I等染料的掺入法与使用TaqMan®探针的探针法两种。两种方法各有其特长，因此根据用途选择方法很重要。

掺入法以荧光染料强度的大小为指标来检测DNA的扩增。由于该方法非常简便，因此想迅速进行实验，且要控制实验成本时，可考虑该方法。但用该方法通常会检测出引物二聚体等实验目的之外的扩增产物，因此必须注意特异性。用该方法时，一般要在扩增后进行融解曲线分析。DNA片段由于序列、长度不同而导致Tm值有差异，通过融解曲线分析能确认目的基因是否被特异性扩增(图1)。确认到非特异性扩增时，需重新探讨引物、循环、反应条件等。或者可考虑使用能提高特异性的Realtime PCR试剂「THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix」,「SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-」。

另一方面，TaqMan®探针法是通过特异性标记探针来检测扩增产物的方法。虽然探针的设计非常花工夫，但由于其能表现出优良的特异性，因此无需再进行融解曲线分析确认等。

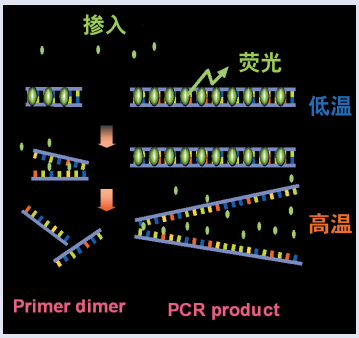


图1 掺入法检测融解曲线测定的原理

（2）2-step法与1-step法

进行检测分析时，一般通常以RNA为模板合成cDNA，然后取一部分进行Realtime PCR。该方法被称为2-step法。另一方面，使用具有逆转录活性的Tth DNA polymerase(以下简称Tth)等将cDNA合成与PCR在同一离心管内进行的方法称为1-step法。

2-step法的优点在于，只要取一部分合成的cDNA进行分析，因此可以进行多次检测。因此，需要对很多基因的检测进行比较，或者想要留下一些由贵重的样品合成的cDNA时，可使用该方法。而1-step法适合用于2、3个基因同时分析的高通量检测。本公司提供使用Tth的1-step分析用Realtime PCR试剂。

表1 荧光定量PCR相关试剂

2-step试剂			
cDNA合成	FSQ-101	ReverTra Ace® qPCR RT Kit	3-10页
cDNA合成	FSQ-201	ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix	3-8页
cDNA合成	FSQ-301	ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix With gDNA remover	3-8页
探针法	QPS-101	THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix	1-19页
探针法	QPK-101	Realtime PCR Master Mix	1-21页
探针法	QPX-101	THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix	1-17页
掺入法	QKD-201	KOD SYBR® qPCR Mix	1-13页
掺入法	QPS-201	THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix	1-19页
掺入法	QPK-201	SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	1-21页
掺入法	QPK-212	SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-	1-21页
掺入法	QPX-201	THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix	1-17页
1-step试剂			
探针法	QRZ-101	THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit	1-8页
探针法	QRT-101	*RNA-direct* Realtime PCR Master Mix	1-12页
掺入法	QRT-201	*RNA-direct* SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	1-12页

2. 引物设计方法

Realtime PCR用引物一般设计为在目的基因50~180bp的区域进行扩增。引物的长度最好在20mer左右。不理想的引物设计一般有：①F,R引物的3'末端相互补、②引物3'末端附近GC含量较高、③引物内含有相互补的序列。

按如图2所示设计引物，用Taq DNA polymerase进行探讨，结果如图3所示。

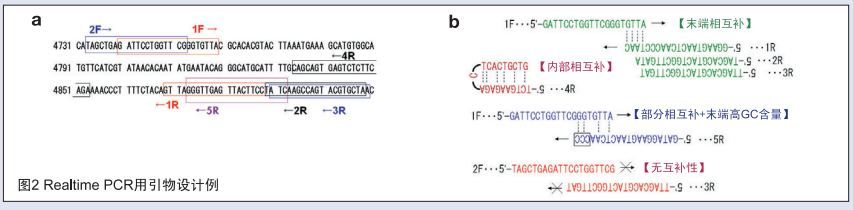


图2 Realtime PCR用引物设计例

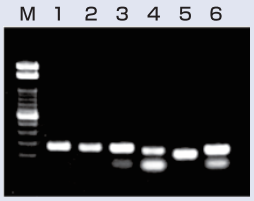


图3 引物序列和引物二聚体的关系

M: 100bp Ladder marker
1: 2F-3R（无互补性）
2: 1F-3R（末端1个碱基相互补）
3: 1F-2R（末端2个碱基相互补）
4: 1F-1R（末端4个碱基相互补）
5: 1F-4R（内部相互补）
6: 1F-5R（部分相互补＋末端高GC含量）

从探讨的结果来看，3'末端有2个碱基以上相互补的引物对，以及3'末端部分相互补且GC含量较高的引物对容易产生引物二聚体。

与此相反，末端只有1个碱基相互补的组合，内部有相互补区域的引物则不会产生引物二聚体。但也有实验指导手册指出，末端只有1个碱基相互补，内部有相互补区域的引物并不理想，而当只能设计这样的引物的时候，建议多进行几组引物设计，最好预先试一下。另外，虽然也可用引物设计软件进行设计，但通常情况下，不进行实际扩增实验并不能知道结果，因此最好对设计好的引物组合摸索条件。

3. 相对定量的方法

从理论上讲，由于PCR产物是成倍增加的，因此检测量可以用Ct值的乘方来定量，但实际上并非如此。这是因为由于引物的序列、扩增区域等的不同，有的容易扩增，有的不容易扩增。因此，在Realtime PCR分析中，经常取每种样品按一定的倍数稀释（如10倍稀释样品、5倍稀释样品），作为对照用样品作出标准曲线，以此作为标准，来计算并比较各自的检测量。对照样品可不要求绝对拷贝数、对含有各种基因的细胞、组织中抽提的RNA进行梯度稀释后均可以使用。

然而，作为样品的Total RNA、Poly (A)$^+$ RNA等由于来自异质，利用吸光度的RNA浓度的检测会有误差。而且，即便RNA的量可以准确定量，各个样品各自多少细胞也不尽相同，不能直接比较得到定量值。因此，一般情况下，用β-actin、G3PDH等内参基因的定量值对目的基因的定量值进行校正后才能进行比较。图4为使用内参的相对定量示意图。

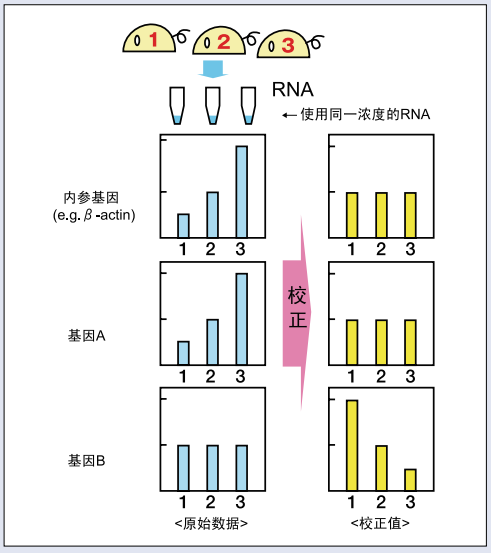
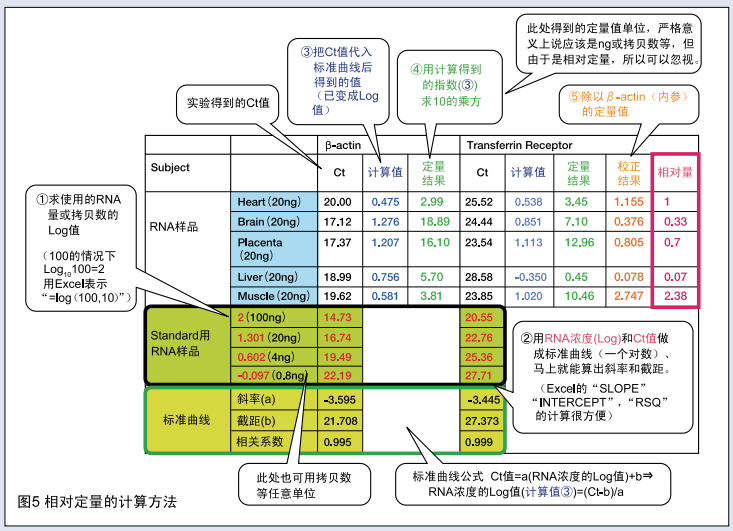


图4 内参的相对定量示意图

图5为以β-actin为内参基因，来相对定量从各器官检测出的Transferrin receptor基因量的计算例。

该表的方法用Excel表来计算非常方便。

一般把各基因标准曲线得到的定量结果导入到表中，然后除以内参值再校正。



Subject		β-actin Ct	β-actin 计算值	β-actin 定量结果	Transferrin Receptor Ct	Transferrin Receptor 计算值	Transferrin Receptor 定量结果	校正结果	相对量
RNA样品	Heart (20ng)	20.00	0.475	2.99	25.52	0.538	3.45	1.155	1
	Brain (20ng)	17.12	1.276	18.89	24.44	0.851	7.10	0.376	0.33
	Placenta (20ng)	17.37	1.207	16.10	23.54	1.113	12.96	0.805	0.7
	Liver (20ng)	18.99	0.756	5.70	28.58	-0.350	0.45	0.078	0.07
	Muscle (20ng)	19.62	0.581	3.81	23.85	1.020	10.46	2.747	2.38
Standard用RNA样品	2 (100ng)	14.73			20.55				
	1.301 (20ng)	16.74			22.76				
	0.602 (4ng)	19.49			25.36				
	-0.097 (0.8ng)	22.19			27.71				
标准曲线	斜率(a)	-3.595			-3.445				
	截距(b)	21.708			27.373				
	相关系数	0.995			0.999				

图5 相对定量的计算方法

4. 用普通的荧光定量 PCR 难以检测的目的片段及样品的解决方法

难扩增序列（高GC含量序列，易形成二级结构的序列），长链目的片段及粗样品的扩增等，用普通的荧光定量PCR试剂有时会难以检测，其原因之一是普通的荧光定量PCR试剂使用了Taq DNA polymerase。

Taq DNA polymerase是一种通用性很高，被广泛使用的PCR酶。然而，对于以上列举的目的片段和样品等不适用。

另一方面， KOD DNA polymerase虽然通用性低，但是通过优化处理，则非常适用于上述用途。我司研发人员通过敲除3'→5'核酸外切酶活性（影响通用性的主要原因之一），对KOD exo(-) DNA polymerase进行了优化处理，开发了[KOD SYBR® qPCR Mix](1-13页)。该荧光定量PCR试剂与以往使用Taq DNA polymerase的荧光定量PCR试剂相比具有以下特征。

KOD SYBR® qPCR Mix利用了KOD DNA Polymerase酶的特性（高效率、不易受粗样品所含抑制剂的影响），提高了SYBR® Green I分析的便利性及通用性，具有如右表所示的不同特性。

与以往试剂的比较

	以往产品（使用Taq）	KOD SYBR® qPCR Mix
酶	Taq DNA Polymerase	KOD DNA Polymerase [exo(-)mutant]
扩增长度	70 ～ 300 bp	70 ～ 2000 bp
高GC含量目的片段	难扩增	易扩增
抑制剂的影响	易受影响（需纯化DNA）	不易受影响（可直接扩增粗样品）

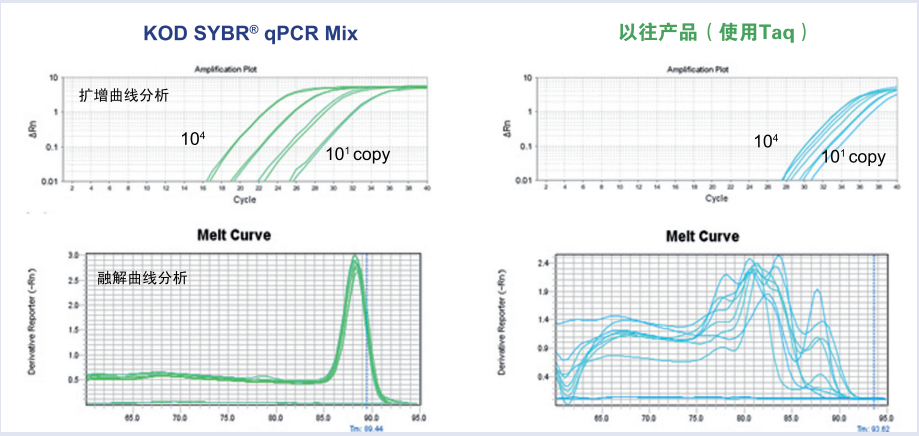
利用这些性质，可应用于各种用途。

作为难扩增序列的应用例，以启动子周边序列扩增为例。近年来通过ChIP(染色质免疫沉淀法)，采用荧光定量PCR法分析转录调节因子的结合序列的方法被频繁地使用。

然而，这些序列容易形成二级结构，GC含量高及含有重复序列的情况比较多，用普通的荧光定量PCR试剂往往就不能进行定量分析，而用本试剂则可进行有效且定量的检测。

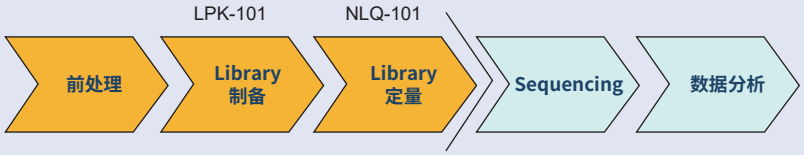
CCCGCCCGAGAGAGTGACTCTCACGAGAGCCGCGAGAGTCAGCTTGGCCAATCCGTG
CGGTCGGCGGCCGCTCCCTTTATAAGCCGACTCGCCCGGCAGCGCACCGGGTTGCGG
AGGGTGGGCCTGGGAGGGGTGGTGGCCATTTTTTGTCTAACCCTAACTGAGAAGGGC
GTAGGCGCCGTGCTTTTGCTCCCCGCGCGCTGTTTTTCTCGCTGACTT

目的序列（GC含量： 64%、219bp）： Homo sapiens telomerase RNA（TR） gene, promoter and complete sequence
模板：人基因组DNA
引物（引自ChIP法的论文）：使用上述用红色表示的序列。



NGS 简介

基因测序技术通过在分子水平解读生物遗传信息，为解答基础研究、农业、环境、医学健康等领域最具挑战性的问题提供帮助。第二代测序（Next Generation Sequencing）因其高通量、低成本的特点，应用前景广泛，大致包括基因组测序、转录组测序、外显子测序、靶向测序等。虽然种类繁多，上机前的主要流程大致可分为以下几个步骤：



1）样本前处理

与下一代单分子测序技术不同，NGS 测序仪可接受的文库形态比较固定，一般为较短的 DNA 片段，并且两端有固定的接头序列。相比之下，起始样本的种类要丰富得多，可以是实际样本中分离纯化的 DNA/RNA，也可以是探针捕获序列或 PCR 产物等。对于平均长度较短的样本，可直接用于文库构建，而序列较长的模板则需要提前打断成合适大小的片段。

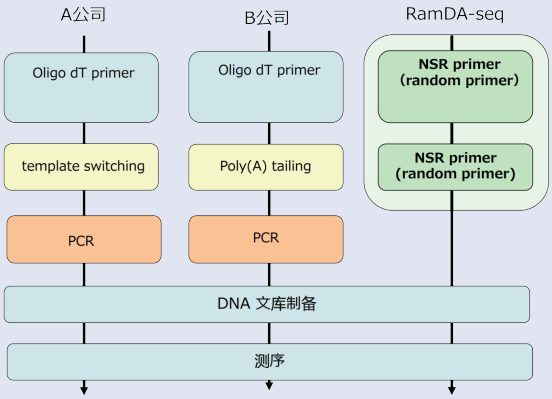
多重 PCR 是样品前处理的重要方式，常见于 SNP 检测、靶向测序等的序列扩增环节。专用的 KOD -Multi & Epi-® 高保真 PCR 聚合酶能保证各靶序列均一扩增，从源头保证测序的准确性。

对于 RNA 样本，第一步需要通过逆转录酶转化为 cDNA，传统的转录组测序方法难以保证全长覆盖的均一性，在以单细胞或微量 RNA 为样本时尤为突出。GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit 借助 RT-RamDA 全转录组扩增技术，可以实现从 RNA 直接扩增出足量的 cDNA，再结合优化后的 NSR 引物有效抑制 rRNA 的扩增，得到的 cDNA 可进行高质量的文库构建。相比传统使用 Oligo dT 为逆转录引物的技术，RT-RamDA 无需 PCR 即可实现 10 倍以上的 cDNA 得率，同时将偏差降到最低，对于较长的 RNA 片段保持与常规转录本一致的测序成功率。

2）DNA 文库制备

以 Illumina 平台为例，前处理后的样品大致需要经过补齐末端、加 'A'、连接测序接头 (Adapter) 等步骤以构建文库。由于涉及的反应较多，以往试剂盒包含的试剂种类繁多，操作步骤冗长，建库效率较低，GenNext® NGS Library Prep Kit 整合了末端修复和加 'A' 过程，精简组分的同时缩短了操作时间，文库得率也大大提高。

针对低起始量的文库，有必要通过 PCR 增加文库产量，由此可能造成的扩增偏差会直接影响最终的测序结果。此外，在连接测序接头以及 PCR 扩增之后通常需要使用磁珠进行产物纯化，一方面降低体系对下游实验的影响，另一方面也对片段大小进行筛选。



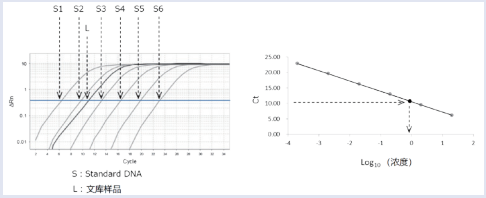
RNA 建库技术的比较

3) 文库上机前定量

文库上机量过高或过低都有可能导致测序失败，因此上机前进行准确定量很重要，实时荧光定量 PCR 是应用较为广泛的方法之一。主要原理是，以测序接头上特异的 P5、P7 序列为引物，通过已知浓度的系列标准品对待测文库进行绝对定量，从而精确计算出有效片段的浓度，也即排除了两端测序接头不完整的 DNA 片段。该方法结果精确，重复性好，很适合高通量操作。

定量前需要对文库按恰当的比例进行稀释，得到标准曲线和待测样品的 Ct 值，然后根据公式计算出初始文库的 mole 浓度。我司产品 GenNext® NGS Library Quantification Kit 包含了定量引物及 6 个浓度的标准品，无需额外试剂即可完成定量操作。同时采用了高效率的 KOD SYBR® qPCR Mix，能够应对高 GC、长片段这种难扩增的序列，保证了定量结果的准确性和可重复性。

$$\text{文库浓度 (nM)} = \frac{\text{[计算出的文库样本的浓度]} \times 452\ \text{bp (Standard DNA 片段长度)} \times \text{稀释倍率}}{1000 \times \text{[文库样品平均片段长度bp]}}$$



最适用于 RNA 病毒等迅速 • 高灵敏度的定量!

高效率 One Step qRT-PCR Kit

THUNDERBIRD® Probe One-Step qRT-PCR Kit

Code: QRZ-101S	20次份 *	￥500
Code: QRZ-101	100次份 *	￥2,400

本试剂盒是使用了高效逆转录酶 ReverTra Ace 和 PCR 酶 Tth DNA Polymerase 的 2 酶体系一步法荧光定量 PCR 试剂盒。主要用于使用 TaqMan® 分析法的荧光定量 PCR。



➔特 征

❶迅速 • 高灵敏度

通过使用 TaqMan® 探针一步法 qRT-PCR, 能够对微量 RNA 进行迅速、高灵敏度的检测。

❷降低了序列偏差性

不受目的基因序列影响，可高灵敏度地检测各种 RNA，把多重荧光检测中各目的片段扩增的偏差性抑制到最低。

❸对 PCR 抑制物的抗性

能够降低血红素等 RNA 中混入杂质而引起的抑制作用。

❹使用 dUTP

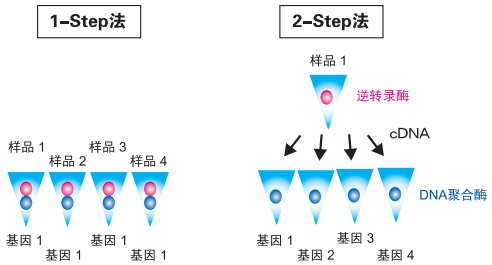
可通过添加 UNG，防止因 carryover 污染导致的假阳性。

* 本试剂盒中不含 UNG。

➔用 途 : 荧光定量 PCR

➔说 明

本试剂盒是使用了高效率逆转录酶 ReverTra Ace® 和 PCR 酶 Tth DNA Polymerase 的两酶一步法荧光定量 PCR 试剂盒。主要用于 TaqMan 分析法的荧光定量 PCR。



	1-Step法	2-Step法
优点	▪ 一次反应就能完成检测 → 样品数较多时比较有效 → 降低了污染的风险	▪ 可使用cDNA进行多个基因的检测 → 检测的基因数较多时比较有效 ▪ 逆转录用的引物的选择较多
缺点	▪ reverse primer已被限定 ▪ 难以最优化（容易出现偏差） ▪ 无法进行多重检测	▪ 操作烦杂
主要用途	▪ 病毒等的定量、筛选等	▪ mRNA的相对定量等

产品内容:

<QRZ-101>

2×Reaction Buffer	1.25ml×2 支
DNA Polymerase	125μl×1 支
RT Enzyme Mix	125μl×1 支
50×ROX Reference dye**	100μl×1 支
RNase free Water	1.25ml×2 支

* 表示的是 50μl 反应体系时的使用次数。

**ROX 溶液另外添附，可以适用于所有市售的荧光定量 PCR 仪。

保存:

-20°C

备注:

LightCycler® 是 Idaho Technology Inc. 的商标。

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

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

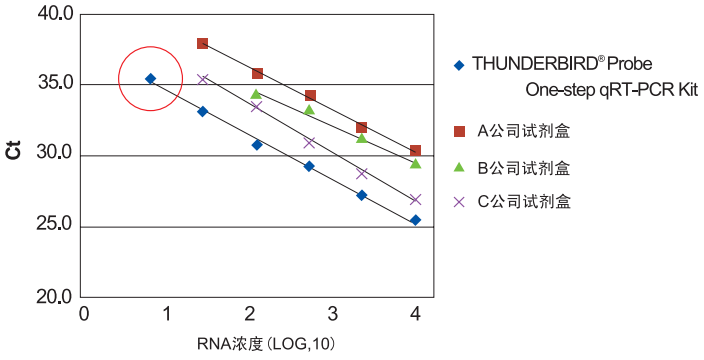
由于逆转录反应与 PCR 在同一反应体系中连续进行，反应液的分装操作只需一次即可完成，适用于高通量分析。
此外，还降低了样品间交叉污染的危险性。
本产品通过将两种酶与最优化的 buffer 相组合，可以对微量 RNA 进行迅速定量。
适用于对 RNA 病毒及低表达量 mRNA 的定量。同时，不易受目的基因序列的影响，可高灵敏度地检出各种 RNA。

以往一步法的缺点	本试剂盒的改良点
● 引物的优化比较困难 【无法达到高灵敏度】 ● 容易产生因序列而导致的测定灵敏度偏差	● 将因引物、探针或目的片段序列而引起的扩增偏差性影响抑制到了最低限度 ➡ 适用于各种病毒及mRNA的迅速、高灵敏度检测/定量
● 容易因RNA中的杂质而导致灵敏度下降	● 可避免因杂质而引起的抑制
● 难以用TaqMan®探针法进行多重荧光分析	● 将多重检测中各目的片段扩增的偏差抑制在最低限度 ➡ 最适用于以管家基因作为对照的多基因的相对定量等

➔ 结果示例

❶ 肠道病毒 RNA 的高灵敏度检测

将肠道病毒 RNA 作 4 倍稀释，使用 TaqMan® 探针法，与其他公司的产品进行检测灵敏度・定量性的比较。引物、TaqMan® 探针直接使用了论文记载的序列（未进行优化处理）。
用 ABI 的 StepOne Plus™ 进行分析。
结果可见，只有在使用本试剂的情况下，才能检测出 10 个拷贝数以下的 RNA, 因此可得到更广的可定量扩增区域。
因此，本试剂盒对 RNA 病毒及低表达量的 mRNA 检测・定量非常有效。



基本反应条件：

反应液组成

试剂	
RNase free Water	X μl
2×Reaction Buffer	25 μl
DNA Polymerase	1.25 μl
RT Enzyme Mix	1.25 μl
Forward Primer	25pmol
Reverse Primer	25pmol
TaqMan® probe	10pmol
50×ROX Reference dye	1/0.1 μl
(Uracil-N-Glycosylase	1Unit*1)
RNA 溶液	Y μl
总体积	50 μl

*1 进行 Uracil-N-Glycosylase(UNG) 处理时，请使用热敏性 UNG(heat-labile)。可根据各公司推荐的条件，调整酶的用量。

Cycle
(20~25°C ,10min.*2)
50°C , 10min.
95°C , 1min.
95°C , 15sec. ┐ 40~45 cycles
60°C , 45sec. ┘

*2 进行 UNG 处理时，请在逆转录反应前设定 UNG 反应的步骤。上述表示的是通常的温度条件及反应时间，请根据各公司推荐的条件进行适当调整。

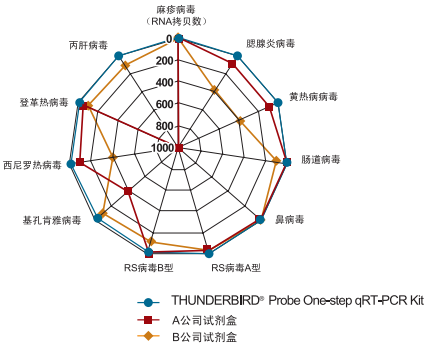
❷各种病毒检测灵敏度的比较

配制 11 种病毒 RNA 的 4 倍稀释系列溶液，使用 TaqMan® 探针法，进行最高检测灵敏度的比较。

引物、TaqMan® 探针直接使用论文记载。使用 ABI 的 StepOne Plus™ 进行检测。

右图是将各试剂能检测到的最低拷贝数连线作成的。

结果显示，只有在用本试剂盒的情况下，才能对所有的目的基因 30 个拷贝以下的灵敏度进行检测及定量。本实验表明，本产品不受目的片段序列的影响，能高灵敏度地检测到各种 RNA。



❸多重荧光检测（Multiplex）体系中的表达定量

使用 3 种荧光染料标记的 TaqMan® 探针，分别进行单独检测及通过多重荧光检测体系一次性使用 3 种 TaqMan® 探针进行检测，分析 IL-1β、TNF-α、GAPDH 基因的表达量。

实验中以 HeLa S3 RNA (1pg~100ng 的 10 倍稀释 [6 个梯度]) 为样品，用 Roche Diagnositics 公司的 LightCycler® 96 进行分析。

结果显示，各基因单独检测（Singleplex）（图 1）与使用 3 通道的多重荧光检测（Multiplex）（图 2）得到了相同的灵敏度，PCR 效率及相关系数并没有太大的差异（表 1）。

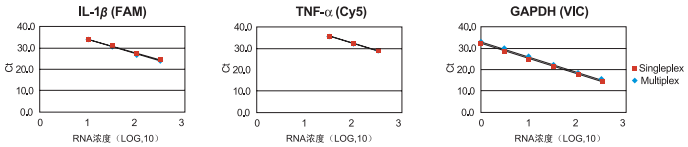


图1 单独检测（Singleplex）的结果

各目的基因单独检测的结果。为了与图2多重荧光检测（Multiplex）的结果相比较作成了图。

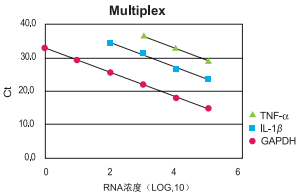


图2 多重荧光检测的结果

表1 多重荧光检测（Multiplex）与单独检测（Singleplex）的PCR效率与相关系数的比较

	IL-1β		TNF-α		GAPDH	
	PCR效率	R^2	PCR效率	R^2	PCR效率	R^2
Multiplex	90.2%	0.989	91.8%	0.999	89.6%	0.999
Singleplex	91.6%	0.999	92.9%	0.998	91.6%	0.999

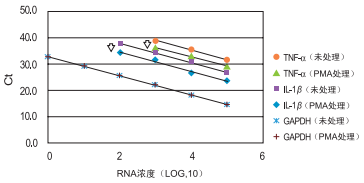


图3 通过多重荧光检测表达分析的结果

将HeLa S3细胞铺于6孔板中，每孔4×10⁵个细胞，添加100nM的phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)，培养20小时。之后，使用分别从PMA处理及未处理的细胞中提取的Total RNA，用本试剂盒对IL-1β、TNF-α、GAPDH基因的表达量进行分析。

结果显示，通过PMA处理，IL-1β、TNF-α的表达量得到了提高。

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

❹使用临床检测样本的 RS 病毒 A 型、B 型的同时定量

使用从 20 个检测样本中的咽喉粘液中抽提的 RNA 样品，用 RT-PCR 法及使用 THUNDERBIRD® One-step qRT-PCR Kit 的 qRT-PCR 法进行 RS 病毒的检测。
另外，同时与用抗体检测方法进行分析的结果进行比较。
为了判别 RS 病毒的 A 型和 B 型，使用特异性引物及各种不同荧光标记的 TaqMan® 探针，用 qRT-PCR 进行定量分析。
分析使用了 Roche Diagnositics 公司的 LightCycler® 96。结果显示，在抗体检测法中判定为假阴性的检测体，用 PCR 法可以高相关性地判定有无感染，且类型判定结果完全一致。

表　使用各种方法的RS病毒的检测相关试验结果

检测样本编号	抗体检测方法	PCR（定性、类型判定）	qPCR分析的定量值（拷贝数）	
			A型检测 (FAM, 470nm)	B型检测 (Cy5, 645nm)
1	+	+ (A)	1.6×10^5	-
2	-	-	-	-
3	+	+ (A)	8.1×10^4	-
4	+	+ (A)	2.7×10^5	-
5	-	+ (A)	9.6×10^2	-
6	-	+ (A)	3.6×10^3	-
7	+	+ (A)	2.3×10^6	-
8	-	-	-	-
9	+	+ (A)	1.5×10^5	-
10	+	+ (A)	6.7×10^5	-
11	-	-	-	-
12	+	+ (A)	1.6×10^5	-
13	+	+ (A)	9.4×10^3	-
14	-	+ (A)	9.5×10^3	-
15	+	+ (A)	3.9×10^3	-
16	+	+ (A)	2.4×10^5	-
17	-	-	-	-
18	-	+ (A)	4.2×10^4	-
19	-	+ (A)	3.4×10^2	-
20	-	+ (B)	-	9.6×10^3

➔ 相关产品

❶ 简便的掺入法 One-step Realtime PCR 用试剂

RNA-direct SYBR® Realtime PCR Master Mix	QRT-201	0.5ml×5 支	¥2,000	→ 1-12 页

❷ RNA 配制相关器具

Mag*ical Trapper*	MGS-101	1 个	¥1,000	→ 5-11 页
MagExtractor™ -Viral RNA-	NPK-401F	100 次	¥1,600	→ 5-8 页
MagExtractor™ -RNA-	NPK-201F	100 次	¥2,600	→ 5-6 页

单酶 • 一步法 迅速、高性能的 Realtime PCR 试剂盒。

One Step qRT-PCR Kit

RNA-direct Realtime PCR Master Mix 系列

RNA-direct Realtime PCR Master Mix		
Code: QRT-101	0.5ml × 5支	￥2,000

RNA-direct SYBR® Realtime PCR Master Mix		
Code: QRT-201	0.5ml × 5支	￥2,000

本酶是以 rTth DNA polymerase 为基础开发的单酶一步法 2 × Master Mix。直接以 RNA 为模板，可在单管中进行高效率的 Realtime PCR 分析。



➔ 特 征

❶一步法 • 高通量

以 RNA 为模板，可在单管中进行高效率的 Realtime PCR 分析，快速方便，非常适用于高通量反应。

❷高特异性

为了控制非特异性反应，采用了中和抗体的热启动法。

❸广泛的应用性

可用于 Probe Assay 和 SYBR® Green Assay 等方法。

❹高通用性（可用于各种仪器）

因产品中已添加了 Passive Reference，因此可用于需要校正荧光信号的仪器(如 Applied Biosystem 公司的 ABI PRISM® 7700 等)。

可应用于使用 Glass Capillary 分析体系的仪器(如 Roche 公司的 LightCycler® 等)。

❺可应用于易形成高级结构的 RNA 和高 GC 含量的目的片段

由于本试剂盒可以在高温下进行逆转录反应，因此可以应用于易形成高级结构的模板 RNA。而且因为 Tth DNA Polymerase 对高 GC 含量的序列扩增有效，因此也适用于对高 GC 含量目的片段的检测。

➔ 用 途 : 荧光定量 PCR

➔ 说 明

由于 Tth DNA Polymerase 在 Mn^{2+} 存在的情况，显示出独特的逆转录活性，因此使用该酶可在同一离心管连续进行 cDNA 合成反应和 PCR。本试剂是利用该特性开发而成的「单酶 • 一步法」Realtime PCR 试剂，与在同一反应体系内使用 RTase 和 Taq DNA Polymerase 的「双酶 • 一步法」系列试剂相比，由于用单酶反应更容易设定最佳条件，因此能进行高效率的分析。

产品内容：

<QRT-101,QRT-201>

Master Mix	0.5ml × 5 支
50mM $Mn(OAc)_2$	0.5ml × 1 支

(50 μl 反应体系可用 100 次，20 μl 反应体系可用 250 次)

保存：

-20℃ (避光保存)

备注：

LightCycler® 是 Idaho Technology Inc. 的注册商标。

SYBR® 是 Molecular Probes Inc. 的注册商标。

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

ABI PRISM® 是 Applied Biosystems Inc. 的注册商标。

网络版追加信息：

- 简要备注
- 实验例

基本反应条件：

<SYBR® Green I Assay>

使用 PRISM®7900HT(Applied Biosystems)

灭菌水	X μl
Master Mix	25 μl
50mM $Mn(OAc)_2$	2.5 μl
各引物	10pmoles each
RNA 样品	<1 μg
Total Volume	50 μl

Cycle		
90℃ ,	30sec.	
61℃	20min.	
↓		
95℃	60sec.	
↓		
95℃	15sec.	←
55~65℃	15sec.	45cycles
74℃	45sec.	┘

※ 退火温度请根据引物的 Tm 值在 55~65℃之间调整。

※ 扩增片段最大如在 200bp 左右，则延伸反应的时间为 45sec. 也没有问题。

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

最适用于融解曲线分析的多重 PCR。

高效率荧光定量 PCR Master Mix

KOD SYBR® qPCR Mix

KOD SYBR® qPCR Mix		
Code: QKD-201T	1ml × 1支	￥500
Code: QKD-201	1.67ml × 3支	￥2,450

KOD SYBR® qPCR Mix 是使用 KOD DNA polymerase(KOD) 的 SYBR® Green I 检测体系的荧光定量 PCR 用 Master Mix。通过将去除了 3'→ 5' 核酸外切酶活性（校正活性）的 KOD exo(-) DNA polymerase 与优化过的 buffer 相组合，最大程度地发挥了 KOD 出色的合成性能和不易受粗样品成分抑制的特性，可稳定地用于各种用途的荧光定量 PCR 检测分析。

➔ 特 征

❶适用于高 GC 含量的目的片段

用以往的产品难以扩增的 GC 含量超过 70% 的目的片段，也能确认到定量的扩增。

IGF2R（GC 含量：83%、模板：cDNA）

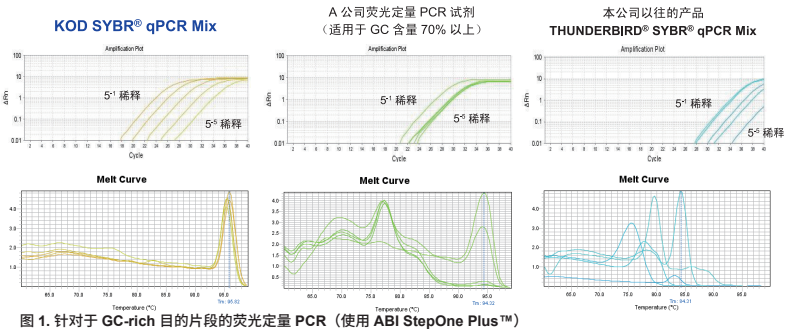


图 1. 针对于 GC-rich 目的片段的荧光定量 PCR（使用 ABI StepOne Plus™）

针对于 GC 含量超过 70% 的目的片段，用各种荧光定量 PCR 试剂进行反应性能的比较。模板用了本公司高性能逆转录反应试剂 [ReverTra Ace® qPCR RT Kit(Code No.FSQ-101)] 合成的 HeLa 细胞 total RNA 来源的 cDNA，对 cDNA 作 5 倍稀释（5 个梯度）进行反应。结果显示，用本公司以往产品难以扩增的高 GC 含量的目的片段也可以得到定量的扩增。另外，由于其高特异性及不易产生引物二聚体的特性，拷贝数较低时也能够进行定量，因此可用于更广的可定量扩增区域。

Homo sapiens telomerase RNA(TR) gene 的启动子区域（GC 含量：64%、扩增长度：219bp）

CCCGCCCGAGAGAGTGACTCTCACGAGAGCCGCGAGAGTCAGCTTGGCCAATCCGTGCGGTCGGCGGCCGCTCCCT
TTATAAGCCGACTCGCCCGGCAGCGCACCGGGTTGCGGAGGGTGGGCCTGGGAGGGGTGGTGGCCATTTTTTGTCT
AACCCTAACTGAGAAGGGCGTAGGCGCCGTGCTTTTGCTCCCCGCGCGCTGTTTTTCTCGCTGACTT

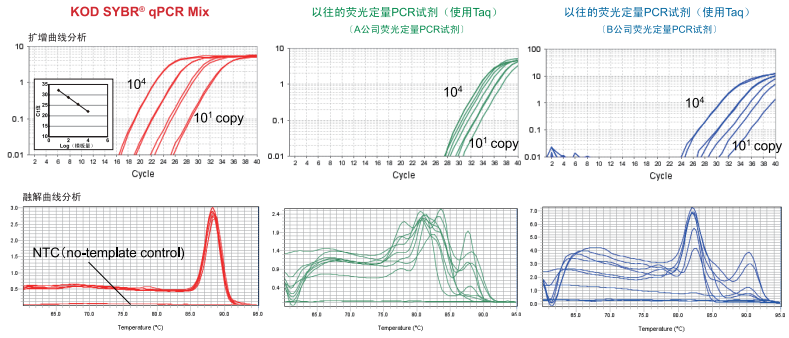


图 2. 针对于 GC 含量有偏差的启动子区域的荧光定量 PCR（使用 ABI StepOne Plus™）
已确认本试剂也适用于易形成二级结构的目的片段。

❷适用于长链目的片段（～ 2kb）

针对于 KOD FX 及 KOD -Plus- 系列等一般 PCR 设计的引物可以直接使用。由于长链目的片段也可以扩增，因此可极大地扩大引物的选择范围。

产品内容：

<QKD-201T>

qPCR Mix	1ml × 1 支
50 × ROX reference dye	50 μl

（50 μl 反应体系可使用 40 次，20 μl 反应体系可使用 100 次）

<QKD-201>

qPCR Mix	1.67ml × 3 支
50 × ROX reference dye	250 μl

（50 μl 反应体系可使用 200 次，20 μl 反应体系可使用 500 次）

保存：

-20°C（避光保存）

※ 在短时间 (3 个月以内) 使用完毕的情况下，可在 2~8°C避光保存。

参考文献：

1）R.M.de Breuil et al.,*PCR Methods Appl.*,**3**:57-59 (1993)
2）P.M.Holland et al.,*Proc.Natl. Acad.Sci.USA* **88**:7276-7280.(1991)

备注：

LightCycler® 是 Idaho Technology Inc. 的注册商标。

SYBR® 是 Molecular Probes Inc. 的注册商标。

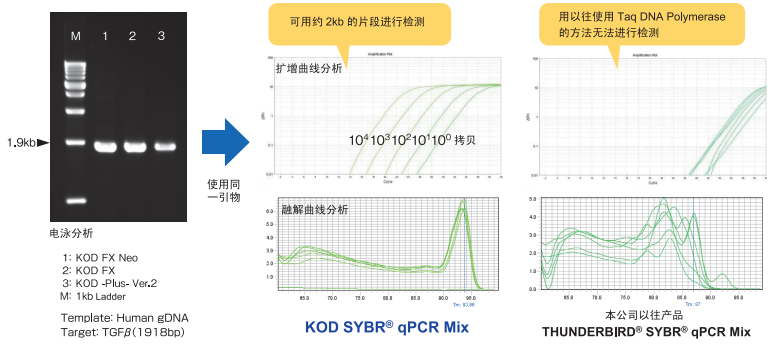
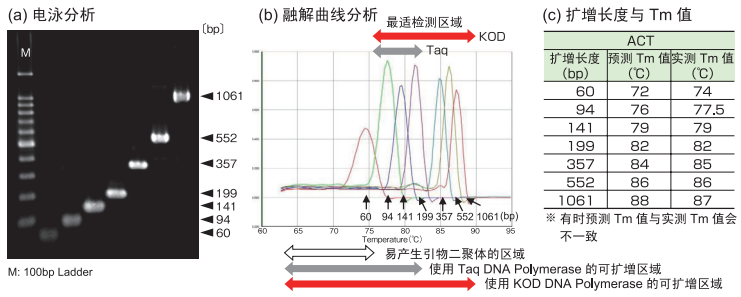


图 3. 针对长链目的片段的荧光定量 PCR（使用 ABI StepOne Plus™）

使用能够用 KOD FX 系列及 KOD -Plus- 系列扩增的引物，对约 2kb 目的片段进行扩增。结果显示，用以往使用 Taq DNA polymerase 的试剂难以扩增的约 2kb 的目的片段，用本产品也可以进行定量的扩增。

由于能够选择长至 2kb 的各种长度的目的片段，因此可以在很广的范围内进行融解曲线分析。因为可以避开产生引物二聚体的区域（短链区域）进行扩增，所以在用 endpoint assay 法进行多态性分析及多重 PCR 分析方面非常有利。



ACT		
扩增长度 (bp)	预测 Tm 值 (℃)	实测 Tm 值 (℃)
60	72	74
94	76	77.5
141	79	79
199	82	82
357	84	85
552	86	86
1061	88	87

※ 有时预测 Tm 值与实测 Tm 值会不一致

图 4. 使用扩增长度不同的目的片段进行分析（使用 ABI 7500）

以人基因组 DNA 为模板对 β-actin 基因上不同长度的目的片段进行扩增，并进行融解曲线分析。结果表明，可得到从 60bp～约 1kb 范围内的扩增产物，且在 74 ～ 87°C的范围内可识别出本次扩增的 PCR 产物。因此，就可通过设计引物来改变扩增片段长度使融解温度产生差异，从而使在单管中进行多目的片段检测成为可能。这种融解曲线的差异虽然会受 GC 含量的影响，但是可以通过计算扩增产物的 Tm 值来进行预测。

❸可使用粗样品进行分析

可直接对植物裂解液、鼠尾碱裂解液、血液等粗样品进行检测。应用 SYBR® Green I 分析体系，能够使复杂的多态性分析及 SNP 分析简单化。

①使用扩增长度多态性进行基因分型

只需通过设计引物来改变 2 个扩增产物的长度，从而使得 Tm 值产生差异，就可在同一离心管里进行小鼠的基因分型（参照前述特征）。

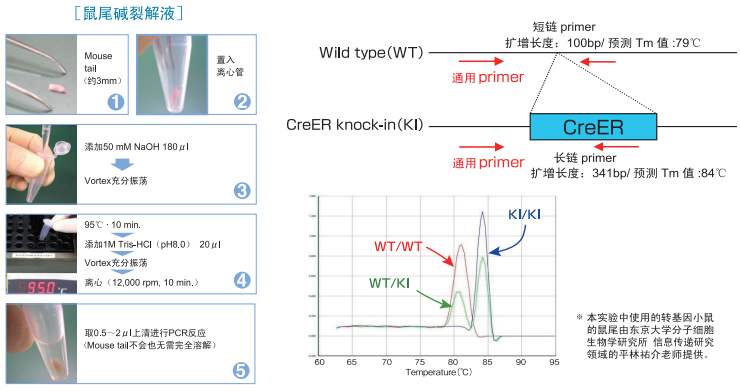


图 5. 应用融解曲线分析在单管中进行小鼠基因分型（使用 ABI 7500）

使用鼠尾的碱裂解液在同一离心管中进行了基因分型。通过改变 WT 特异性扩增产物和 knock-in 特异性扩增产物的片段长度，在计算上，将引物设计为使扩增产物的 Tm 值产生差异。WT 特异性引物相对于 CreER knock-in，因其扩增长度更长，30 秒的延伸时间太短，所以无法扩增。另外，为了在杂合子检测中使各个基因型的峰值比例比较均衡，可将 WT 特异性引物：knock-in 特异性引物 =1:3， 检测结果显示，所有种类均成功地进行了基因分型。

②使用 ASP(Allele specific primer)-PCR 进行 SNP(Single nucleotide polymorphism)分析

将一条引物的 5' 末端加上 GC tail，就可以通过融解曲线分析法识别相同的目的基因，可应用于各种原理的 ASP-PCR。如下所示，从引物 3' 端开始，将第二个碱基设计为 SNP 位点，第三个碱基设计为错配位点，进行分析。

基本反应条件：

< 掺入法 >

灭菌水	X μl
qPCR Mix	10 μl
Forward Primer	4pmoles
Reverse Primer	4pmoles
50 × ROX reference dye	0.4/0.04 μl*
DNA 样品	Y μl
Total Volume	20 μl

*50 × ROX reference dye，是对于使用 Passive Reference 的仪器（如 Applied Biosystems 公司制造的仪器等），为校正各孔间的荧光强度及分注误差而使用。最适添加量根据仪器不同而不同。不用 Passive Reference 进行校正的仪器无需添加。

Cycle
98°C, 120sec.
↓
98°C , 10sec.
60°C *1, 10sec.
68°C , 30sec./500bp
40cycles

*1 ：退火温度请设定在 50 ～ 68°C范围之间。

※ 目的序列在 500bp 以下时延伸时间 30 秒就可以充分进行反应，但是有一部分仪器在检测稳定的荧光时，需要的时间要大于 30 秒。扩增曲线散乱或各孔的差异较大时，请设定较长的延伸时间（45 ～ 60 秒）。

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

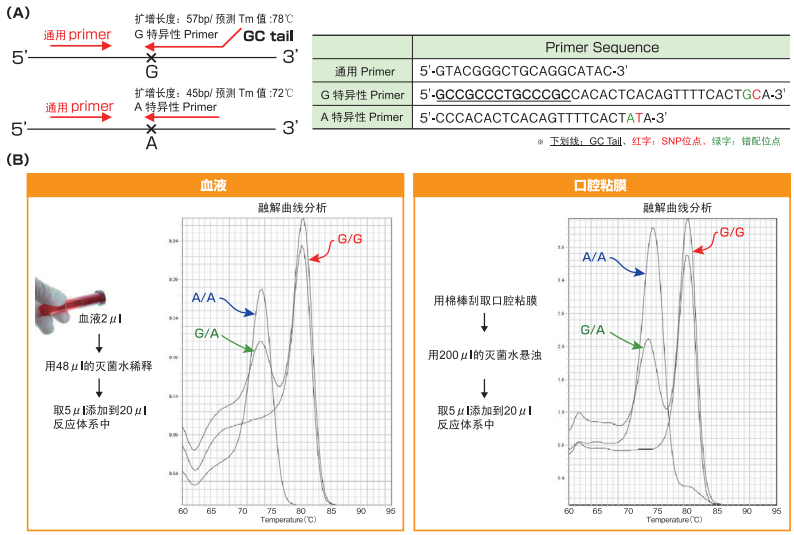


图 6. 血液及口腔粘膜的检测（使用 ABI 7500 Fast）

（A）所示的是用于 ALDH2 SNP 检测的引物。为了能在同一离心管中识别出基因型，引物设计时，在一边等位基因特异性引物上加上了 GC tail(下划线部分)，使扩增产物的融解温度（Tm 值）产生差异。为了通过添加 GC tail 使得融解温度大幅上升，可将扩增片段长度设计为 100bp 以下。另外，在本实验中，将等位基因特异性引物从 3’ 末端开始的第二个碱基设计为 SNP 位点（红色），第三个碱基设计为错配位点（绿色）。

（B）分别取 5μl 血液的水稀释液及口腔粘膜的悬浊液添加到 20μl 反应体系中进行检测。其结果可判断基因型。

③粗样品中目的片段的扩增

用以往使用 Taq DNA polymerase 的荧光定量 PCR 试剂难以扩增的粗样品也可以用本试剂进行分析。

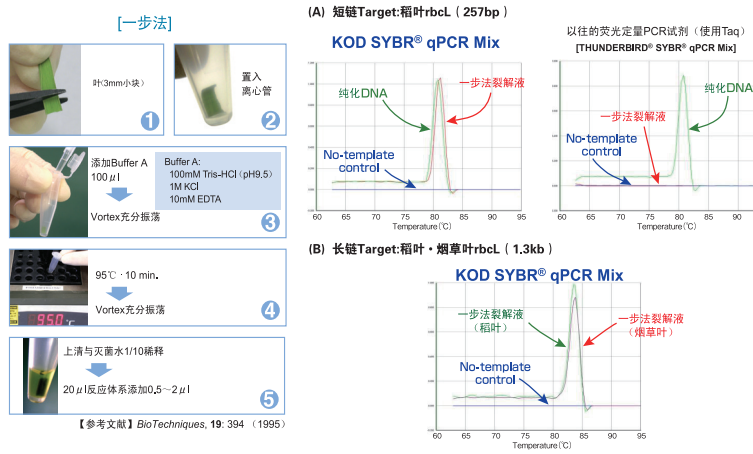


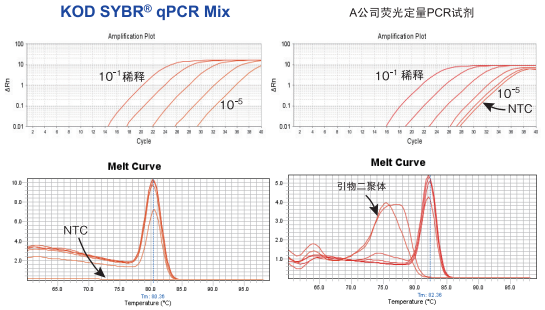
图 7. 粗样品的荧光定量 PCR 检测（使用 ABI 7500）

（A）使用一步法配制的水稻叶裂解液及纯化 DNA，对本公司以往产品和本产品进行了比较实验。结果显示，使用本产品的情况下，用裂解液确认到了特异性扩增，而用使用 Taq DNA polymerase 的以往产品则无法确认到特异性扩增。

（B）对长度为 1.3kb 的目的片段进行了扩增。结果显示，使用本产品的情况下，裂解液样品也可以确认到特异性扩增。

④高特异性

由于抑制了引物二聚体等非特异性反应，因此在低拷贝区域也能够进行定量，可得到更广的可定量扩增区域。另外，将本产品与本公司荧光定量 PCR 专用 cDNA 合成试剂盒 [ReverTraAce® qPCR RT 系列] 组合使用，可更稳定地进行检测。



◆ **目的片段**

KRT10（156bp / GC：43%）

◆ **模板**

用本公司高性能逆转录反应用试剂 [ReverTra Ace® qPCR RT Kit(Code No. FSQ-101)]合成的HeLa 细胞total RNA 来源的cDNA，对cDNA 作10 倍稀释（5 个梯度）及no-template control(NTC)，进行反应。

图 8. 与其他公司荧光定量 PCR 试剂的反应特异性比较。（使用 ABI StepOnePlus™）

对容易产生引物二聚体的目的片段进行荧光定量 PCR。结果显示，使用本产品的情况下，即便是低拷贝数样品及 no-template control(NTC) 引物二聚体也都得到了很好的抑制。

❺适用于各种仪器

本产品除适用于普通及高速的模块型（Block type）仪器外，还适用于使用玻璃毛细管（Glass Capillary Type）的高速循环仪。由于 50× ROX reference dye 单独添附，对于需要 passive reference 的仪器，可根据各仪器的特征把 ROX 调整到最适浓度。

［适用仪器例］

仪　　器	ROX终浓度（添加量）
Applied Biosystems® 7000、7300、7700、7900HT、StepOne™、 StepOnePlus™	1X（1/50量）
Applied Biosystems® 7500、7500Fast、Agilent Technologies Mx3000P、Mx3005P、Mx4000	0.1X（1/500量）
Roche公司仪器（LightCycler® 2.0、LightCycler® Nano等）、Bio-Rad公司仪器（MiniOpticon™、CFX96 Touch™等）、BioFlux Line Gene等	不需要添加

➔ 用　途：荧光定量 PCR

➔ 说　明

KOD SYBR® qPCR Mix 是使用 SYBR® Green I 检测体系的荧光定量 PCR 用 2× 浓度的 Master Mix 试剂。本试剂将除了 ROX(另外添附) 与引物以外的成分预先混合，因此，反应液的配制非常简单，并且将各样品间荧光强度的偏差抑制在最小范围内，可得到重复性很高的结果。

本产品将去除了 3' → 5' 核酸外切酶活性（校正活性）的 KOD exo(-) DNA polymerase 与最适化的 buffer 相组合，在使用 SYBR® Green I 的分析检测中，可以最大限度地发挥 KOD 出色的合成能力及不易受粗样品成分抑制的特性。

➔ 注意事项

❶保存条件

经确认本产品反复冻融 10 次对品质没有影响。

❷引物设计

参照 1-4 页引物设计方法。

❸逆转录反应液的加入量

将普通逆转录试剂合成的 cDNA，无需纯化，用灭菌水等稀释后可直接添加到 Realtime PCR 反应液中。添加量不应超过总反应体系的 10%。而使用本公司 ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Code:FSQ-101)、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (Code:FSQ-201)、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code:FSQ-301) (→ 3-8 页) 时，则最多可带入总反应体系 20% 的量。

➔ 相关产品

❶ Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒

ReverTra Ace® qPCR RT Kit	FSQ-101	200 次份	￥1,500	→ 3-10 页
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix	FSQ-201	200 次份	￥2,000	→ 3-8 页
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	FSQ-301	200 次份	￥2,800	→ 3-8 页

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

新一代 THUNDERBIRD 荧光定量 Mix，更快、更准、更方便！

高效率荧光定量 PCR Master Mix

THUNDERBIRD® Next qPCR Mix 系列

THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix Coming soon		
Code: QPX-101T	1ml × 1支	￥325
Code: QPX-101	1.67ml × 3支	￥1,500

THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix		
Code: QPX-201T	1ml × 1支	￥325
Code: QPX-201	1.67ml × 3支	￥1,500

本品是基于 THUNDERBIRD® qPCR Mix (Code No. QPS-101、QPS-201) 进行组分改良后的高效率 Realtime PCR 用 Master Mix（2 x 浓度），相比原产品进一步提高了反应特异性和 PCR 效率，且内含通用规格的 passive reference dye 以及提高可视性的蓝色染料，使用更加便捷。



➔ 特 征

❶更高的特异性

通过优化组分从而降低非特异性反应，进一步提高了低拷贝样本检测时的准确度。

❷更广的可定量扩增区域

通过高效且特异的扩增，可在更广的测定范围进行分析。

❸可进行高速 PCR 循环

由于扩增效率高、快速循环条件下也可高效扩增。

❹高速热启动

采用抗体法热启动的方式，通过加热使抗体迅速失活并释放 DNA 聚合酶活性，所以可设置较短的预变性时间。

❺可均一地检测各种目的片段

使用了新的反应增强剂。将因目的片段不同而导致的 PCR 效率的误差抑制到了最低、可定量长至 500bp 的片段。

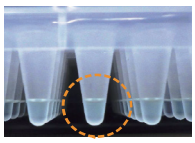
❻可使用 UNG（防污染）

本产品组分中含有 dUTP。通过添加 Uracil-N-Glycosylase(UNG)*，可防止 carryover 污染导致的假阳性。

* 本产品中不含有 UNG。请使用另外销售的 Uracil-DNA Glycosylase(UNG), Heat-labile(Code No. UNG-101)。

❼含有蓝色染料（视觉辅助）

本产品组分中含有蓝色染料。
分装之后的孔呈蓝色，可以减少分装差错。
* 蓝色染料对 qPCR 反应及荧光信号无影响。



❽适用于各种仪器

除了一般的模块型仪器外，还可用于玻璃毛细管型高速循环仪。另外，本产品的组分中含有 passive reference dye，所以需要 passive reference 的仪器 (如：Applied Biosystems 公司的仪器、Agilent Technologies 公司的仪器等) 无需再添加 ROX。

[适用仪器例]:

Applied Biosystems	7300 / 7500 / 7500 Fast / StepOne™ / StepOnePlus™ ViiA™ 7 / QuantStudio®
Roche Diagnostics	LightCycler® 1. x / 2.0 / Nano / 96 / 480
Bio-Rad/MJ	MiniOpticon™ / CFX96 Touch
TaKaRa	Dice / DiceII / Dice Lite / Dice III
QIAGEN	Rotor-Gene Q
BioFlux	Line Gene

➔ 用 途 : 荧光定量 PCR

产品内容:

<QPX-101T, QPX-201T>
qPCR Mix* 1ml × 1 支
(50µl 反应体系使用 40 次)

<QPX-101, QPX-201>
qPCR Mix* 1.67ml × 3 支
(50µl 反应体系使用 200 次)

* 含有 passive reference dye 可兼容不同 qPCR 仪器。蓝色染料只作为加样辅助，不影响定量效果。

保存:

-20°C (避光保存)

※ 在短时间 (3 个月以内) 使用完毕的情况下，可在 2~8°C避光保存。
已确认反复冻融 10 次不会影响定量效果。

备注:

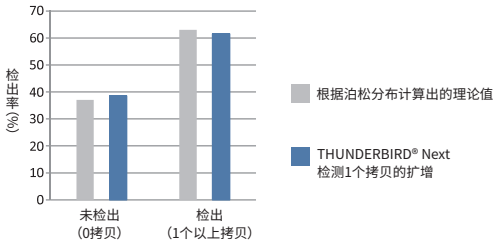
SYBR® 是 Molecular Probes Inc. 的注册商标。
TaqMan® 是 Roche Molecular Systems Inc. 的注册商标。

➔ 结果示例

❶ SYBR® Green Ⅰ检测体系 1 个拷贝的扩增确认

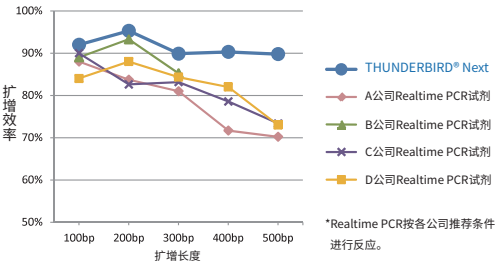
扩增 1 个拷贝的目的片段时，可认为 1 个拷贝的检测数与泊松分布的设定检测数相同。泊松分布的理论值中，0 拷贝数的概率为 37%、1 个以上拷贝数的概率为 63%。

因此，使用 THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix，以稀释的 1 个拷贝的沙门氏菌基因组为模板，N=96 进行检测。结果显示，未检测出的为 38.5%，检测出的为 61.5%，与根据泊松分布推测的检出率相同，这表明检测到了 1 个拷贝相当的模板。



❷ 100 ～ 500bp 长度范围目的片段的扩增

以人工合成的基因为模板，Forward 引物为共用引物，设计扩增长物为 100bp、200bp、300bp、400bp 及 500bp 的 Reverse 引物。使用这些引物，分别用 THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix 及各公司 Realtime PCR 试剂进行 10^7~10^1 拷贝的扩增，比较各扩增长度的 PCR 效率。结果显示，用其他公司的产品时扩增效率低下或不能检测的 400bp 以上的目的片段，使用本产品检测时也未见扩增效率低下。



*Realtime PCR按各公司推荐条件进行反应。

❸ 体系配制过程中 PCR 反应液的稳定性

PCR 反应液中加入引物、模板（HeLa 细胞 total RNA 来源的 cDNA），室温避光温育 48 小时后，进行目的片段的扩增。结果显示，使用本公司原产品及其他公司的产品，室温放置后得到的 Ct 值出现了延迟，但是使用 THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix 扩增时，即使室温放置 48 小时处理后也显示出稳定的性能。黄色标记表示△ Ct 在 0.5 以上。

THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix

目的片段	Ct值(新制备的)	Ct值(48hr后)	△Ct
G3PDH	26.61	26.63	0.02
ACTB	23.72	23.85	0.13
GNB2L1	24.63	24.66	0.03
PBGD	31.36	31.00	-0.36
ABL1	28.69	28.38	-0.31
B2M	23.58	23.56	-0.02
RPL32	24.11	23.97	-0.14
TUBB	31.51	31.05	-0.46

本公司原来的产品

目的片段	Ct值(新制备的)	Ct值(48hr后)	△Ct
G3PDH	30.38	31.17	0.79
ACTB	23.43	23.44	0.01
GNB2L1	24.01	24.68	0.67
PBGD	31.27	31.01	-0.26
ABL1	28.45	30.18	1.73
B2M	22.83	23.05	0.22
RPL32	23.56	24.11	0.55
TUBB	33.64	34.88	1.24

D公司Realtime PCR试剂

目的片段	Ct值(新制备的)	Ct值(48hr后)	△Ct
G3PDH	28.83	29.16	0.33
ACTB	23.45	25.12	1.67
GNB2L1	23.83	24.71	0.88
PBGD	29.95	30.98	1.03
ABL1	28.19	28.75	0.56
B2M	22.65	22.72	0.07
RPL32	23.67	23.42	-0.25
TUBB	31.54	28.12	-3.42

F公司Realtime PCR试剂

目的片段	Ct值(新制备的)	Ct值(48hr后)	△Ct
G3PDH	28.17	30.32	2.15
ACTB	25.02	26.25	1.23
GNB2L1	25.82	26.64	0.82
PBGD	32.35	33.38	1.03
ABL1	30.46	31.23	0.77
B2M	22.65	22.72	0.07
RPL32	25.41	26.11	0.7
TUBB	30.92	31.75	0.83

*各目的片段按N=2进行得到的平均值

基本反应条件：

<SYBR® Green I Assay>

灭菌水	X μl
qPCR Mix	10 μl
Forward Primer	6pmoles
Reverse Primer	6pmoles
UNG [Code No. UNG-101]	0.4U*
DNA 样品	Y μl
Total Volume	20 μl

(UNG* 反应：20 ～ 25°C 10min.)

* 请先确认仪器是否允许设置为 10 秒。

条件以另外销售的 Uracil-DNA Glycosylase(UNG),Heat-labile [Code No. UNG-101] 为例。

Cycle

<2 步法 PCR · 快速循环 >

95°C, 30sec.
↓
95°C , 3sec.
60°C , 10sec.*
40cycles

* 请先确认仪器是否允许设置为 10 秒。

<2 步法 PCR · 常规循环 >

95°C, 30sec.
↓
95°C , 5sec.
60°C , 30sec.*
40cycles

<3 步法 PCR>

95°C, 20~60sec.
↓
95°C , 1~5sec.
55~65°C , 5~30sec.
72°C , 10~60sec.
40 cycles

※Tm 值低于 60°C 或扩增效率较低时请尝试 3 步法。

➔ 相关产品

❶ Carryover 污染应对 • 防止假阳性试剂

Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile	UNG-101	200μl×1 支	¥1,000	→ 2-38 页

❷ Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒

ReverTra Ace® qPCR RT Kit	FSQ-101	200 次份	¥ 1,500	→ 1-23 页
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix	FSQ-201	200 次份	¥ 2,000	→ 1-21 页
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	FSQ-301	200 次份	¥ 2,800	→ 1-21 页

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

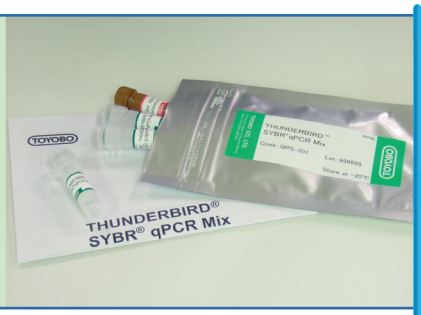
荧光定量 PCR 界的「幸运鸟」诞生。解决可测定区域、特异性等烦恼。

高效率荧光定量 PCR Master Mix　< 以抑制引物二聚体为着眼点开发 >

THUNDERBIRD® qPCR Mix 系列

THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix			THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix		
Code: QPS-101	1.67ml × 3支	￥1,500	Code: QPS-201	1.67ml × 3支	￥1,500

THUNDERBIRD® qPCR Mix 是在 Taq DNA polymerase 基础上开发的高效率 Realtime PCR 用 Master Mix（2 ×浓度）。
适用于以 cDNA、病毒 DNA 等为模板的 Realtime PCR 检测。针对 TaqMan® 探针法及 SYBR® Green Ⅰ染料法，本公司有两种试剂盒可供选择。



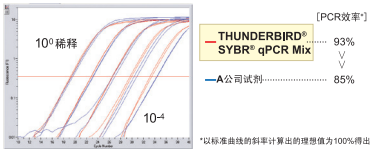
➔ 特 征

❶高特异性（降低引物二聚体）

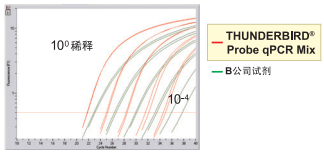
通过对组分的最优化，使得 PCR 的特异性更高。通过降低非特异性反应，使得 SYBR® Green Ⅰ及 TaqMan® Assay 等对低拷贝目的片段的检测灵敏度更高。
（参照结果示例 1）

❷对各种目的片段均可均一地检测

采用了新的增强剂，对各种目的片段 PCR 效率的波动可控制在最小范围内。



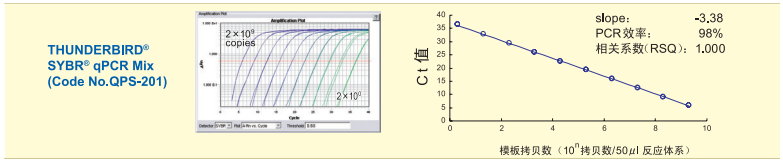
通过 SYBR® Green Ⅰ检测体系对 Norovirus GI cDNA 的检测（使用缩合引物）
（使用 Roche Diagnostics LightCycler® 1.1）

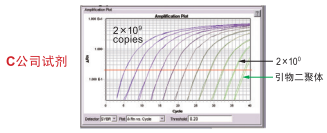


通过 TaqMan® 检测体系对 GAPDH cDNA 的定量
（使用 Roche Diagnostics LightCycler® 1.1）

❸更广的可定量扩增区域

由于产品的高效率、高特异性，可对更广的测定范围进行分析。





通过 SYBR® Green Ⅰ检测体系对质粒模板的检测（使用 Applied Biosystems 7900HT）

❹高适用性（可用于各种仪器）

除适用于普通及高速的模块型（Block Type）仪器外，还适用于使用玻璃毛细管（Glass Capillary Type）的高速循环仪。由于另外添附了 50 × ROX reference dye，对于使用 Passive Reference 的仪器（如 Applied Biosystems 公司制造的仪器、Stratagene 公司制造的仪器），可根据各种仪器的特征把 ROX 调整到最适浓度。

产品内容：

<QPS-101, QPS-201>

qPCR Mix	1.67ml × 3 支
50 × ROX reference dye	250μl
（50μl 反应体系使用 200 次）	

保存：

-20°C（避光保存）
※ 在短时间（3 个月以内）使用完毕的情况下，可在 2~8°C避光保存。

参考文献：

1）R.M.de Breuil et al.,*PCR Methods Appl.*,**3**:57-59 (1993)
2）P.M.Holland et al.,*Proc.Natl. Acad.Sci.USA* **88**:7276-7280.(1991)

备注：

LightCycler® 是 Idaho Technology Inc. 的注册商标。
SYBR® 是 Molecular Probes Inc. 的注册商标。
TaqMan® 是 Roche Molecular Systems Inc. 的注册商标。
ABI PRISM® 是 Applied Biosystems Inc. 的注册商标。

代表的对应仪器

Applied Biosystems	ABI PRISM® 7000
	ABI PRISM® 7700
	Applied Biosystems® 7300
	Applied Biosystems® 7500
	Applied Biosystems® 7500 Fast
	Applied Biosystems® 7900HT
	Applied Biosystems® StepOne
	Applied Biosystems® StepOne Plus
Roche Diagnostics	LightCycler® 1.x/2.0
	LightCycler® Nano
	LightCycler® 480

Bio-Rad/MJ	iCycler iQ,MiniOpticon,CFX96 Touch
Stratagene	Mx3000P
	Mx3005P
	Mx4000
TaKaRa	Thermal Cycler Dice®
BioFlux	Line Gene

*若使用表格中未提到的仪器，欢迎电话垂询。

❺高速热启动

本产品采用了抗 Taq 聚合酶抗体的热启动系统。由于通过升温能使抗体迅速失活，因此预变性时间可以设定为很短。

➔ 用 途：荧光定量 PCR

➔ 说 明

本产品采用了新的增强剂等方法对组分进行了根本性的改良，反应特异性和 PCR 效率得到了飞跃性的提高。通过这些改良，可得到更广的可定量扩增区域(dynamic range)，除适用于普通及高速的模块型(Block Type)仪器外，还适用于玻璃毛细管(Glass Capillary Type)高速循环仪等各种仪器。

➔ 注意事项

❶保存条件

经确认本产品反复冻融 10 次对品质没有影响。

❷引物设计

参照 1-4 页引物设计方法。

❸逆转录反应液的加入量

将普通逆转录反应试剂合成的 cDNA，无需纯化，用灭菌水等稀释后可直接添加到 Realtime PCR 反应液中。

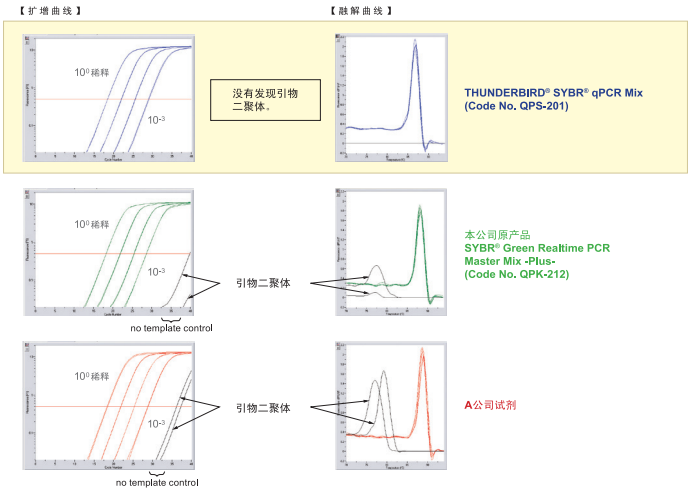
添加量不应超过总反应体系的 10%。使用本公司产品 ReverTra Ace qPCR RT Kit 系列(→ 3-8 页)，可添加最多至 20% 的液量。

➔ 结果示例

❶SYBR® Green Ⅰ检测体系反应特异性的比较

使用可能产生引物二聚体的引物对，对各种 Realtime PCR 试剂的反应特异性进行比较。

引物对用针对人 β-Actin cDNA 的，模板使用本公司高性能逆转录反应用试剂「ReverTra Ace qPCR RT Kit (Code No.FSQ-101)」合成的 HeLa 细胞 Total RNA 来源的 cDNA，对 cDNA 的 10 倍梯度稀释液(4 个梯度)和 no-template control (NTC) 分别进行两次反应。(使用 Roche Diagnostics LightCycler® 1.1)



基本反应条件：

<SYBR® Green Ⅰ Assay>

灭菌水	X μl
qPCR Mix	10 μl
Forward Primer	6pmoles
Reverse Primer	6pmoles
50×ROX reference dye	0.4/0.04 μl*
DNA 样品	Y μl
Total Volume	20 μl

*50×ROX reference dye，是对于使用 Passive Reference 的仪器(如 Applied Biosystems 公司制造的仪器等)，为校正各孔间的荧光强度及分注误差而使用。最适添加量根据仪器不同而不同。不用 Passive Reference 进行校正的仪器无需添加。

Cycle

<2 步法 PCR>

95°C, 20~60sec.
↓
95°C, 1~15sec.
60°C, 30~60sec. ┐ 40 cycles

<3 步法 PCR>

95°C, 20~60sec.
↓
95°C, 1~15sec.
55~65°C, 5~30sec. ┐ 40 cycles
72°C, 30~60sec.

※ 退火温度请设定在引物 Tm~Tm-5°C的范围内。

※ 一般情况下，目的片段在 300bp 以下时，延伸时间 30 秒即可进行充分的反应。但一部分仪器为测定稳定的荧光，延伸时间需大于 30 秒。扩增曲线散乱，或各孔间的差异较大时，请设定较长的延伸时间 (45~60 秒)。

➔ 相关产品

❶Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒

ReverTra Ace® qPCR RT Kit	FSQ-101	200 次份	¥1,500	→ 3-10 页
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix	FSQ-201	200 次份	¥2,000	→ 3-8 页
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	FSQ-301	200 次份	¥2,800	→ 3-8 页

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

高性能、性价比极佳的 Realtime PCR 试剂。

高性能 Realtime PCR Master Mix

Realtime PCR Master Mix 系列

Realtime PCR Master Mix			SYBR® Green Realtime PCR Master Mix			SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-		
Code: QPK-101	1ml × 5支	￥1,500	Code: QPK-201	1ml × 5支	￥1,500	Code: QPK-212	1ml × 5支	￥1,600

本试剂是以 Taq DNA polymerase 为基础开发的通用性很高的 Realtime PCR 用 2×Master Mix。可获得重复性很好的结果。



➔ 特 征

❶高特异性

为抑制非特异性反应，采用了含抗 Taq 单克隆抗体的热启动法。请见(→ 2-5 页)

❷广泛的应用性

可用于 Probe Assay 和 SYBR® Green Assay 等方法。

❸高通用性（可用于各种仪器）

- 因产品中已添加了 Passive Reference，因此可用于需要校正荧光信号的仪器(如 Applied Biosystem 公司的 ABI PRISM® 7700 等)。
- 可应用于使用 Glass Capillary 分析体系的仪器(如 Roche 公司的 LightCycler® 等)。

❹高可靠性 [SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -plus-]

对 Buffer 进行了最优化处理，可抑制 SYBR® Green 分析时出现的引物二聚体等非特异性反应的产生，提高了特异性和重现性。

➔ 用 途：荧光定量 PCR

➔ 说 明

❶各产品的性能、用途等请参照下表。

品 名	用 途	对应Passive Reference	对应Glass Capillary	1 step RT-PCR*	可靠性
Realtime PCR Master Mix	Probe Assay**	○	○	○	☆☆☆
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	SYBR® Green Assay	○	○	○	☆☆☆
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-	SYBR® Green Assay	○	○	-	☆☆☆☆

*逆转录酶 ReverTra Ace (→3-14页) 与 RNase Inhibitor (→3-16页) 组合使用，可进行一步法PCR。

**可用于TaqMan® Probe Assay和Hybridization Probe Assay等。

产品内容：

<QPK-101, QPK-201>

Master Mix 1ml×5 支
(50μl 反应体系可用 200 次，20μl 反应体系可用 500 次)

<QPK-212>

Master Mix 1ml×5 支
Plus solution 1ml×1 支
(50μl 反应体系可用 200 次，20μl 反应体系可用 500 次)

保存：

-20°C（避光保存）

备注：

LightCycler® 是 Idaho Technology Inc. 的注册商标。
SYBR® 是 Molecular Probes Inc. 的注册商标。
TaqMan® 是 Roche Molecular Systems Inc. 的注册商标。
ABI PRISM® 是 Applied Biosystems Inc. 的注册商标。

商品使用文献：

1) Y. Azuma et al., *Biological & Pharmaceutical Bulletin,* **30(4):** 655-660(2007)
2) Hua Wang et al., *J.Bone Miner. Res.***23:**939-948(2008)

网络版追加信息：

- 简要备注
- 实验例

基本反应条件：

<SYBR® Green I Assay>

灭菌水	Xμl
Master Mix	25μl
各引物	10 pmoles each~
DNA 样品	Yμl
Total Volume	50μl

Cycle
95°C , 60sec.
↓
95°C , 15sec.
55~65°C , 15sec. ┐ 40 cycles
72°C , 45sec. ┘

※退火温度请根据引物的 Tm 值在 55~65°C之间调整。
※扩增片段最大如在 200bp 左右，则延伸反应的时间为 45sec. 也没有问题。

➔ 相关产品

❶Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒

ReverTra Ace® qPCR RT Kit	FSQ-101	200 次份	￥1,500	→ 3-10 页
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix	FSQ-201	200 次份	￥2,000	→ 3-8 页
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	FSQ-301	200 次份	￥2,800	→ 3-8 页

对 Illumina 平台二代测序文库进行准确且低偏差的定量。

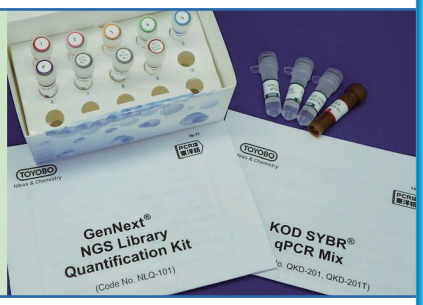
Illumina 公司二代测序仪用文库定量试剂盒

GenNext® NGS Library Quantification Kit

Code: NLQ-101	500次 ￥5,450
Code: NLQ-101S	50次 ￥1,100

※ 表示的是 20μl 反应体系时的使用次数。

GenNext® NGS Library Quantification Kit 是 Illumina 二代测序用的文库定量试剂盒。针对于 Illumina 采用的 P5、P7 接头序列，特异且准确地只定量能够结合在 flow cell 上的文库序列。



➔ 特 征

❶低偏差地准确定量

使用了 KOD SYBR® qPCR Mix，不易受文库 GC 含量及长度影响，无论何种文库都可以正确地定量。使用本试剂盒定量得到的值，可以得到稳定的簇密度。

❷更广的可定量区域

备有从 20 pM 到 0.0002 pM 的 6 个浓度的 Standard DNA，可以在较广的范围内进行准确的定量。

❸简便

本产品含有文库定量必需的全部试剂（qPCR 试剂、Primer Mix、Standard DNA、以及文库稀释 buffer），可以很方便地进行文库的定量。

➔ 用 途：Illumina 公司二代测序用文库的定量

➔ 说 明

GenNext® NGS Library Quantification Kit 是 Illumina 二代测序用的文库定量试剂盒。Illumina 公司 NGS 测序仪上加载的文库量对数据的数量及质量有很大影响。文库量过少，簇密度就较低，得到的测序数据量就比较少。相反，文库量过多，簇清晰度就变差，数据质量就会下降。因此，文库的正确定量就变得非常重要。文库定量的方法有分光光度检测法及荧光测定法，这些测定法中，因为测定的是全部的 DNA，所以不能正确地测定对测序有效的包含 P5、P7 接头的 DNA 的浓度。GenNext® NGS Library Quantification Kit 中，设计了能与 Illumina 公司采用的 P5、P7 序列配对的引物，来进行 qPCR 法分析，能准确定量能够结合在 Flow cell 的文库。另外，因为使用了 KOD SYBR® qPCR Mix（→ 1-13 页），针对长链及 GC 富集的目的片段，也可以稳定进行文库定量。

产品内容：

〈**KOD SYBR® qPCR Mix**〉*
- KOD SYBR® qPCR Mix
- 50×ROX reference dye

〈**Standard & Primer Set**〉
- Standard DNA 1 ～ 6**
- 5×Primer mix
- 50×Dilution Buffer

* 包含一套完整的 KOD SYBR® qPCR Mix (Code No.QKD-201)

** 包含浓度为 20pM、2pM、0.2pM、0.02pM、0.002pM、0.0002pM 的 Standard DNA。

保存：

-20°C

备注：

SYBR® 是 Thermo Fisher Scientific K.K. 的注册商标。

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

➔ 注意事项

❶ 5x Primer Mix、50x Rox reference dye 及灭菌蒸馏水

预先混合到 KOD SYBR® qPCR Mix 里，添加 4μl 文库或 Standard DNA，可配制成能够直接使用的混合液进行保存。

❷ KOD SYBR® qPCR Mix

已确认反复冻融 10 次对品质没有影响。

❸ Standard DNA

不能对 Illumina 以外的二代测序仪器制备的文库进行定量。

基本反应条件：

KOD SYBR® PCR Mix	10μl
50x ROX reference dye	0.4/0.04μl
5x Primer Mix	4μl
Library Sample / Standard DNA	4μl
灭菌蒸馏水	1.6/1.96μl
Total Volume	20μl

PCR 反应条件

98°C , 2min.*1

98°C , 10sec. ┐

65°C , 10sec. ├ 35cycles

68°C , 30sec.*2 ┘

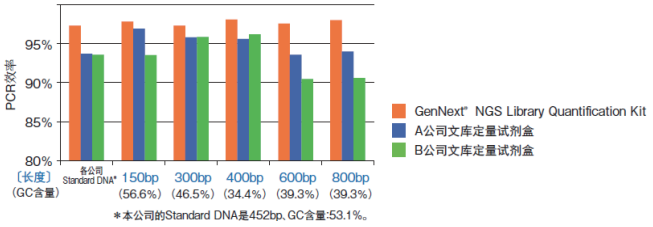
*1 本产品因为使用了抗体，采用了热启动体系，所以请进行 98°C、2min. 的预变性，使抗体失活。

*2 600bp 以上的文库时，请设定为 45 sec.。

➔ 实验例

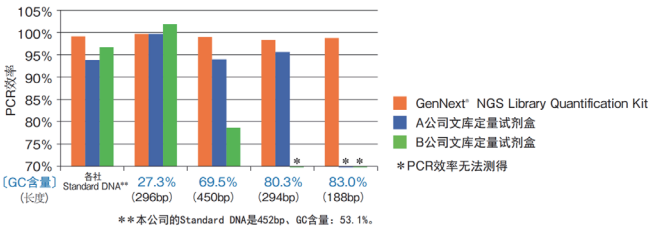
❶ 各种长度的目的片段的 PCR 效率

用各公司的文库定量试剂盒对附加有接头序列的 150~800bp 的模板 DNA 进行分析，比较了 PCR 效率。结果显示，其他公司的文库定量试剂盒随着目的片段长度的变长，可以看到 PCR 效率降低，本试剂盒没有因目的片段长度变化而出现 PCR 效率下降。



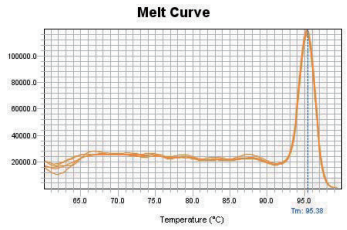
❷ 各种 GC 含量的目的片段的 PCR 效率比较

用各个公司的文库定量试剂盒对附加有接头序列的各种 GC 含量的模板 DNA 进行分析 ，比较 PCR 效率。结果显示：其他公司的文库定量试剂盒在定量 GC 含量高的目的片段时，如融解曲线分析图所示，不能确认目的片段的扩增，PCR 效率也不能测定。另一方面，使用本试剂盒可特异地扩增全部的目的片段，而且各目的片段的 PCR 效率误差也最小。通常，含有 CpG 的启动子区域或嗜热菌等细菌中 GC 含量比较高。在对其进行文库定量时，使用不易受 GC 影响的本产品就可以正确地进行定量。

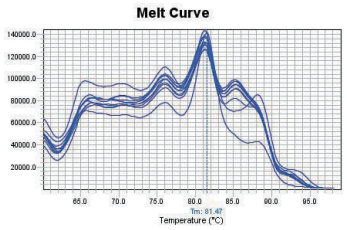


【GC 含量 83.0%的目的基因的融解曲线】

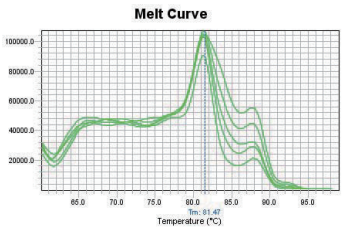
GenNext® NGS Library Quantification Kit



A 公司文库定量试剂盒



B 公司文库定量试剂盒



➔ 相关产品

❶ 高效率 SYBR® Green Ⅰ检测用实时荧光定量 PCR 试剂

KOD SYBR® qPCR Mix	QKD-201T	1ml×1 支（40 次）	￥500	→ 1-13 页
	QKD-201	1.67ml×3 支（200 次）	￥2,450	→ 1-13 页

简便·低成本地构建高质量 Illumina 二代测序平台兼容的 DNA 文库。

Illumina 公司二代测序仪用文库构建试剂盒

GenNext® NGS Library Prep Kit

Code: LPK-101T	8次份	￥2,100
Code: LPK-101	24次份	￥4,100
Code: LPK-101L	96次份	￥12,600

※ 表示的是使用 50μl 片段化 DNA 时的使用次数。

GenNext® NGS Library Prep Kit 可从片段化的双链 DNA 或 PCR 产物开始，制备 Illumina® 公司 NGS 测序用文库。使用本产品，可简便且迅速地制备文库。
Input 的 DNA 量少，需要扩增文库时，可使用基因改良型 KOD DNA polymerase 开发的高保真性 PCR 酶，低偏差地扩增末端带有 Adapter 序列的文库。



➔ 特 征

❶简便且快速的操作流程

从末端修复及 3' 末端加 A 到 Adapter 连接操作都在同一个反应容器中进行。末端修复及 3' 末端加 A 进行 15 分钟，Adapter 的连接需要 15 分钟即完成。文库扩增时使用退火 10 秒、延伸 15 秒的循环即可进行反应。

❷范围较广的 input 量

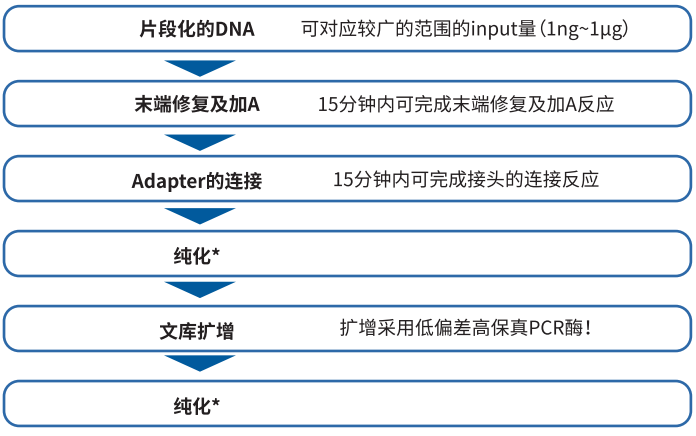
对应较广范围的 input 量（1ng ~ 1μg）进行的设计。

❸低偏差的文库扩增文库扩增

文库扩增时使用的 Library Amplification Master Mix 是使用基因改良型 KOD DNA polymerase 进行开发的高保真 PCR 酶。因 GC 不均导致的影响降到了最低、可均一地扩增各种片段。

➔ 用 途 : Illumina 公司二代测序用文库的制备

➔ 基本流程



*本产品中不含有Adapter与纯化用磁珠。

产品内容：

〈LPK-101〉

End Repair and A-tailing Buffer	240 μl
End Repair and A-tailing Enzyme	60 μl
Ligation Solution	1.2 ml
Library Amplification Master Mix	690 μl
Library Amplification Primer Mix	138 μl

* 本试剂盒不含有 Adapter 以及纯化用磁珠。

保存：

-20°C
※ 如果需要长期保存，请存放于 -30°C。

备注：

Illumina®、TruSeq™ 是 Illumina Inc. 的注册商标。
MultiNA® 是岛津制作所的注册商标。

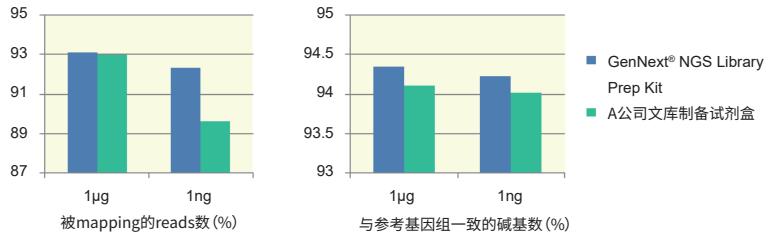
TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

➔ 实验例

❶NGS 评价文库制备试剂盒

使用 MiSeq（Illumina 公司）及 MiSeq Reagent Kit v2（300 Cycles）（Illumina 公司）进行大肠杆菌基因组（1μg PCR Free 或 1ng 用 12 循环进行扩增）的 NGS 分析。文库的制备使用 GenNext® NGS Library Prep Kit 或 A 公司文库制备试剂盒进行。文库数据为了与 read 数相等，进行 down sampling，各样品收集 100 万 read 数，进行分析。分析是使用 CLC Genomics Workbench（QIAGEN 公司 / CLC bio）进行的。

结果显示，使用 GenNext® NGS Library Prep Kit 比使用其他公司的试剂，得到了更好的 mapping 效率与更低的错误率。

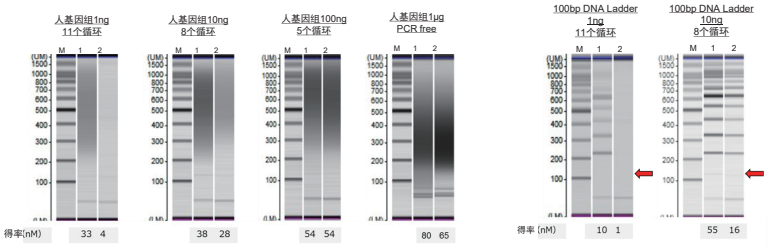


❷文库得率及分布的比较

以片段化处理过的人基因组 DNA 1、10、100ng、大肠杆菌基因组 DNA 1μg、以及 100bp DNA Ladder 1、10ng 开始，使用 GenNext® NGS Library Prep Kit 或 A 公司文库制备试剂盒进行文库的制备。

Adapter 是使用 Illumina 公司的 Index Adapter，文库的 cleanup 是使用 Agencourt AMPure XP 的试剂 (Beckman Coulter)。

1μg 没有扩增、1ng 用 11 个循环、10ng 用 8 个循环、100ng 用 5 个循环进行扩增，文库 size 的分布用 MultiNA®（岛津生产公司）的产品进行确认。文库的得率用 GenNext® NGS Library Quantification Kit(Code: NLQ-101) 进行确认。



进行文库 size 分布的确认时，用本公司 GenNext® NGS Library Prep Kit 和 A 公司试剂时，结果相同；低 input 量时，使用 GenNext® NGS Library Prep Kit，与使用 A 公司的试剂相比，可得到较高的得率。所有文库均得到了 4nM 以上的得率，都满足 MiSeq 平台上机条件。

➔ 相关产品

❶ Illumina 公司 NGS 用文库定量试剂盒

GenNext® NGS Library Quantification Kit	NLQ-101	500 次份	￥5,450	→ 1-22 页

使用 [RamDA-seq™ 技术] 从单细胞或微量 RNA 中获得高质量 cDNA！

NGS 分析 / Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒

GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit

GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit	Code: RMD-101T	24次份	￥15,000
	Code: RMD-101	96次份	￥53,000
RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit	Code: RMD-201T	24次份	￥7,500
	Code: RMD-201	96次份	￥26,500

NSR Primer

Code: NSR-101	96次份	￥3,000
Code: NSR-102	96次份	￥3,000

RamDA Cell Lysis Kit

Code: RMD-301	1,152次份	￥2,000

本产品是从单细胞或微量 RNA 中合成高质量 cDNA 的试剂盒。其中 RamDA-seq™ Single Cell Kit 的产物用于 full-length total RNA-seq 文库制备，RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit 的产物作为 Realtime PCR 的模板进行高灵敏度的基因表达分析。由于采用了 RT-RamDA™ 技术，本产品不仅能覆盖 poly(A) RNA，而且能高灵敏度地合成 non-poly(A) 来源的 cDNA。相比原来的方法能检测到更多基因。



➔ 特 征

❶可使用单细胞及微量 RNA

可以使用 1~100 个细胞或者 10pg~1ng total RNA 作为起始模板制备 cDNA。

❷可以制备全长 cDNA

现有的只使用 Oligo-dT 引物的方法难以分析 10kb 以上的 RNA，使用本产品可以制备出测序 reads 覆盖全长 RNA 的 cDNA。

❸除了 poly(A) RNA，还可检测出 non-poly(A) RNA

借助 NSR(Not so random) 引物，可检测到用现有方法难以检测的 non-poly(A) RNA。

❹相比原来技术，检测到的基因数大大提高了

可检测组蛋白 RNA、lncRNA、pre-mRNA、circRNA 等各种类型的 RNA。

➔ 说 明

RamDA-seq™ 是由日本理化学研究所·生命机能科学研究中心·生物信息学研究开发小组研发的「Random Displacement Amplification Sequencing」技术。现有的只使用 Oligo-dT 引物的技术无法覆盖 non-poly(A) RNA，并且由于逆转录可能出现的延伸中止，要得到全长数据比较困难。random 或 NSR 引物可以从 RNA 全部位置引导 cDNA 合成，从而消除了 poly(A) RNA 的限制，更容易得到 RNA 全长 reads。此外，RamDA-seq™ 法在 cDNA 合成的同时完成扩增，无需额外引入 adapter，也无需 PCR 反应，从而降低偏差。

*NSR 是 Not so random 的缩写，NSR 引物是指为抑制 rRNA 逆转录成 cDNA，利用计算机算法将 18S, 28S RNA 相关的序列剔除后的随机引物。建议 NSR Primer Set for human (NSR-101) 用于人源样本，NSR Primer Set for mouse(NSR-102) 用于鼠源样本。

产品内容：

〈RMD-101〉

Lysis Buffer	480µl
Lysis Enhancer	108µl
RNase Inhibitor	22µl
Nuclease free water	960µl
RT-RamDA™ Buffer	240µl
RT-RamDA™ Enzyme Mix	54µl
RT-RamDA™ Primer Mix	54µl
gDNA Remover	54µl
2nd strand synthesis Buffer	330µl
2nd strand synthesis Enzyme	55µl
2nd strand synthesis Primer Mix	275µl

〈RMD-201〉

Lysis Buffer	480µl
Lysis Enhancer	108µl
RNase Inhibitor	22µl
Nuclease free water	960µl
RT-RamDA™ Buffer	240µl
RT-RamDA™ Enzyme Mix	54µl
RT-RamDA™ Primer Mix	54µl
gDNA Remover	54µl

※对于文库制备，除本产品外，还需要磁珠（Beckman Coulter 公司的 Agencourt AMPure XP）以及文库制备试剂（Illumina 公司的 Nextera XT DNA Sample Preparation Kit）。

※本试剂盒不包含 NSR Primer。建议 NSR Primer Set for human(NSR-101) 用于人源样本，NSR Primer Set for mouse(NSR-102) 用于鼠源样本。

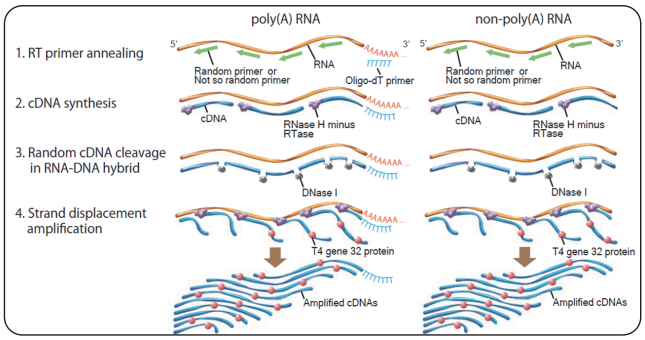
保存：

-20°C

备注：

RamDA-seq™、RT-RamDA™ 是日本理化学研究所的注册商标。

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

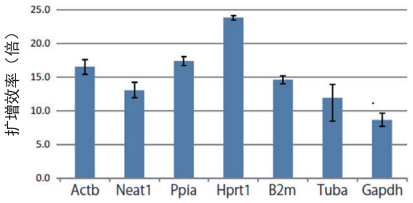


➔ 实验例

❶cDNA 扩增效率的验证

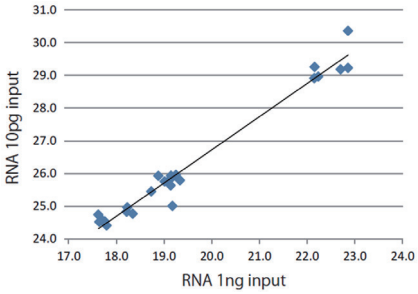
由 NIH3T3 Total RNA 10pg 开始，分别用以前的试剂及 RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit 制备 cDNA，通过 THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix[Code No. QPS-201] 进行 Realtime PCR。结果显示，RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit 得到的 cDNA 量是以前试剂得到的 cDNA 量的 9 倍以上。

$$\text{扩增效率} = \frac{\text{RT-RamDA™ 得到的cDNA}}{\text{原来逆转录试剂得到的cDNA}}$$



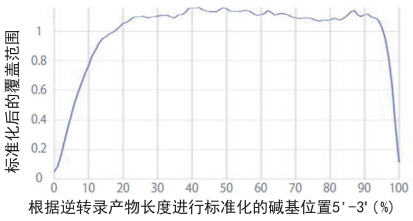
❷input RNA 使用量的验证

分别使用 10pg 和 1ng NIH3T3 Total RNA，用 RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit 制备 cDNA，通过 Realtime PCR 比较 8 个基因（N=3）的 Ct 值。结果显示，10pg 的 input 量和 1ng 的 input 量具有高度相关性，即使是微量模板也可高效制备 cDNA。



❸覆盖范围均一性的验证

以 10pg mES total RNA 开始，使用 GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit 制备 cDNA，合成双链 DNA 后构建文库，使用 illumina MiSeq 仪器进行 NGS 分析。结果显示，制备的文库基本覆盖了全部基因。

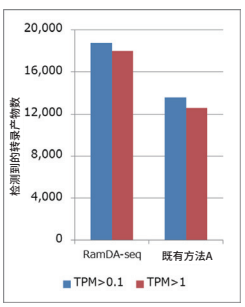


❹可检测基因数的比较及各类 RNA Reads 数的验证

以 10pg mES total RNA 开始，使用我司 GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit 搭配 NSR Primer Set for mouse 与 A 公司的同类试剂盒同时制备 cDNA、并进行 NGS 分析。我司产品无需进行 cDNA 扩增，而 A 公司试剂盒进行了 18 个循环的 PCR 扩增。随后，使用 Nextera XT DNA Sample Preparation Kit 进行文库制备，测序使用 illumina MiSeq 仪器。结果显示，与 A 公司的试剂盒相比，GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit 可以多检测出大约 5000 个以上的基因。

Percentage of reads(%)	RamDA-seq™		A公司试剂盒	
Mapped reads	90.9	86.1	89.5	90.8
rRNA+mitochondria	24.0	23.0	9.0	9.9
CDS	27.8	26.3	41.9	41.5
UTR	16.5	15.8	21.9	22.3
Introns	16.2	14.8	9.1	9.0
Intergenic regions	6.4	6.2	7.6	8.0
Number of transcripts TPM*>0.1	18,984	18,465	13,500	13,721
Number of transcripts TPM*>1	18,338	17,629	12,575	12,616

* 各试剂中，N=2进行实验，将read 数标准化并进行分析
* 黄色格子中的数值不是%而是个数
* TPM (Transcripts Per Million)：针对各逆转录产物的read计数，将基因长度标准化为1,000bp，并且各样品的总read数全部校准为100万时的数值。



荧光定量 PCR (qPCR) 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 qPCR 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	类型	一步法	热启动	Passive reference	玻璃毛细管	特异性	效率	长片段扩增	高 GC 目的片段	粗样品扩增	页面
THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix	Probe		√	√	√	+++	+++	++	++	+	1-17
THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix	SYBR®		√	√	√	+++	+++	++	++	+	1-17
Realtime PCR Master Mix	Probe		√	√	√	+++	++	+	+	+	1-21
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (-Plus-)	SYBR®		√	√	√	+	++	+	+	+	1-21
THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix	Probe		√	√	√	+++	++	+	+	+	1-19
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix	SYBR®		√	√	√	++	++	+	+	+	1-19
RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix	Probe	√	√	√	√	+++	++	+	++	++	1-12
RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	SYBR®	√	√	√	√	++	++	+	++	++	1-12
THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Mix	Probe	√	√	√	√	+++	++	+	++	++	1-8
KOD SYBR® qPCR Mix	SYBR®		√	√	√	++	++	+++ (<2kb)	+++	+++	1-13

「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

➔ (2-26 页)

- KOD -Multi & Epi-®

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 polymeras （以下称 KOD）为代表的从超嗜热 Archaea 中分离出来的聚合酶，归为 family B（α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。

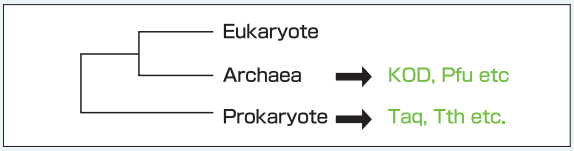


图1 PCR酶的分类

表1 α型PCR酶的特性

Family B（α型）：KOD, Pfu etc.	
来源: Archaea	
3'→5' Exonuclease活性（校正活性）	+
5'→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'→5' Exonuclease活性（校正活性）	-
5'→3' Exonuclease活性	+
TdT活性	+

（2）关于 Exonuclease 活性

α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'→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）的缘由。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'→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® Assay（图 3）。

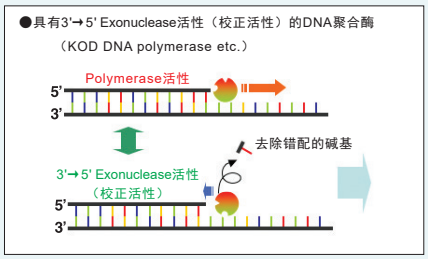


图2 聚合酶活性与校正活性

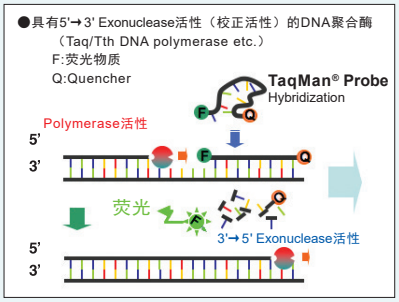


图3 TaqMan® Assay的原理

（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「即便追加碱基 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 ≥ 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 α 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

α 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α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 α 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。

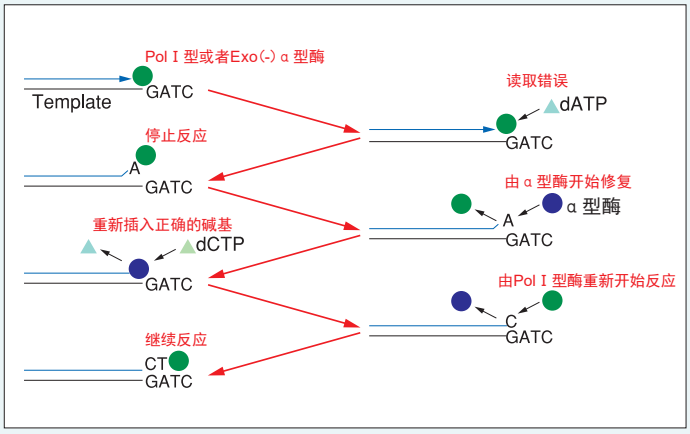


图5 使用混合型酶进行高效率PCR酶的原理

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。

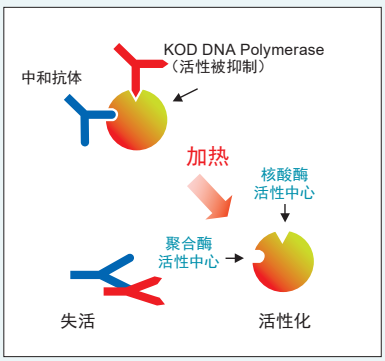


图6 HotStart法原理（例：KOD -Plus-）

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。

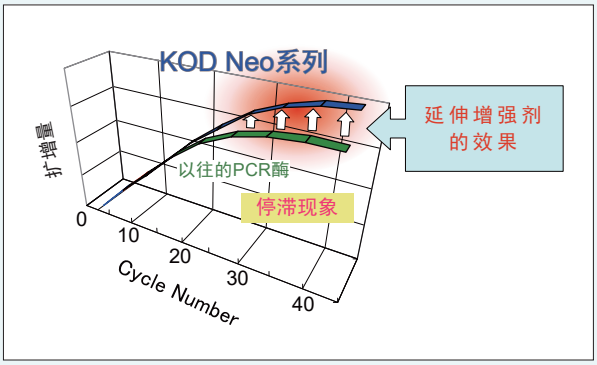


图7 延伸增强剂的效果

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。

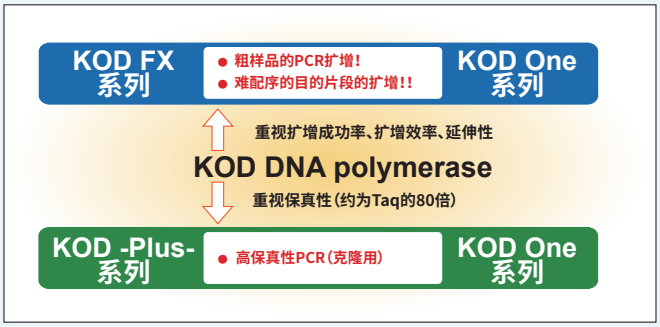


图8 用KOD DNA polymerase的试剂

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 系列的技术两点，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



图9 Mouse tail的前处理方法



图10 植物样品的前处理方法

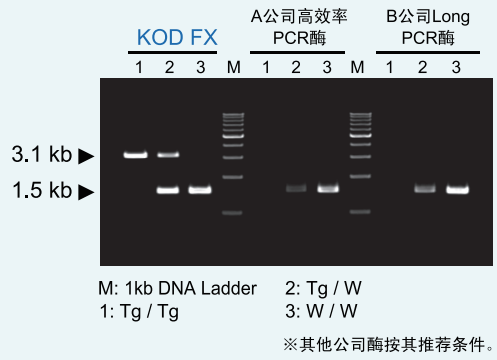


图11 鼠尾裂解液的PCR结果

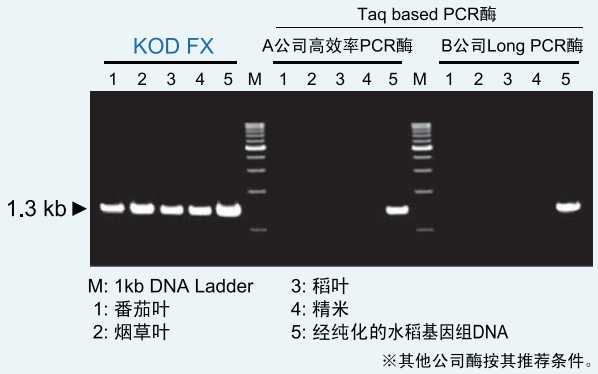


图12 各种植物样品裂解液直接PCR

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。

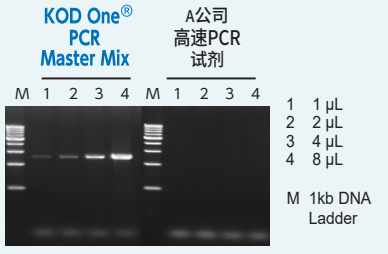


图13 不同模板量的鼠尾裂解液直接PCR

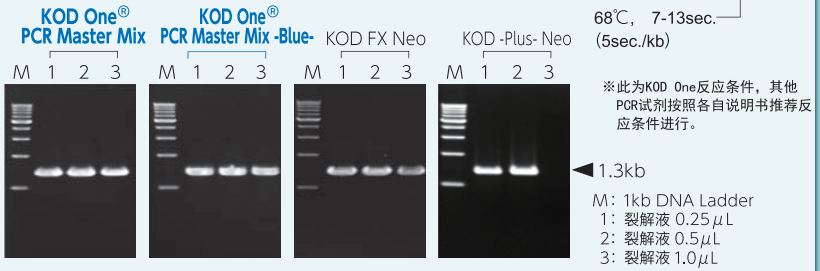


图14 不同模板量的烟草叶裂解液直接PCR

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，将果酱的悬浊液添加到 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）。

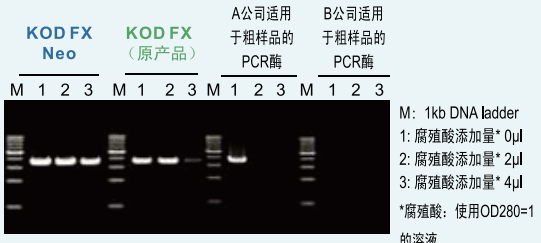


添加的PCR抑制剂：
在0.3g草莓果酱中添加100μl的TE buffer, 离心后添加上清。

Template：10ng 人基因组DNA
Target：Human β-globin 1.3kb

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

图15 果酱（食品）添加实验例



【循环条件】
94℃, 2min.
98℃, 10sec.
68℃, 4min.
30 cycles
4℃, Hold

Template：10ng 人基因组DNA
Target：Human β-globin 3.6kb

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，我们建议事前先用原来的方法作一下比较）。

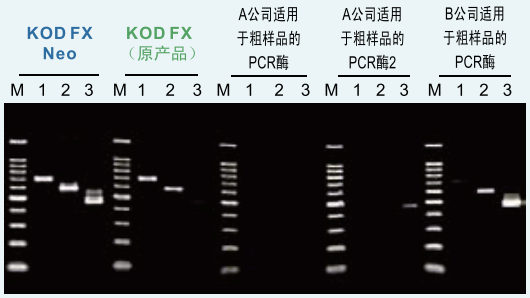
另外，用碱裂解法配制得到的上清，使用各种扩增试剂，用 3 种通用引物进行 rDNA 扩增，结果显示，KOD FX Neo 的结果是最好的（图 18）。



【循环条件】
94℃ 2min.
98℃ 10sec.
55℃ 30sec.
68℃ 1min.
24~26 cycles
4℃ Hold

M：1kb DNA ladder
1：碱裂解法［24 cycles］
2：一步法［24 cycles］
3：CTAB法（原方法）［26 cycles］

图17 对土壤进行粗提的效果分析



【循环条件】
94℃ 2min.
98℃ 10sec.
X℃ 30sec.
68℃ 30sec.
Y cycles
4℃ Hold

1 X: 50℃ Y: 23 cycles
2 X: 60℃ Y: 33 cycles
3 X: 65℃ Y: 33 cycles

M：1kb DNA ladder
1：原核生物来源的 rDNA（700 bp）
2：*Bacillus sp.*来源的 rDNA（600 bp）
3：高 G/C 革兰氏阳性菌来源的rDNA（550 bp）

图18 用土壤样品进行PCR效率的比较

【引物】

Fwd: GTTTGATCCTGGCTCA
Rev: TACCAGGGTATCTAATCC

【引物】

1 Fwd ATTAGATACCCTDGTAGTCC
Rev TACCTTGTTACGACTT
2 Fwd AGGGTCATTGGAAACTGGG
Rev CGTGTTGTAGCCCAGGTCATA
3 Fwd GGCCTTCGGGTTGTAAACC
Rev CTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGC

【碱裂解法】

土壤100 mg
↓←50 mM NaOH 180μl
↓ Vortex充分搅拌混匀
↓ 95℃, 10 min. 温育
↓←1 M Tris-HCl (pH8.0) 20μl
↓ Vortex充分搅拌混匀
↓ 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充分搅拌混匀
↓ 95℃, 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）

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。

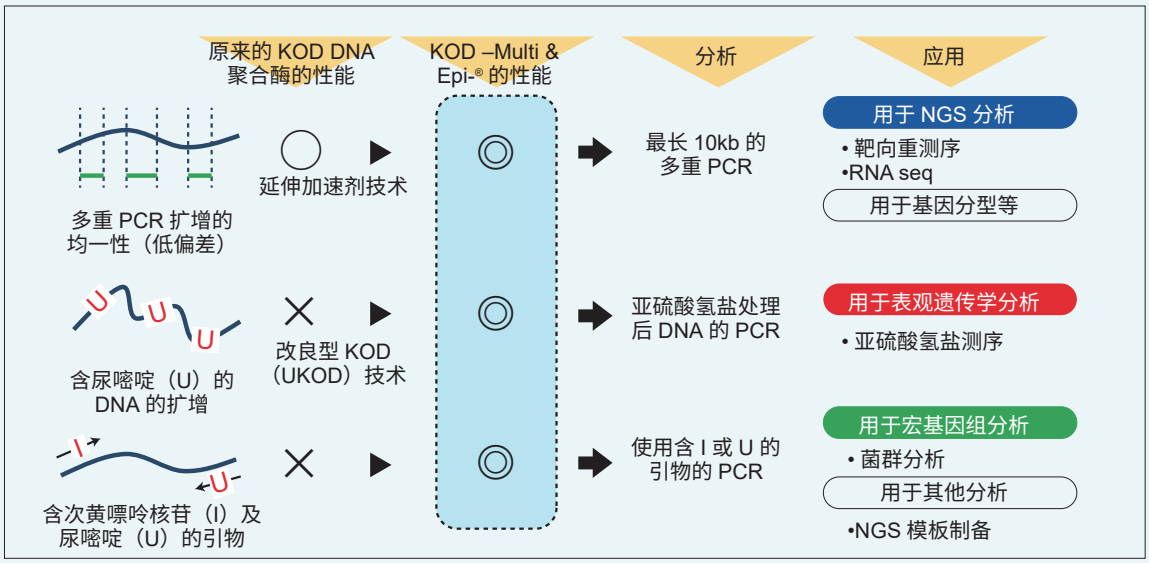


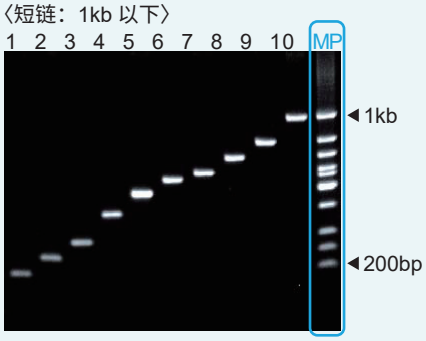
图 19 KOD -Multi & Epi-® 的性能与应用范围

（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。

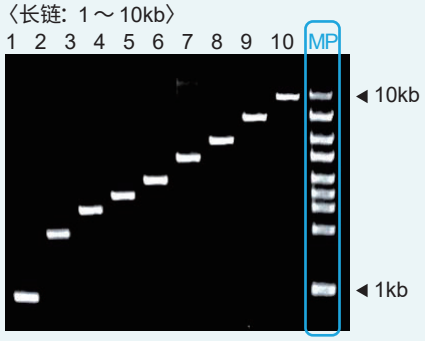
结果显示，即使在多重 PCR 中，也显示出像单重 PCR 效率那样偏差小的良好的扩增效果。

〈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

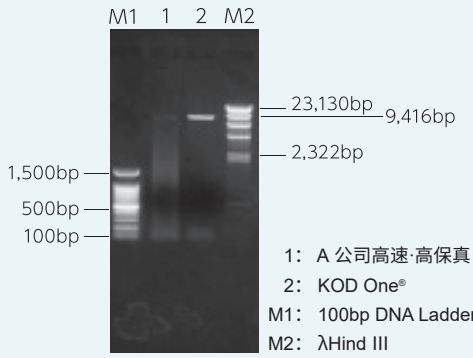
（2）亚硫酸氢盐 PCR

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。

结果・考察

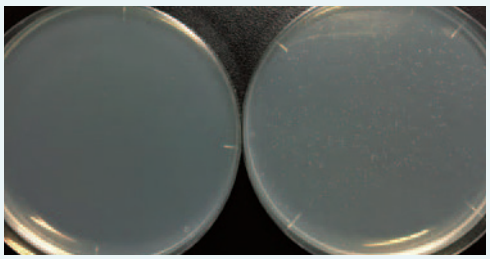


1：A 公司高速·高保真 PCR Master Mix
2：KOD One®
M1：100bp DNA Ladder
M2：λHind III

【循环条件】
98℃， 10sec.
55℃， 15sec.
72℃， 40sec.
30cycles

A 公司高速·高保真 PCR Master Mix

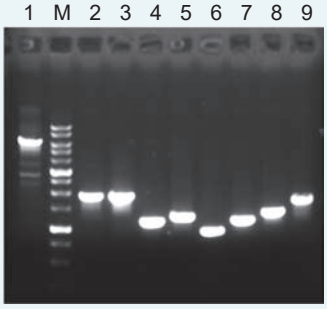
KOD One®



用 2μL PCR 产物直接对大肠杆菌 DH5α 进行转化

图 21 难扩增表达载体通过 PCR 法导入突变的实验例

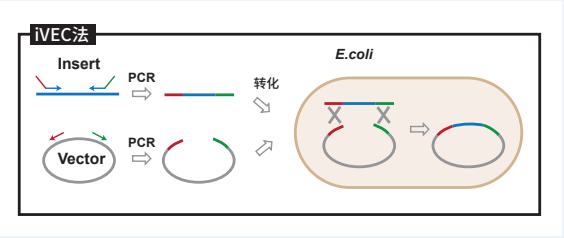
以下实验例介绍了 iVEC 法快速替换载体上的插入基因。8 个转化后的菌株各挑取一个克隆进行检测，结果显示，8 个克隆中有 7 个转化成功。从 PCR 开始到转化后涂板只需要 2 个小时即可完成。保证置换成功的关键点包括：设计合适的引物，使得既能高效扩增载体和目的片段，也保证了有足够的 overlap 区域以提高二者融合的几率。其次是高质量的载体 PCR 扩增。进行实验之前可以针对载体扩增优化反应条件和体系，以提高实验成功率。



【循环条件】
98℃， 1min
96℃， 10sec.
55℃， 10sec.
72℃， 10~35sec.
25cycles

1：vector（约 6kbp）
M：1kbp DNA Marker
2～9： insert（1kbp～2kbp）

图 22 载体和待插入片段电泳结果



PCR 之后，向 5μL 反应液中添加 0.1μl 的 *Dpn* Ⅰ
↓
37℃ 40 分钟 (这期间进行电泳)
↓
1.5μL 载体与 1μL 基因混合，
再与 12μL 的 iVEC3 感受态细胞混合
↓
冰浴 20 分钟
↓
添加 400mL 的 LB 培养基，37°C静置 60 分钟
↓
离心 (12,000xg 30 秒)，回收菌体，弃上清
↓
用 10μL 的 10mM Tris-HCl(pH8.0) 重悬，然后涂板
↓
次日在板上挑取克隆，使用 KOD One 进行菌落 PCR

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	*Thermococcus kodakaraensis* KOD1	*Thermococcus kodakaraensis* KOD1(Mutant)	*Thermus aquaticus*	*Thermus Thermophilus* HB8
各温度下活性半衰期	12hr.(95℃) 3hr.(100℃)	12hr.(95℃) 3hr.(100℃)	1.6hr.(95℃)	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	×

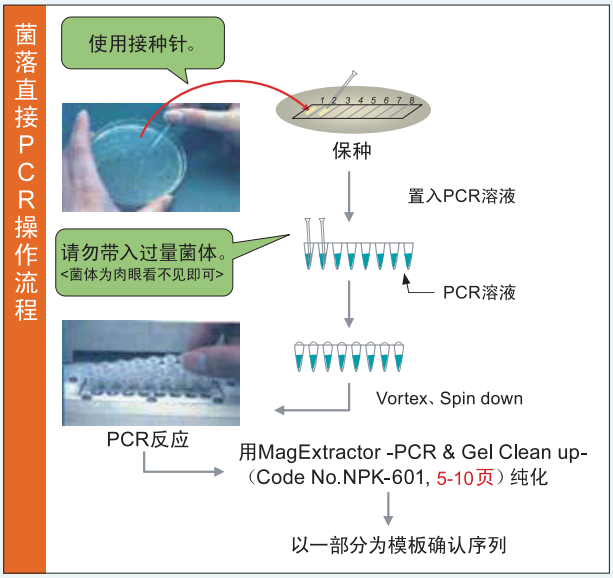
* 处理粗样品时的设定
※ 保真性是利用 rpsL 基因方法测定值计算的结果。[H.MO et al., *J.Mol.Biol.* **222**:925-936(1991)]

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® HS DyeMix（→2-31 页）等。使用该些酶进行菌落直接 PCR 的实验步骤如下所示。另外以 KOD Dash 为基础开发的 InsertCheck -Ready- 是为菌落直接 PCR 专用而开发的的预混合试剂，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®

	（1份样品）	（　）份样品
灭菌水	21.9（μl）	（　）□
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30μl分装

94℃ 4min → ×30 cycles [94℃ 30sec → A℃ 30sec → 72℃ B min（1kb/1min）]（Tm-5～10℃）

KOD Dash®

	（1份样品）	（　）份样品
灭菌水	23（μl）	（　）□
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30μl分装

94℃ 4min → ×30 cycles [94℃ 30sec → A℃ 5sec → 72℃ B sec（1kb/30sec）]（Tm～Tm-5℃）

Quick Taq® HS DyeMix

	（1份样品）	（　）份样品
灭菌水	13.8（μl）	（　）□
Quick Taq HS DyeMix	15	（　）□
Forward primer（10pmole/μl）	0.6	（　）□
Reverse primer（10pmole/μl）	0.6	（　）□
	30（μl）	每30μl分装

94℃ 2min → ×30 cycles [94℃ 30sec → A℃ 30sec → 68℃ B sec（1kb/30sec）]（Tm-5～10℃）

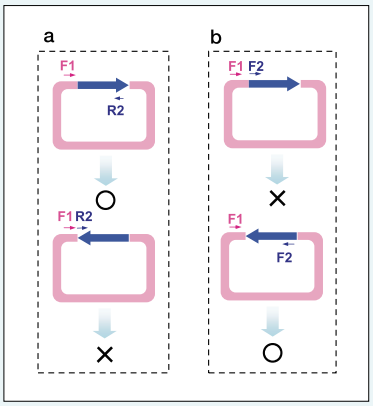


图 24 通过 PCR 进行方向性的确认
将引物设计为一条在载体上，一条在插入片段上进行 PCR。可通过 a 或 b 的组合得到的扩增图形确认方向性。

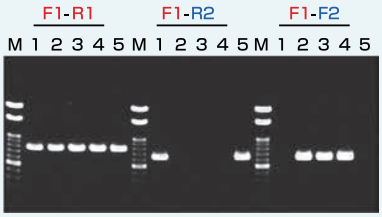


图 25 菌落直接 PCR 法例
将 0.5kb 的 PCR 产物进行 TA 克隆后，如图 13 所示与各种引物组合进行菌落直接 PCR。R1 为设计在载体上的反向引物。

（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 ™ -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/50μl*	1U/50μl*	1U/50μl*	1U/50μl*	1U/50μl*
最适条件 / 产品名	**Taq / Tth**	**Blend Taq®**	**KOD One®**	**KOD Dash®**	**KOD -Multi & Epi-®**
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/50μl	1.25U/50μl	-	1.25 ～ 2.5U/50μl	1.25 ～ 2.5U/50μl

*: 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 中的逆转录反应液的量在 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 50μl

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® PCR Master Mix 系列

KOD One® PCR Master Mix		
Code：KMM-101S	10次份	￥100
Code：KMM-101	200次份	￥2,000

KOD One® 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® 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

❶高速 PCR

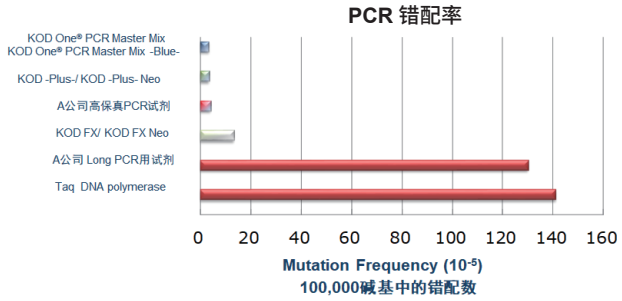
延伸时间设为 1 秒即可扩增 1kb 的片段，10kb 以内延伸速度为 5 秒 /kb，高于 10kb 的片段设为 10 秒 /kb，缩短延伸时间可大幅提高 PCR 实验的总耗时。

❷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® 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。

❸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 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。

❹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。

❺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-®（Code No. KME-101）具有类似的扩增能力。

➔ 用 途 : PCR

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

➔ 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。

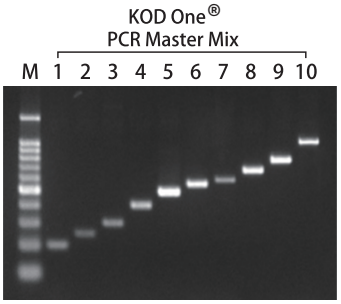
➔ 实验例

❶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。

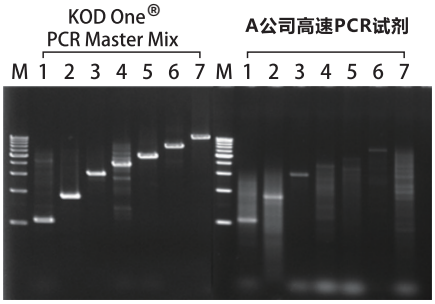
< 反应液 >		<PCR 循环 >	<PCR 循环 >
灭菌水	21 μl	1kb 以下的目的片段	1 ～ 10kb 的目的片段
KOD One® PCR Master Mix 系列	25 μl	98°C 10sec.	98°C 10sec.
10pmol/ μl primer F	1.5 μl	60°C 5sec.	60°C 5sec.
10pmol/ μl primer R	1.5 μl	68°C 1sec.	68°C 5sec. /kb
10ng/ μl 人基因组 DNA	1 μl	X30 cycles	X30 cycles
Total volume	50 μl	Template：人基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

[1kb以下：延伸时间1sec]



M： 100bp DNA Ladder
1： DDB2(200bp)
2： FANCG(250bp)
3： H8g(300bp)
4： CDH1(400bp)
5： chrome9(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)

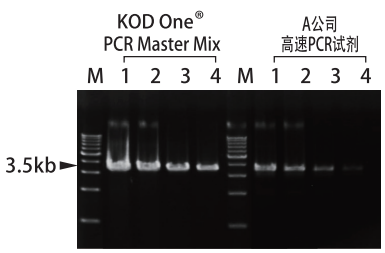
❷扩增效率和灵敏度的验证

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。

< 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
各模板 DNA	1 μl
Total volume	50 μl

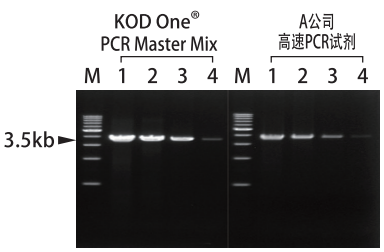
<PCR 循环 >
98°C 10sec.
60°C 5sec.
68°C 18sec. (5sec/kb)
X30 cycles

[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：

反应液组成

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)
Total Volume	50μl

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。

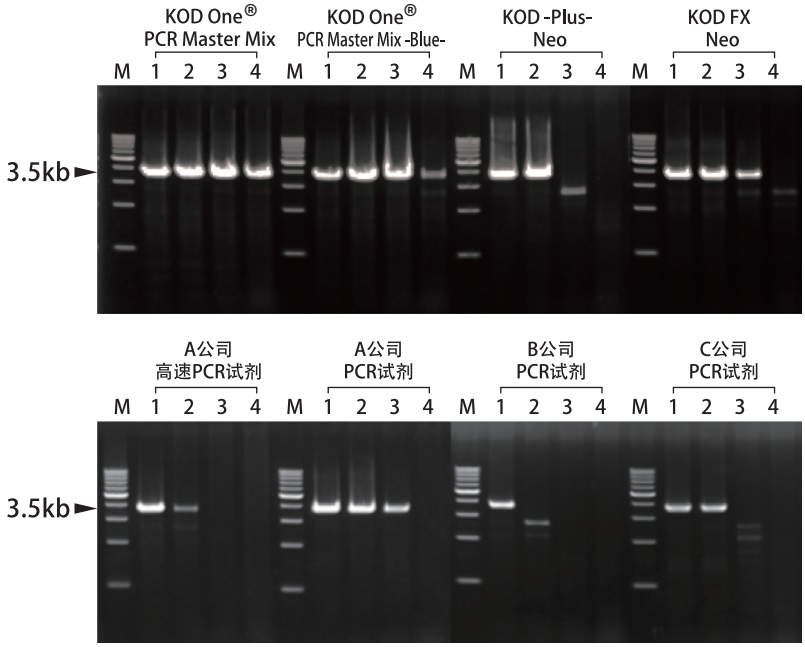
❸逆转录反应液（cDNA）作模板时添加量的探讨

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 μl
KOD One® PCR Master Mix 系列	25 μl
10pmol/ μl primer F	1.5 μl
10pmol/ μl primer R	1.5 μl
cDNA	5 μl
Total volume	50 μl

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



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)

❹粗样本的扩增例

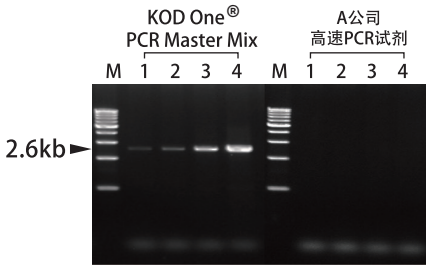
使用 KOD One® PCR Master Mix，比较血液、鼠尾裂解液（碱裂解液）的扩增结果。反应根据各 PCR 酶推荐条件进行，延伸时间 5 sec./ kb。结果显示，只有 KOD One® PCR Master Mix 能够得到明确的条带。

< 反应液 >

灭菌水	Y μl
KOD One® PCR Master Mix 系列	25 μl
10pmol/ μl primer F	1.5 μl
10pmol/ μl primer R	1.5 μl
各模板 DNA	X μl
Total volume	50 μl

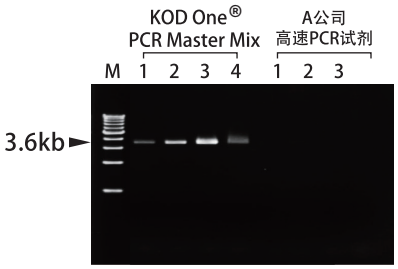
<PCR 循环 >
98℃ 10sec.
60℃ 5sec.
68℃ 5sec. (5sec/kb) ← X30 cycles

［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 μl 2:2 μl 3:4 μl 4:8 μl

［血液直扩实验］



全血
M: 1kb DNA Ladder
1:1 μl 2:2 μl 3:4 μl 4:8 μl

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

❺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。

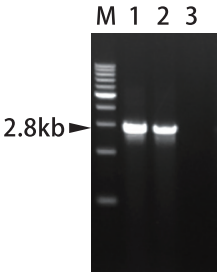
< 反应液 >

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℃ 10sec.
60℃ 5sec.
68℃ 15sec.
X30 cycles

<Primer 配列 >
Fwd：ATGGTICARATHCCICARAAY
Rev：RTGIGCYTGRTCCCARTTYTC

* 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。



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

❻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。

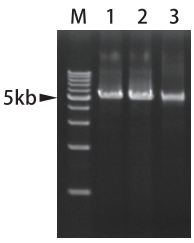
< 反应液 >

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℃ 10sec.
60℃ 5sec.
68℃ 25sec. (5sec/kb)
X15 cycles

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

◯ 突变导入后电泳确认



M ： 1kb DNA Ladder
1 ： 3碱基替换
2 ： 3碱基缺失
3 ： 3碱基插入

◯ 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 碱基替换	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 5′-ATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3′

需要导入的变异

碱基替换 ATG→TGC 5′-ATGCATGCATGCATGCATGCTGCCATGCATGCATGCATGCATGC-3′

碱基缺失 ATG 消除 5′-ATGCATGCATGCATGCATGC……CATGCATGCATGCATGCATGC-3′

碱基插入 ATG 前加上 AAA 5′-ATGCATGCATGCATGCATGCAAAATGCATGCATGCATGCATGC-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′-ATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3′

5′-TGCATGCATGCATGCTGCCATGCATGCATGCAT-3′ ⇨ 替换用Fwd Primer
（12~20bp + 12~20bp）

5′-TGCATGCATGCATGC……CATGCATGCATGCAT-3′ ⇨ 缺失用Fwd Primer
（12~20bp + 12~20bp）

5′-TGCATGCATGCATGCAAAATGCATGCATGCATG-3′ ⇨ 插入用Fwd Primer
（12~20bp + 12~20bp）

③反向引物设计

设计与上述Fwd引物逆向互补的引物。

5′-TGCATGCATGCATGCTGCCATGCATGCATGCAT-3′
3′-ACGTACGTACGTACGACGGTACGTACGTACGTA-5′ ⇨ 替换用Rev Primer

5′-TGCATGCATGCATGC……CATGCATGCATGCAT-3′
3′-ACGTACGTACGTACG……GTACGTACGTACGTA-5′ ⇨ 缺失用Rev Primer

5′-TGCATGCATGCATGCAAAATGCATGCATGCATG-3′
3′-ACGTACGTACGTACGTTTTACGTACGTACGTAC-5′ ⇨ 插入用Rev Primer

➔ 相关产品

❶KOD 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

※50μl反应体系的使用次数

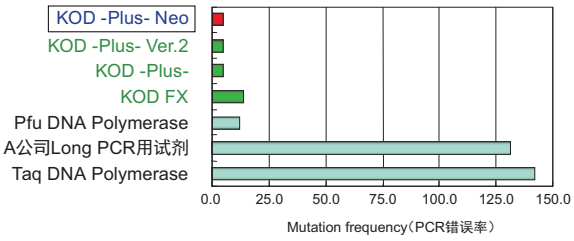
KOD -Plus- Neo 在高保真性 PCR 酶 KOD -Plus- 系列技术的基础上，应用了本公司新开发的「延伸增强剂」，保持了 KOD-Plus- 系列高保真性（约为 Taq DNApolymerase 的 80 倍）的同时，通过抑制 < 停滞现象 >，明显提高了对微量模板 DNA、长目的片段的扩增效率。



➔ 特 征

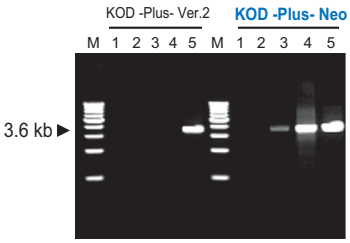
❶可对微量模板 DNA 进行高保真 • 高效率的扩增

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。



❷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。



Sample:Genomic DNA（50ng）
Target:Human β-globin（3.6kb）

【循环条件】
94°C , 2min.
98°C , 10sec. ←
68°C , X ┘ 30 cycles

延伸时间 X：
1：18sec.（5sec./kb）
2：36sec.（10sec./kb）
3：54sec.（15sec./kb）
4：108sec.（30sec./kb）
5：216sec.（60sec./kb）
M：1kb DNA Ladder

❸长链目的片段的扩增

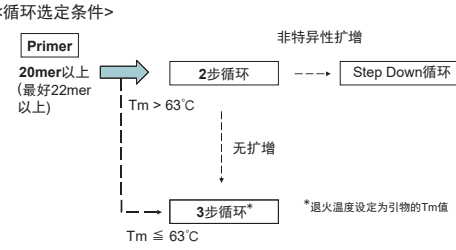
相比以往产品提高了延伸性，可扩增各种长目的片段。已确认可对 24.0kb 的人基因组 DNA 模板进行扩增。

❹实现了各种引物同一循环条件

20mer 以上的引物（Tm 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 Tm 值的计算请使用最邻近法（Nearest Neighbor method）。

<循环选定条件>



产品内容：

<KOD-401>

KOD -Plus- Neo(1U/μl)	200μl × 1支
10 × PCR Buffer for KOD -Plus- Neo	1ml × 1支
25mM $MgSO_4$	1ml × 1支
2mM dNTP	1ml × 1支

※50μl 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：

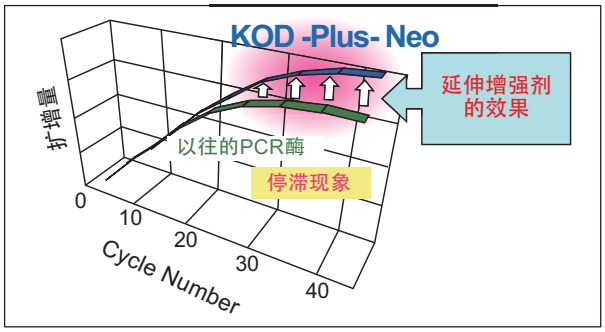
1) M.Takagi et al., *Appl.Environ. Microbiol.*, **63:** 4504-4510(1997)
2) H.Hashimoto et al., *J.Biochem.* (Tokyo), **125:** 983-986(1999)
3) H.Mizuguchi et al., *J.Biochem.* (Tokyo), **126:** 762-768(1999)
4) M.Nishioka et al., *J.Biotechnol.* **88:** 141-149(2001)
5) H.Hashimoto et al., *J.Mol.Biol.*,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

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

➔ 用 途 : PCR

➔ 说 明

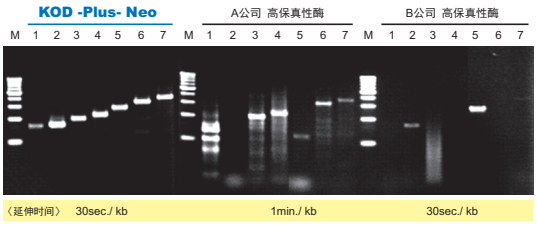
KOD DNA polymerase 具有强力的 3' → 5' 核酸外切酶活性（校正活性），可准确地对目的片段进行扩增，作为克隆用 PCR 酶获得了广泛的好评。然而，高保真性 PCR 酶在 20~30 循环以后，容易出现扩增无法持续的〈停滞现象〉。KOD -Plus- Neo 在高保真性 PCR 酶 KOD -Plus- 系列技术的基础上，应用了本公司新开发的「延伸增强剂」，保持了 KOD -Plus- 系列高保真性（约为 Taq 的 80 倍）的同时，通过抑制〈停滞现象〉，明显提高了对微量模板 DNA、长目的片段的扩增效率。



➔ 结果示例

❶ 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。



【KOD -Plus- Neo 的循环条件】
94°C , 2min.
98°C , 10sec. ┐
68°C , 30sec./kb ┘ 30 cycles

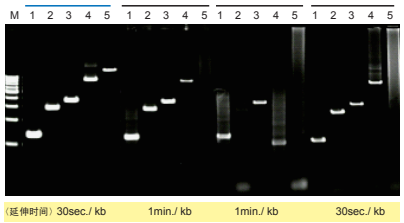
M : 1kb DNA Ladder
1 : Human brk Tyrosine kinase (1.6kb)
2 : Human rac protein kinase-alpha (1.7kb)
3 : Human 63kDa protein kinase (2.0kb)
4 : Human c-syn protooncogene (2.2kb)
5 : Human FER Tyrosine kinase (2.7kb)
6 : Human cell adhesion kinase beta (3.2kb)
7 : Human Jak2 kinase (3.6kb)

【引物】

1	F : ATGGTGTCCCGGGACCAGGCT R : GACCTCTGCTGGCTTCGTGTCAC	3	F : ACTTGACAGAATGAGGTGCGCG R : ATCCTTCACGTGTTCTGCCAAC	5	F : AGACTTCACTGCACGTTTTCTC R : TGGAGGACAGAGTCCTGAAGGC	7	F : GCCCGATCTGTGTAGCCGGTTT R : ATCTTTGCTGGCTAGCATCATG
2	F : TGTCAGCTGGTGCATCAGAG R : GCGTGGCTTCTCTCAAATGCAC	4	F : GTAGAGGCGAGGTTGTTGTGCG R : CAGAGGAGGTTCGGATTTGGGG	6	F : ACTGCAATGTGCCGATCTTAGC R : TGCAAAGTGGCAAGGGAAGGT		

❷ 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。



【KOD -Plus- Neo 的循环条件】
1~4:
94°C , 2min.
98°C , 10sec. ┐
68°C , 30sec./kb ┘ 30 cycles

1: Human β -globin 1.3kb
2: Human β -globin 2.7kb
3: Human β -globin 3.6kb
4: Human β -globin 8.5kb
5: Human β -globin 17.5kb
M: 1kb DNA Ladder

5:Step down 循环
94°C , 2min.
98°C , 10sec. ┐
74°C , 30sec./kb ┘ 5 cycles
98°C , 10sec. ┐
72°C , 30sec./kb ┘ 5 cycles
98°C , 10sec. ┐
70°C , 30sec./kb ┘ 5 cycles
98°C , 10sec. ┐
68°C , 30sec./kb ┘ 20 cycles
68°C , 7min.

基本反应条件：

反应液组成

灭菌蒸馏水	X μl
10 × PCR Buffer for KOD -Plus- Neo	5 μl
2mM dNTPs	5 μl
25mM $MgSO_4$	3 μl
10pmol/ μl Primer F	1.5 μl
10pmol/ μl Primer R	1.5 μl
KOD -Plus- Neo(1.0U/ μl)	1 μl
Genomic DNA	~200ng
Plasmid DNA	~50ng
cDNA	~200ng(RNA 相当)
Total	50 μl

Cycle(1)
〈2 Step Cycle〉*
94°C 2min.
98°C 10sec. ┐
68°C 30sec./kb ┘ 25~45 cycles

Cycle(2)
〈3 Step Cycle〉
94°C 2min.
98°C 10sec. ┐
Tm°C 30sec. ┘ 25~45 cycles
68°C 30sec./kb

Cycle(3)
〈Step Down Cycle〉*
94°C 2min.
98°C 10sec. ┐
74°C 30sec./kb ┘ 5 cycles
98°C 10sec. ┐
72°C 30sec./kb ┘ 5 cycles
98°C 10sec. ┐
70°C 30sec./kb ┘ 5 cycles
98°C 10sec. ┐
68°C 30sec./kb ┘ 15~30 cycles
68°C 7min.

※ 引物的 Tm 值在 63°C以下，请尝试用三步法。

➔ 相关产品

❶ 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

❷ 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

※50μl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

❶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。

❷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。

❸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。

❹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。

❺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

❶PCR 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）。

❷PCR 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 $MgSO_4$ 的浓度，如未发现扩增现象，则可试着提高 $MgSO_4$ 的浓度。

产品内容：

<KOD -Plus->

KOD -Plus-(1U/μl)*	200μl × 1支
10 × PCR Buffer**	1ml × 1支
25mM $MgSO_4$	1ml × 1支
2mM dNTPs***	1ml × 1支

<KOD -Plus- Ver.2>

KOD -Plus-(1U/μl)*	200μl × 1支
10 × PCR Buffer**	1ml × 1支
25mM $MgSO_4$	1ml × 1支
2mM dNTPs***	1ml × 1支

* 含 KOD 抗体浓度为 1.6μg/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。

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

❸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。

❹RT 反应液为模板

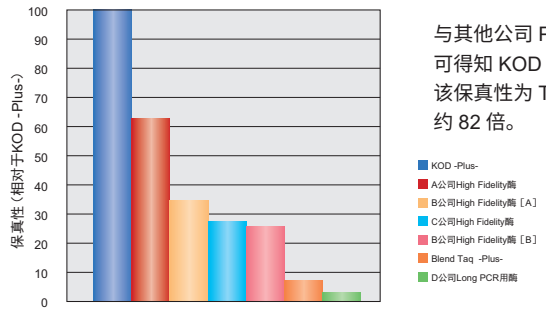
大量的 RT 反应液有时会抑制 PCR 反应。将 RT 反应液加入到 PCR 中时，建议将其量控制在 PCR 最终反应液量的 1/25 以下（最好在 1/50 以下）。此时，不必考虑将 RT 反应液的 Mg^{2+} 或 dNTPs 带入到 PCR 反应液中所带来的影响，而只要按照基本反应条件添加本酶添附的 dNTPs 和 $MgSO_4$ 即可。

❺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

❶各公司 PCR 酶保真性的比较（相对于 KOD -Plus-）

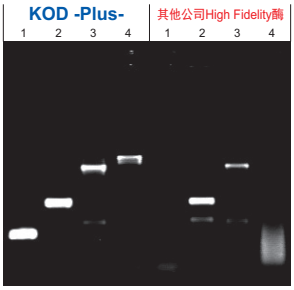


与其他公司 PCR 用酶进行比较，可得知 KOD -Plus- 的保真性最高。该保真性为 Taq DNA Polymerase 的约 82 倍。

❷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，与其他公司的 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。

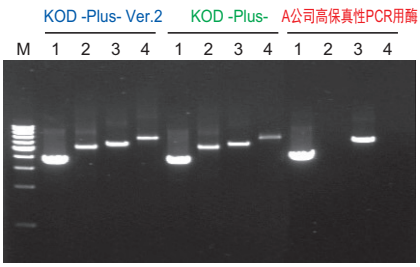
Target

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

❸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 scleosis 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：

<KOD -Plus->

灭菌蒸馏水	X μl
10×PCR Buffer*	5μl
25mM $MgSO_4$	2μl(1mM)
各引物	15pmoles each
2mM dNTPs	5μl(0.2mM)
模板	1~50ng(Plasmid)
	10~200ng(Genomic DNA)
	~1μl(逆转录反应液)
KOD -Plus-(1U/μl)	1μl(1U)
Total Volume	50μl

*KOD -Plus- 用 Buffer（→ 2-39 页）。

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

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

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>

灭菌蒸馏水	X μl
10×PCR Buffer*	5μl
25mM $MgSO_4$	3μl(1.5mM)
各引物	15pmoles each
2mM dNTPs	5μl(0.2mM)
模板	1~50ng(Plasmid)
	10~200ng(Genome DNA)
	~2μl(逆转录反应液)
KOD -Plus-(1U/μl)	1μl(1U)
Total Volume	50μl

*KOD -Plus- Ver.2 用 Buffer（→ 2-39 页）。

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

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

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

❶KOD 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
❷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
❸专用 PCR Buffer				
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

※50μl反应体系的使用次数

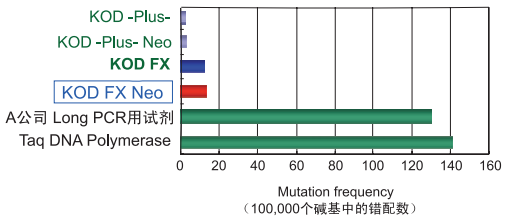
KOD FX Neo 是在高成功率 PCR 酶 KOD FX（→ 2-24 页）的基础上添加了【延伸增加剂】而开发的 PCR 酶。在保持高扩增效率的同时，进一步提高了对难扩增序列、微量模板 DNA、长目的片段及粗样品的扩增效率。



➔ 特 征

❶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。



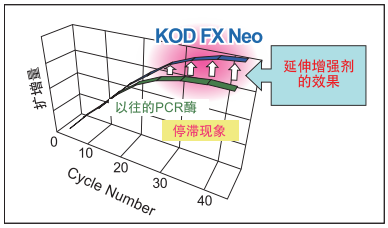
❷提高了粗样品的扩增能力

- 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

❶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。

产品内容：

<KFX-201>

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

※50μl 反应体系的情况下可使用 200 次。

* 含终浓度 2.0mM 的 Mg^{2+}

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	Xμl
2 × PCR Buffer for KOD FX Neo	25μl
2mM dNTPs	10μl
10pmoles /μl Primer F	1.5μl
10pmoles /μl Primer R	1.5μl
KOD FX Neo(1.0U/μl)	1μl
Genomic DNA	10~200ng
Plasmid	1~50ng
cDNA	~200ng(RNA 相当)
粗样品	~2μl 〈一步法植物裂解液 1 μ l〉
Total Volume	50μl

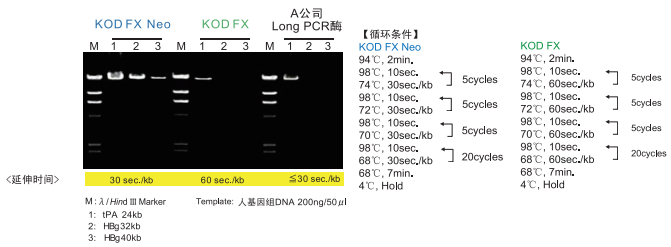
*KOD FX Neo 用 Buffer（→ 2-39 页）

Cycle（1）

<2 Step Cycle>*

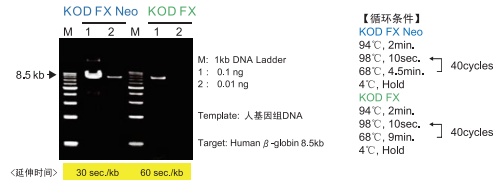
94°C, 2min.
98°C, 10sec. ┐
68°C, 30sec./kb ┘ 25~45 cycles

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）



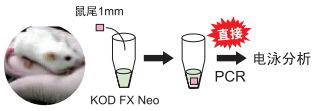
❷检测灵敏度的比较

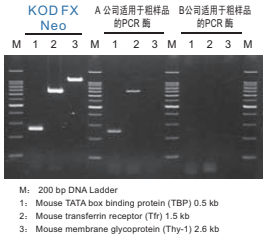
以人基因组 DNA 为模板进行检测灵敏度的比较。结果可见，与原产品相比， KOD FX Neo 的灵敏度提高了约 10 倍。



❸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。

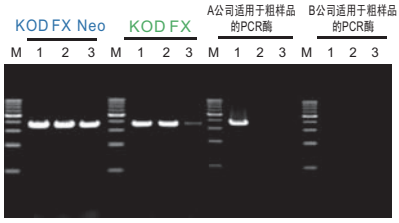




*鼠尾等动物组织直接进行扩增时，PCR 产物会残留在琼脂糖胶凝胶电泳的孔里。因此，建议先向50μl PCR 产物中加入10μl 20mg/ml 的Proteinase K 再进行电泳。

❹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。



＊腐殖酸：使用OD280=1时的溶液

Cycle（2）

<3 Step Cycle>

94℃, 2min.
98℃, 10sec.
(Tm)℃, 30sec.
68℃, 30sec./kb
25~45 cycles

Cycle（3）

<Step Down Cycle>*

94℃, 2min.
98℃, 10sec.
74℃, 30sec./kb
5 cycles
98℃, 10sec.
72℃, 30sec./kb
5 cycles
98℃, 10sec.
70℃, 30sec./kb
5 cycles
98℃, 10sec.
68℃, 30sec./kb
15~30 cycles
68℃, 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 180μl。
3）Vortex 充分振荡。
4）95°C •10min。
5）添加 1M Tris-HCl(pH8.0) 20μl。
6）Vortex 充分振荡。
7）离心(12,000rpm,10min)
8）取 0.5~2μl 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* 100μl。
3）Vortex 充分振荡。
4）95°C •10min。
5）Vortex 充分振荡。
6）离心(12,000rpm,10min)
7）取 1μl 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

❶（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
❷KOD 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
❸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 >　￥1,200
※50μl反应体系的使用次数

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

❶高扩增成功率
对高 GC 含量的目的片段、细胞悬浊液、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。

❷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。

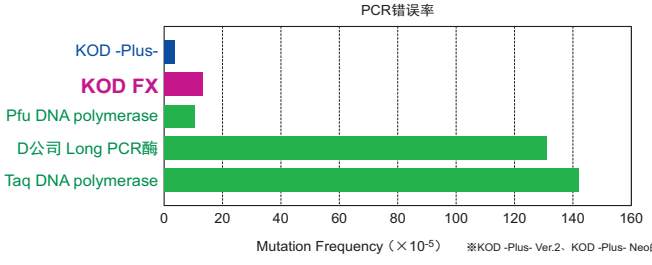
❸出色的延伸性
以 λDNA 为模板可以扩增出 40kb；以人类基因组为模板可扩增出 24kb；以 cDNA 为模板可扩增出 13.5kb。

❹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

❶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)	200μl × 1支
2 × PCR Buffer*	1.7ml × 3支
2mM dNTPs	1ml × 2支

* 含终浓度 2.0mM 的 Mg^{2+}
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)

TEL: 021-5879-4900　FAX: 021-5879-4901　E-mail: tech@bio-toyobo.cn　URL: http://www.bio-toyobo.cn　营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

❷PCR 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）。

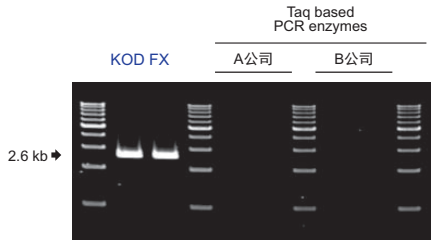
另外，由于本酶的 PCR 产物已被平滑化，因此不能直接用于 TA 克隆。如要进行简单、高效的 TA 克隆，建议使用专用的高效率 TA 克隆试剂盒「TArget Clone -Plus-」（→ 4-6 页）。

➔ 结果示例

❶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。

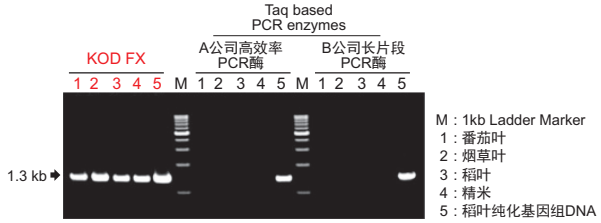
结果可见，只有在用 KOD FX 的情况下，才能确认到明亮的扩增条带。相比使用 Proteinase K 的方法，碱裂解法所花工夫较少，可更简便地进行转基因小鼠的基因分析。



❷用一步法配制的植物 lysate 的扩增例

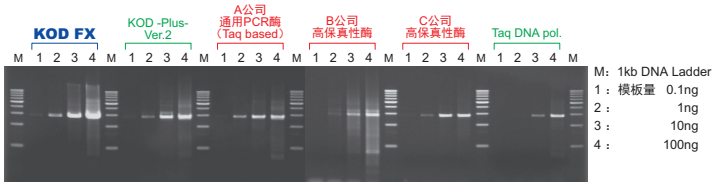
将一步法（请参照右边的反应条件）配制的番茄叶、烟草叶、稻叶以及精米的裂解液各 1 μl，直接添加到 PCR 反应液中，以 rbcL 为目的片段，采用两步法，进行 30 个循环的扩增。

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。



❸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/50μl反应体系
目的片段：β-globin 2.8kb

PCR循环条件：94℃ 2min.
98℃ 10sec. ←┐
68℃ 3min. ←┘ 30 cycles

＊其他公司的酶，根据其产品中添附的使用说明书，□□进行了30个循环。

基本反应条件：

反应液组成

灭菌蒸馏水	X μl
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℃	2min.	
98℃	10sec. ←┐	25~40 cycles
68℃	1min./kb ←┘	

3 Step Cycle*

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

Step Down Cycle*

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

* 引物的 Tm 值在 63℃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℃ •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℃ •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

➔ 相关产品

❶KOD 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
❷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
❸专用 PCR Buffer				
2 × PCR Buffer for KOD FX	KFX-1B	1.7ml × 1 支	¥100	→ 2-39 页

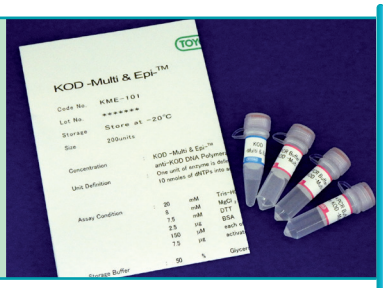
最适于特异性且均一的多重 PCR，以及亚硫酸氢盐处理过的 DNA 扩增。

多重 PCR • 亚硫酸氢盐处理过的 DNA 用高保真性 PCR 酶

KOD -Multi & Epi-®

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

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。
该酶可用于以往的高保真性 PCR 酶不能实现的各种用途。



➔ 特 征

❶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。

❷含有较多尿嘧啶 DNA 的扩增

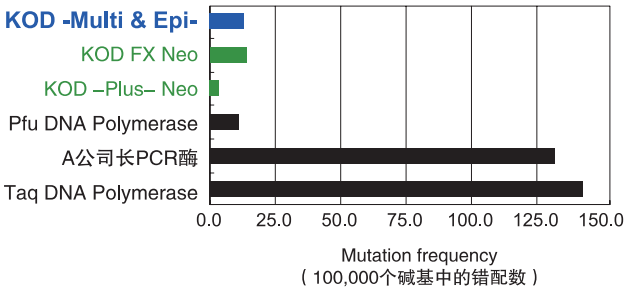
可对亚硫酸氢盐处理后的含有较多尿嘧啶的 DNA 进行高效率的扩增，已确认最大可扩增长度约为 1.5 kb。

❸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-® 则可以使用这类引物进行分析。

❹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。

❺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。

❻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

❶多重 PCR
❷亚硫酸氢盐处理过的 DNA 的扩增

产品内容：

<KME-101>

KOD -Multi & Epi-®	200μl×1支
2×PCR Buffer for KOD -Multi & Epi-®	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	Xμl
2×PCR Buffer for KOD -Multi & Epi-®	25μl
10pmoles /μl Primer F	1.5μl
10pmoles /μl Primer R	1.5μl
模板	~200ng(Genomic DNA)
	~50ng(质粒)
	~200ng [RNA 相当](cDNA)
	~5μl(粗样品)
KOD -Multi & Epi-® (1.0U/μl)	1μl
Total Volume	50μl

Cycle（1）

< 2 步法循环 >
[引物的 Tm 值超过65°C时]

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

Cycle（2）

< 3 步法循环 >
[引物的 Tm 值在 65°C以下时]

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

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

➔ 说 明

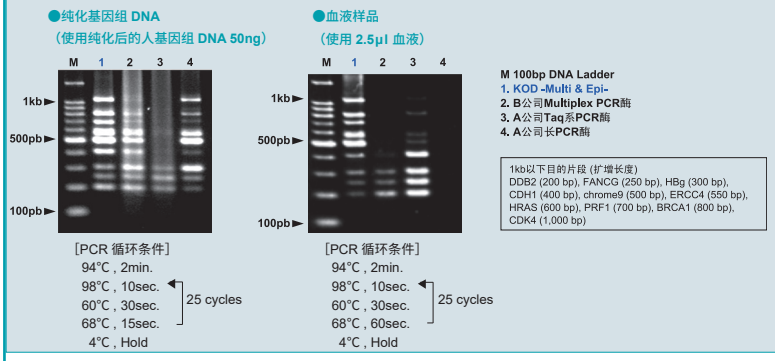
KOD -Multi & Epi-® 通过使用基因改良的 KOD DNA polymerase (UKOD)，可以使用迄今为止难以扩增的含较多尿嘧啶的模板及含次黄嘌呤核苷的引物。
而且由于添加了延伸加速剂等组分，提高了延伸性，所以不容易出现因序列及扩增长度等引起的扩增偏差。
因此，KOD -Multi & Epi-® 可用于多重 PCR 及亚硫酸氢盐处理过的 DNA 的扩增（表观遗传学分析）、宏基因组分析等各种用途。另外，本酶的保真性是 Taq polymerase 的 11 倍，得到的扩增产物可通过克隆，用于以往的测序分析及二代测序等广泛用途。

➔ 实验例

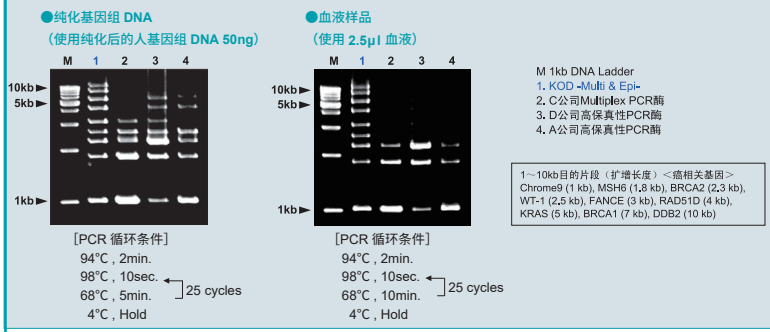
❶多重 PCR 性能比较

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（50μl 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）

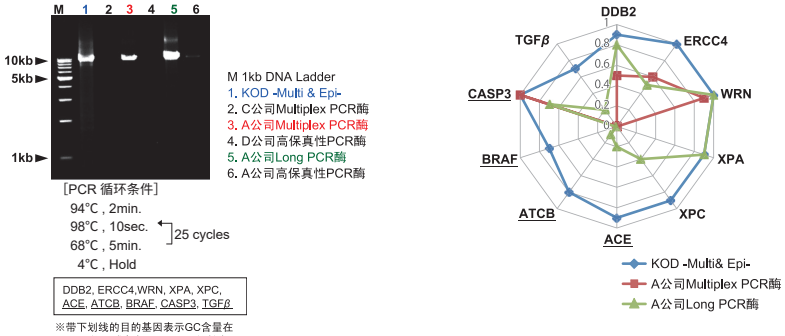


多重 PCR（长链：1 ～ 10kb）



❷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	Xμl
2×PCR Buffer for KOD -Multi & Epi-®	25μl
10pmoles / μl Primer F	1.5μl
10pmoles / μl Primer R	1.5μl
Genomic DNA	~200ng
Plasmid DNA	~50ng
cDNA	~200ng(RNA 相当)
粗样品	~5μl
KOD -Multi & Epi-®（1.0U/μl）	1μl
Total Volume	50μl

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

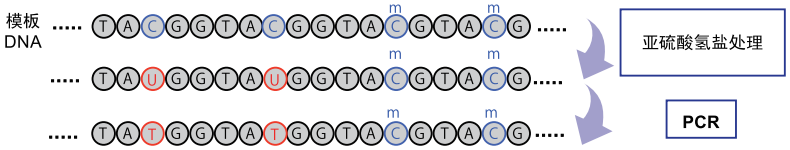
Cycle（2）

< 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

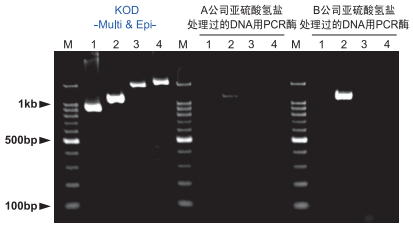
❸亚硫酸氢盐处理过的 DNA 扩增效率的比较

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）。



测序分析
（Capillary 测序、二代测序）



M 100bp DNA Ladder
1. TGFβ (917 bp, AT含有率 69.9%*)
2. BRCA2 (1,134 bp, AT含有率 63.9%)
3. APOE (1,487 bp, AT含有率 69.1%)
4. TGFβ (1,583 bp, AT含有率 61.8%)

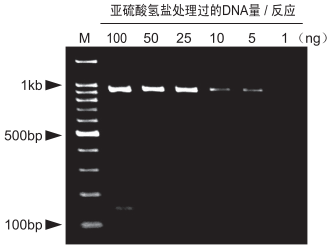
*表示亚硫酸氢盐处理过的AT含有率。

< 亚硫酸氢盐处理方法 >
EpiTect® Fast DNA Bisulfite Kit (QIAGEN)

< 亚硫酸氢盐处理过的 DNA>
55ng/ 反应

[PCR 循环条件]
94°C , 2min.
98°C , 10sec.
60°C , 30sec.
68°C , 30sec./kb
4°C , Hold
40 cycles

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。



M 100bp DNA Ladder

< 亚硫酸氢盐处理方法 >
EpiTect® Fast DNA Bisulfite Kit (QIAGEN)

[PCR 循环条件]
94°C , 2min.
98°C , 10sec.
60°C , 30sec.
68°C , 30sec.
4°C , Hold
40 cycles

❹可用于含次黄苷酸（I）的引物

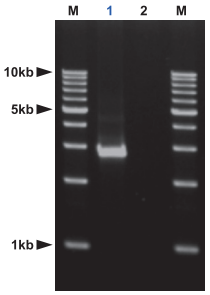
根据 *E.coli* 的 DNA 聚合酶 I 的氨基酸序列设计含次黄苷酸（I）的兼并引物，用 KOD -Multi & Epi-® 和 KOD -Plus- Ver.2(原产品) 进行扩增。结果显示，用原来的 KOD DNA 聚合酶等高保真性 PCR 酶不能用含有次黄苷酸（I）的兼并引物进行扩增，而使用 KOD -Multi & Epi-® 则可以得到良好的结果。同样也适用于含尿嘧啶（U）的引物。

<Template>
E.coli 基因组 DNA 100ng

< 引物序列 >
DNA 聚合酶 I (2.8kb)

Primer F: ATGGTICARATHCCICARAAY
Primer R: RTGIGCYTGRTCCCARTTYTC

[PCR 循环条件]
94°C , 2min.
98°C , 10sec.
60°C , 30sec.
68°C , 45sec.
4°C , Hold
35 cycles



M 1kb DNA Ladder
1. KOD -Multi & Epi-
2. KOD -Plus- Ver.2（原产品）

（3） 使用亚硫酸氢盐处理过的 DNA 的 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
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

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

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

※50μl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 性能得到了显著的提高。



➔ 特 征

❶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。

❷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。

❸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。

❹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)	100μl
10 × Buffer*	1ml
2mM dNTPs	1ml

<Blend Taq -Plus-: BTQ-201>

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

* 含终浓度 2.0mM 的 Mg^{2+}(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

❶高效率 TA 克隆试剂盒				
TArget Clone	TAK-101	10 次份	¥300	→ 4-6 页
❷使用 ReverTra Ace 的 cDNA 合成试剂盒				
ReverTra Ace -α-®	FSK-101	100 次份	¥1,950	→ 3-12 页
❸高效率逆转录酶				
ReverTra Ace®	TRT-101	10,000U	¥800	→ 3-14 页
❹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
※50μl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

❶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。

❷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。

❸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。

❹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)	100μl
10 × Buffer*	1.2ml
2mM dNTPs	1ml

* 含终浓度 1.2mM 的 Mg^{2+}

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., *Appli.Environ. Microbiol.*, **60:** 4559-4566(1994)
2) M.Takagi et al., *Appli.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

❶ 高效率 TA 克隆试剂盒

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

TEL: 021-5879-4900　FAX: 021-5879-4901　E-mail: tech@bio-toyobo.cn　URL: http://www.bio-toyobo.cn　营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

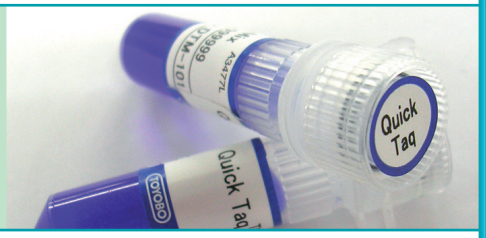
采用热启动的 Taq Master Mix。由于添加了染料，反应液可直接用于电泳检测。

采用热启动・添加染料的 Taq Master Mix

Quick Taq® HS DyeMix

Code：DTM-101　100次份　￥375

Quick Taq® 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

❶2×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。

❷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。

❸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。

❹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。

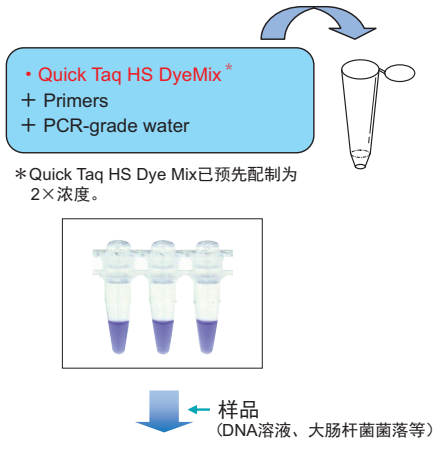
❺高性价比

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® HS DyeMix　1.25ml×2支
※50μl 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。

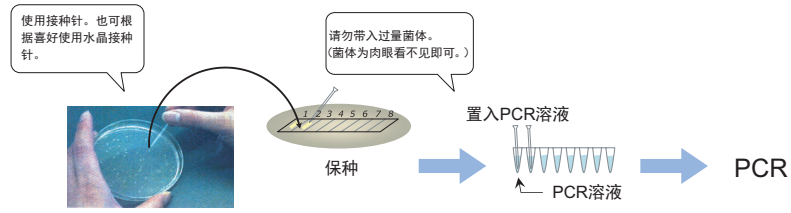
参考文献：

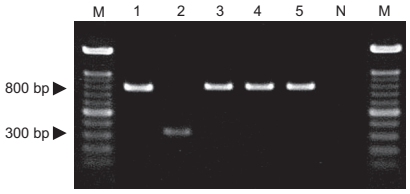
1) F.C.Lawyer et al., *J.Biol. Chem.*, **264:**6427-6437(1989)
2) D.E.Kellogg et al., *Bio Techniqus*, **16:**1134(1994)

➔ 结果示例

❶ 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 DH5α 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。





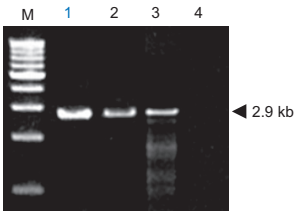
M：100bp DNA Ladder
1：菌落（插入片段＋）
2：菌落（插入片段−）
3：菌落（插入片段＋）
4：菌落（插入片段＋）
5：菌落（插入片段＋）
N：阴性对照
M：100 bp DNA Ladder

＜扩增条件＞
94°C 2 min.
94°C 30 sec.
62°C 30 sec.
68°C 1 min.
25 cycles

Forward Primer: CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
Reverse Primer: AGCGGATAACAATTTCACACAGGAAAC
※引物终浓度为0.2 μ M

❷ 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® 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)。



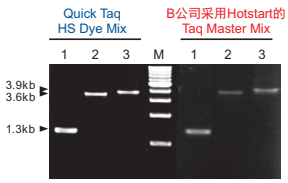
模板：人基因组DNA 50ng/50 μ l反应体系
M: 1kb Ladder
1: Quick Taq HS DyeMix
2: 采用Hotstart法 rTaq DNA polymerase
3: rTaq DNA polymerase
4: A公司Taq Master Mix

＜扩增条件＞
94°C 2 min.
94°C 30 sec.
60°C 30 sec.
68°C 3 min.
40 cycles

Forward Primer : AATGGATGATTTGATGCTGTCCC
Reverse Primer : ATAAGAGCTCCCAAGACTTAG
※引物终浓度为0.2 μ M

❸ 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，β-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。



模板：人基因组DNA 50ng/50 μ l反应体系
M : 1kb Ladder
1: β-globin（1.3kb）
2: β-globin（3.6kb）
3: 菌落直接PCR（3.9kb）

［引物］
（β-globin 1.3kb）
Forward Primer : TTAGGCCTTAGCGGGCTTAGAC
Reverse Primer : CCAGGATTTTTGATGGGACACG
（β-globin 3.6kb）
Forward Primer : GGTGTTCCCTTGATGTAGCACA
Reverse Primer : ACATGTATTTGCATGGAAAACAACTC
（菌落直接PCR 3.9kb： 使用 P7, P8引物）
Forward Primer : CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
Reverse Primer : AGCGGATAACAATTTCACACAGGAAAC
※引物终浓度为0.2 μ M

基本反应条件：

反应液组成

灭菌蒸馏水	X μl
2 × Quick Taq® HS DyeMix	25 μl
10pmol/ μl Primer F	1.0 μl
10pmol/ μl Primer R	1.0 μl
Genomic DNA(50ng/ μl)	~200ng
Plasmid DNA	~50ng
菌落 (※ 参照实验例)	
DW up to 50 μl	

2 Step Cycle*

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

3 Step Cycle*

94°C	2min.
94°C	30sec.
(Tm-5)°C	30sec. ← 25~40 cycles
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

❶ 高效率 TA 克隆试剂盒

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

❷ 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

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

广泛应用的标准 PCR 酶。

标准 DNA 聚合酶

rTaq DNA Polymerase

Mg^{2+} 另外添附		
Code: TAP-201	250U × 1支 <100~200次 >	¥150

<工业包装请询价 >

Mg^{2+} 含于溶液		
Code: TAP-211	250U × 1支 <100~200次 >	¥150

※50μl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

❶备有两种 PCR 反应用的缓冲液

备有另附 Mg^{2+} 和含有 Mg^{2+} 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

❶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)。

❷PCR 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。

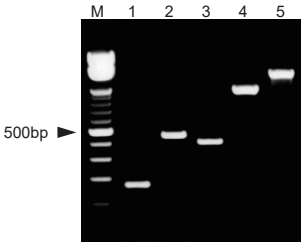
❸PCR 条件的设定

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 Tm 值低 5-10℃。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

❶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^{2+} 和 dNTPs 的终浓度分别为 1.5mM 和 0.2mM，退火温度为 55℃。结果可见，从 180bp 到 1.3kb 的目的片段均可得到高效率的扩增。



M: 100bp Ladder
1: 180bp p53 exon8
2: 444bp p53 exon8
3: 408bp β-globin
4: 1kb β-globin
5: 1.3kb β-globin

循环条件

94℃，2min.
↓
94℃，45sec.
Tm-5℃，45sec.
72℃，1min./1kb
35 cycles

产品内容:

rTaq DNA Polymerase(5U/μl)
10 × Buffer
25mM $MgCl_2$(仅适用另附 Mg^{2+} 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^{2+} 类 型>

100mM	Tris-HCl(pH8.3)
500mM	KCl

<含 Mg^{2+} 类 型>

100mM	Tris-HCl(pH8.3)
500mM	KCl
15mM	$MgCl_2$

活性的定义:

在75℃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℃

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^{2+} 类 型>

灭菌蒸馏水	X μl
10 × Buffer	5 μl
25mM $MgCl_2$	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

➔ 相关产品

❶ 高效率 TA 克隆试剂盒

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

❷ 热启动 PCR 用抗体

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

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

❶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。

❷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+} 存在的情况下具有逆转录活性，利用该性能，可以用于 1-step RT-PCR。

➔ 几点建议

❶PCR 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）]。

❷PCR 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。

❸RT-PCR 反应
本酶在有 Mn^{2+} 存在的情况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

❶ 高效率 TA 克隆试剂盒

TArget Clone	TAK-101	10 次份	¥300	→ 4-6 页
❷ 使用 rTth 多聚酶的一步法 RT-PCR 试剂盒				
RT-PCR Quick Master Mix	PCR-311F	50 次份	¥1,800	→ 2-36 页
❸ 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

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

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。适合用于 TaqMan® 分析等使用探针法的荧光定量 PCR 中。

➔ 特 征

❶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。

❷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。

❸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。

❹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

❶PCR 反应体系的设定

建议的引物终浓度范围是 0.2-0.6μM，TaqMan® 探针的添加量请在终浓度 0.05-0.3μM 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。在高速循环及粗样本的检测中，扩增率不理想的情况下，增加酶量（最大 2 倍），可以得到改善。

❷PCR 反应条件的设定

退火 / 延伸的温度建议设定在 55~65℃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。

❸RT-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/μl)	62.5μl×1支
2×Buffer for rTth/TTx (DNA)*1	1.25ml×2支

*1 2×Buffer for rTth/TTx (DNA) 中含有dUTP

<HSTTX-111>

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



➔ 特 征

❶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。

❷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。

❸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^{2+} 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

❶引物的设计

RT-PCR 用引物的设计方法请参照 2-13 页 的说明

❷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。

❸RT-PCR 产物的克隆

由于本试剂盒在 Mn^{2+} 存在的条件下能进行 PCR，然而使用 Mn^{2+} 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。

产品内容：

2×RT-PCR Quick Master Mix	625μl×2
50mM $Mn(OAc)_2$	200μl
Nuclease-free Water	1100μl

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	25μl
50mM $Mn(OAc)_2$	2.5μl
各引物	10pmoles each
RNA 样品	
Total RNA	<2.5μg
Poly(A)⁺ RNA	<500ng
Total Volume	50μl

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Tm值在50~70°C之间进行调整。

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

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 100μl×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

❶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。

❷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。

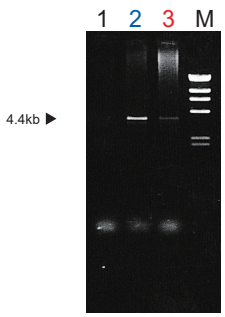
➔ 原 理：有关热启动法的原理，请见（→ 2-5 页）。

➔ 几点建议

❶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

❶以 Human 基因组 DNA 为模板的 PCR 示例
以β-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。



M：λ /*Hin*d Ⅲ Marker
1：A 公司酶
2：A 公司酶 + anti-Taq high
3：A 公司酶 + B 公司抗体

产品内容：

Antibody(1μg/μl)*	100μl
10×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×PCR Buffer 组成：

100mM	Tris-HCl(pH8.3)
500mM	KCl
15mM	$MgCl_2$

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.Techniqus,* **16:** 1134(1994)

基本反应条件：

Taq DNA Polymerase	1U
anti-Taq high	0.2μl

or

Taq DNA Polymerase(5U/μl)
= 添加等量的 anti-Taq high

↓

室温，5min.

※ 混合后可以在 -20°C长期保存。

➔ 相关产品

❶ 高性能 Taq DNA polymerase

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

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

❶简便
只需简单添加，即可分解含 dUTP 的 PCR 产物，防止了污染。

❷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

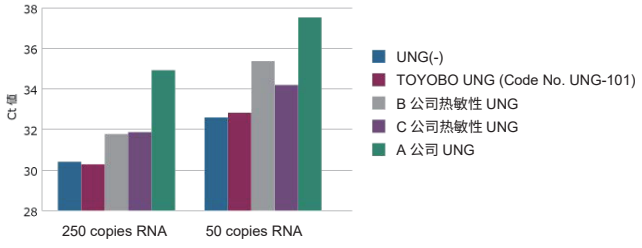
在 PCR 中，carryover 污染是由于模板中含有非样品来源的 DNA 并且被扩增导致的，其中的重要污染源是之前 PCR 的扩增产物。在这种情况下，常常可以从阴性对照中看到靶基因的扩增。如果进行定量 PCR，可能会出现假阳性，或者放大定量的结果。针对这个问题，可以通过使用预先含 dUTP 的 dNTPs 进行 PCR，然后在进行 PCR 之前用 UNG 酶进行处理来防止 carryover 污染。

➔ 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

❶UNG 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。



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。

➔ 相关产品

❶ 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
❷ 高性能 1-step qRT-PCR Kit				
THUNDERBIRD® Probe One-Step qRT-PCR kit	QRZ-101	100 次份	¥2,400	→ 1-8 页

TEL: 021-5879-4900　FAX: 021-5879-4901　E-mail: tech@bio-toyobo.cn　URL: http://www.bio-toyobo.cn　营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

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

❶ DNA 多聚酶合成反应时所需的核苷酸
❷ 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℃

➔Deoxyribonucleotides

dNTPs Set	■浓度：各 100mM ■备注：本品为 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 溶液各一支	NTP-101	50μmoles / 0.5ml × 4 支	￥1,200
dNTPs Mixture (2mM)	■浓度：各 2mM ■备注：本品为 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 混合液一支	NTP-201	各 2μmoles / 1.0ml×1 支	￥65
申 dNTPs Mixture (10mM)	■浓度：各 10mM ■备注：本品为 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 混合液一支	NTP-301 < 工业包装请询价 >	各 2μmoles / 0.2ml×1 支	￥200
dNTPs Mixture (2mM)	■浓度：各 2mM ■备注：本品为 dATP、dGTP、dCTP、 dUTP 混合液一支	NTP-501	各 2μmoles / 1.0ml×1 支	￥200

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℃

➔PCR 用反应缓冲液

2×PCR Buffer for KOD FX	KFX-1B	1.7ml×1 支	￥100
2×PCR Buffer for KOD FX Neo	KFX-2B	1.7ml×1 支	￥100
KOD -Plus- 用 25mM $MgSO_4$	KOD-2S	1ml×1 支	￥50
KOD -Plus- Ver.2 用 Buffer	KOD-3B	1ml×1 支	￥100
KOD -Plus- Neo 用 Buffer	KOD-4B	1ml×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付加（混合）	2-30
rTth DNA Polymerase	- [1]	+	+ (1min/kb)	~2kb	+	-	√ (Mn^{2+})	-	A付加	2-35
Hot Start TTx DNA Polymerase	- [1]	+	++	~2kb	++	-	√ (Mn^{2+})	√	带A	2-34
RT-PCR Quick Master Mix	- [1]	+	+ (1min/kb)	~2kb	+	-	-	√	A付加	2-36
rTaq DNA Polymerase	- [1]	+	+ (1min/kb)	~2kb	+	√	-	-	A付加	2-33
Quick Taq® HS DyeMix	- [1]	+	+ (1min/kb)	~4kb	+	-	-	√	A付加	2-31
Blend Taq®	+ [3]	++	+ (1min/kb)	~23kb	++	-	-	-	平滑·A付加（混合）	2-29
Blend Taq® -Plus-	+ [3]	++	+ (1min/kb)	~23kb	++	-	-	√	平滑·A付加（混合）	2-29

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

「逆转录」

第 3 章　目录 3-1

➔ 按用途分类的产品流程图 3-2

➔ cDNA 合成 3-3

➔ RNA 制备
SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR 3-5

➔ 逆转录
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix 系列 3-8
ReverTra Ace® qPCR RT Kit 3-10
ReverTra Ace -α-® 3-12
ReverTra Ace® 3-14

➔ 相关试剂
RNase Inhibitor Recombinant type 3-16

INDEX

「逆转录」

{ 按用途分类的产品流程图 }

培养细胞

Realtime PCR 用细胞裂解液的制备

***SuperPrep*® 系列** ➔ (3-5 页)

- *SuperPrep*® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR
- *SuperPrep*® II Cell Lysis Kit for qPCR (Lysis & RT Reagent)

RNA 抽提试剂盒

Total RNA 抽提试剂盒 ➔ (5-6 页)

- MagExtractor™ -RNA-

Viral RNA 抽提试剂盒 ➔ (5-8 页)

- MagExtractor™ -Viral RNA-

细胞裂解液

提纯 RNA

RT-PCR 试剂盒

高效率 RT-PCR 试剂盒 ➔ (2-36 页)

- RT-PCR Quick Master Mix【简便】

1-step 用 Realtime PCR 试剂盒

【探针法】

- THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit ➔ (1-8 页)
- *RNA-direct* ™ Realtime PCR Master Mix ➔ (1-12 页)

【SYBR® Green 法】

- *RNA-direct* ™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix ➔ (1-12 页)

cDNA 合成试剂盒

- ReverTra Ace -α-® ➔ (3-12 页)

cDNA 合成用基础试剂

高效率逆转录酶 ➔ (3-14 页)

- ReverTra Ace®

相关试剂 ➔ (2-39 页) • dNTPs

从细胞裂解液开始的高效率 cDNA 合成

- *SuperPrep*® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Lysis & RT Reagent) ➔ (3-5 页)

Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒

ReverTra Ace® qPCR RT 系列 ➔ (3-8 页)

- ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover
- ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix
- ReverTra Ace® qPCR RT Kit

高效率 Realtime PCR 试剂盒
(对应高 GC 含量 • 长链 • 粗样品)

- KOD SYBR® qPCR Mix

新一代 Realtime PCR 试剂盒
(重视性能 + 性价比)

THUNDERBIRD® Next qPCR Mix 系列 ➔ (1-17 页)

【探针法】

- THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix

【SYBR® Green 法】

- THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix

高效率 Realtime PCR 试剂盒
(可靠性高)

Realtime PCR Master Mix 系列 ➔ (1-21 页)

【探针法】

- Realtime PCR Master Mix

【SYBR® Green 法】

- SYBR® Green Realtime PCR Master Mix
- SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-

1 cDNA 的合成

1.RT-PCR 实验中的逆转录反应

（1）逆转录酶

科研用逆转录酶一般有「病毒来源的逆转录酶」与「微生物来源的具有逆转录活性的DNA聚合酶」两种。病毒来源的逆转录酶一般使用来自M-MLV（Moloney Murine Leukemia Virus）或AMV（Avian Myeloblastosis Virus）等的逆转录病毒。其中，M-MLV来源的逆转录酶由于合成能力较高而被频繁使用。本公司通过向M-MLV基因的两个位点导入突变，开发出了合成能力更高的「ReverTra Ace®」。该酶被用于以下介绍的两种cDNA合成试剂盒中。

另一方面，微生物来源具有逆转录活性的DNA聚合酶，例如Tth DNA polymerase（以下称Tth），在Mn离子存在条件下具有将RNA模板合成DNA的能力。因此，使用该酶可在同一离心管完成RT-PCR。而且该酶的最适温度在60℃左右，因此可在高温下进行逆转录反应，对容易形成高级结构的RNA的逆转录非常有效，但不适用于长片段cDNA的合成。

（2）RT-PCR过程中的注意点

Total RNA、mRNA、rRNA、及tRNA都可作为逆转录反应的模板。逆转录时要注意，尽量不要使用含基因组DNA的RNA。如图1所示，mRNA是基因组DNA转录后，通过剪接（splicing）而形成的成熟的mRNA，因此基本上含有基因组DNA的序列，而不小心混入的基因组DNA也同样会被扩增。因此，一般实验中都会将分离后的RNA进行DNase I处理。同时，在Exon连接点上设计引物，或者跨Exon设计引物会比较有效。从理论上讲，用前一种方法基因组DNA不会被扩增，而用后一种方法会产生不同大小的产物。

此外，逆转录用的引物也十分重要。使用病毒来源的ReverTra Ace等逆转录酶时，主要可以使用如图2所示的三种引物，例如，在5'末端附近设计PCR引物时，使用Oligo dT primer或Random primer的灵敏度不同。而且，混入部分mRNA被分解的RNA时，该灵敏度的差异更明显。考虑到该情况，现在实验中也经常会使用Oligo dT与Random混合的引物Mix。使用预混的两种引物，可在各种条件下得到稳定的结果。ReverTra Ace® qRT PCR Kit 系列（→ 3-8 页）中使用的即是该种引物Mix。

使用Tth等进行的1-step RT-PCR中，用的是Specific引物。一般情况下，为PCR用设计的Reverse primer、可直接作为逆转录引物使用。通常，在1-step RT-PCR中不能使用Oligo dT和Random primer。

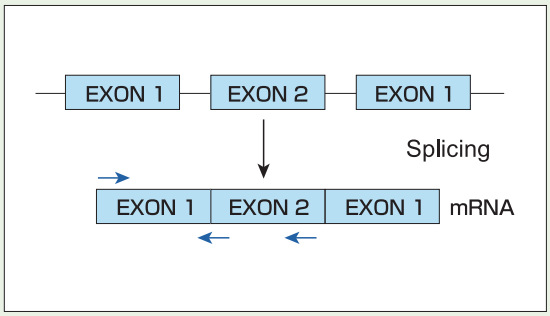


图1 RT-PCR引物的设计

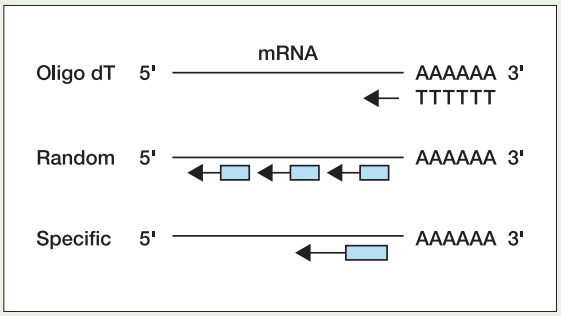


图2 逆转录引物

（3）cDNA合成用试剂盒

本公司生产和销售「ReverTra Ace -α-®（→3-12页）」和「ReverTra Ace® qPCR RT Kit系列（→ 3-8 页）」两种cDNA合成试剂盒，其各自的用途如表1所示。

表1 cDNA合成试剂盒的特征

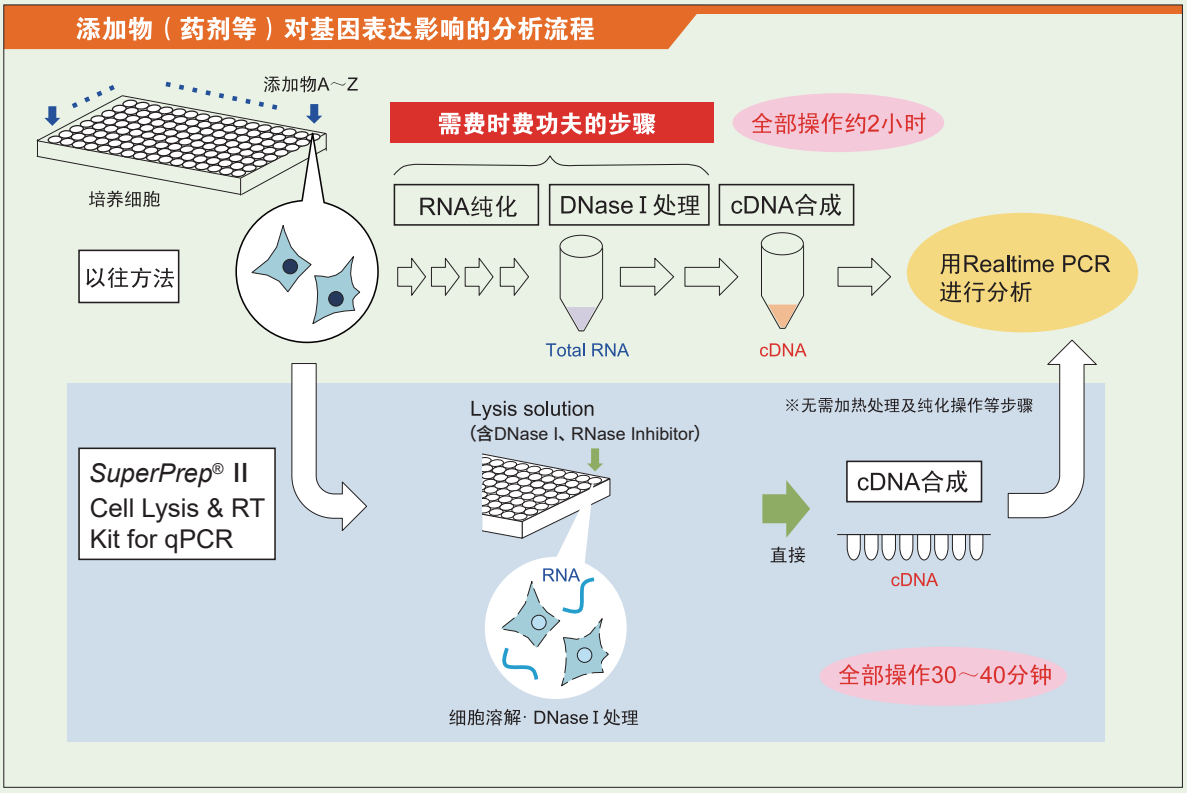
品　　名	试剂盒组成	备　　注
ReverTra Ace -α-®	逆转录酶、5×RT buffer、dNTPs、Oligo dT primer、Random primer、RNase Inhibitor、Nuclease-free Water	适用于基因克隆用cDNA合成等各种用途的标准试剂盒。
ReverTra Ace® qPCR RT Kit	Enzyme Mix、5×RT buffer、Primer Mix、Nuclease-free Water	Realtime PCR用cDNA合成用试剂盒。将酶与RNase inhibitor、dNTP、buffer等预混在一起，使得操作非常简便。
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix（with gDNA Remover）	5×RT Master Mix（Ⅱ） 5×RT Master Mix（Ⅱ） no-RT Control Nuclease-free Water （gDNA Remover, 4×DN Master Mix）	Realtime PCR用cDNA合成用试剂盒。将酶与RNase inhibitor、dNTP、buffer等预混在一起，使得操作非常简便。（分含有和不含有去除基因组DNA组分的两款。）

（4）通过细胞裂解液进行高通量cDNA合成

向哺乳类培养细胞及原代培养细胞中添加特定的药剂，使用Realtime PCR法，有望全面分析基因表达量的变化。

SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR（→ 3-5页）中含有“Lysis Reagents”和“RT Reagents”，“Lysis Reagents”是指从96孔板等培养的细胞开始简单制成的含有可作为逆转录反应模板的RNA的细胞裂解液，“RT Reagents”指可从粗样品裂解液开始高效率合成cDNA的逆转录反应试剂。

在细胞裂解这一步中，RNA定量的同时，使用DNase I去除基因组DNA，基因组DNA是产生背景的主要原因。用这种方法得到的含有RNA的细胞裂解液，在冰上至少可以稳定放置6小时。像U937这样RNase活性很高的细胞虽然不适合用这种裂解液的方法，但是使用本试剂，确认可以得到稳定的结果。



另外，RT Reagents是采用了本公司高效率逆转录酶[ReverTra Ace]的Master Mix，可用混有杂质的RNA溶液高效地合成cDNA，合成的cDNA可使用各种Realtime PCR试剂进行分析。

可从培养的细胞开始简便 • 快速地制备 qPCR 用模板 cDNA。

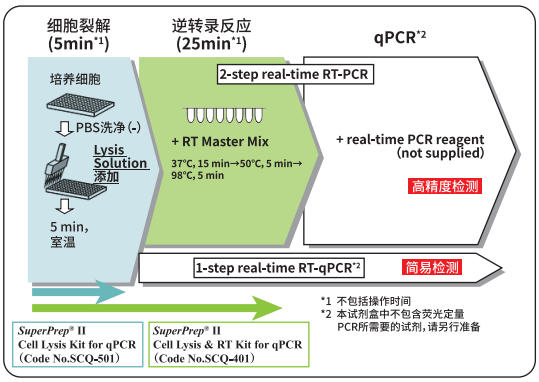
Realtime PCR 用细胞裂解 & cDNA 合成试剂盒（使用培养的细胞）

SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR

SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR	Code：SCQ-401	100次份	￥4,800
	Code：SCQ-401S	20次份	￥1,000
SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR	Code：SCQ-501	100次份	￥2,400

※ 使用 96 孔板的情况下，用量约为 1 包（100 次份）。

SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR 是为了能够用荧光定量 PCR 法进行基因表达分析，从用添附的试剂裂解的细胞开始进行逆转录反应，简便、快速地配制 cDNA 的试剂，由细胞裂解试剂 (Lysis Reagents) 和逆转录反应试剂 (RT Reagents) 组成。



＜ Lysis Reagents ＞



＜ RT Reagents ＞



产品内容：

〈SCQ-401〉

(Lysis Reagents)	
Lysis Solution	6.5ml
gDNA Remover	33μl
RNase Inhibitor	110μl
(RT Reagents)	
5 x RT Master Mix	860μl
5 x RT Mastre Mix no-RT control	86μl
Nuclease free Water	1.7ml×2

〈SCQ-501〉

Lysis Solution	6.5ml
gDNA Remover	33μl
RNase Inhibitor	110μl

保存：

-20°C

➔ 特 征

❶无需纯化 RNA

可简便地从培养细胞开始制备能用作逆转录反应模板的含有 RNA 的细胞裂解液。以 Lysis Solution 处理的裂解液为模板，可直接进行逆转录反应，因此可以大幅度缩短分析时间。

❷从裂解液开始合成高品质的 cDNA

通过 Buffer 组分的最优化，有效抑制了因 RNase 等细胞成分引起的 RNA 降解（配制好的 RNA 可以在冰上稳定放置 6 小时）。另外，由于 DNase I 处理后才进行 cDNA 的合成，所以可以合成基因组 DNA 污染很少的高品质 cDNA。逆转录试剂是以本公司的高效逆转录酶 [ReverTra Ace] 为基础且优化过的 Master Mix，能够简便、高效地合成 cDNA。合成的 cDNA 可长期保存。

❸可用于多种类型的哺乳类动物细胞

SuperPrep® II 在提高了细胞裂解性能的同时，也降低了 RNase 的影响。与上一代产品 SCQ-101 相比，可使用更多种类的细胞进行分析。已确认适用于本产品的细胞种类如下表。

表 1. *SuperPrep*® II 已确认适用的细胞

	细胞名	贴壁／悬浮	菌种	细胞	来源
1	HPA	贴壁	H.sapiens	preadipocytes (primary cell)	前体脂肪细胞
2	HEK	贴壁	H.sapiens	epidermal keratinocytes (primary cell)	表皮角化细胞
3	HA	贴壁	H.sapiens	astrocytes (primary cell)	星形胶质细胞
4	HDF	贴壁	H.sapiens	dermal fibroblasts (primary cell)	皮肤纤维芽细胞
5	HFLS	贴壁	H.sapiens	fibroblast-like synoviocytes (primary cell)	成纤维样滑膜细胞
6	HBEpC	贴壁	H.sapiens	bronchial epithelial cells (primary cell)	支气管上皮细胞
7	HUVEC	贴壁	H.sapiens	umbilical vein endothelial cells (primary cell)	脐静脉内皮细胞
8	HPAEC	贴壁	H.sapiens	pulmonary artery endothelial cells (primary cell)	脐动脉内皮细胞
9	HC	贴壁	H.sapiens	chondrocytes (primary cell)	软骨细胞
10	HOb	贴壁	H.sapiens	osteoblasts (primary cell)	成骨细胞
11	HSkMC	贴壁	H.sapiens	skeletal muscle cells (primary cell)	骨骼肌细胞
12	HAOSMC	贴壁	H.sapiens	Aortic smooth muscle cells (primary cell)	主动脉平滑肌细胞
13	HFDPC	贴壁	H.sapiens	hair follicle dermal papilla Cells (primary cell)	人毛乳头细胞
14	HMSC	贴壁	H.sapiens	marrow stromal cell (primary cell)	骨髓间质细胞
15	A431	贴壁	H.sapiens	epidermoid carcinoma cell line	表皮癌细胞系
16	HeLa S3	贴壁	H.sapiens	cervix carcinoma cell line	宫颈癌细胞系
17	HepG2	贴壁	H.sapiens	hepatocellular carcinoma cell line	肝癌细胞系
18	C2C12	贴壁	M. musculus	myoblast cell line	成肌细胞
19	NIH-3T3	贴壁	M. musculus	embryo fibroblast cell line	胚胎纤维母细胞
20	MDCK	贴壁	C. familiaris	kidney cell line	肾脏细胞
21	CHO-K1	贴壁	C. griseus	ovary cell line	卵巢细胞系
22	Jurkat	悬浮	H.sapiens	T lymphocyte cell line	T淋巴细胞系
23	K562	悬浮	H.sapiens	myelogenous leukemia cell line	粒细胞白血病细胞系
24	THP-1	悬浮	H.sapiens	acute monocytic leukemia cell line	急性单核细胞白血病细胞系
25	U937	悬浮	H.sapiens	leukemic monocyte lymphoma cell line	核细胞白血病淋巴瘤细胞系
26	HMNC	悬浮	H.sapiens	mononuclar cells (primary cell)	单核细胞

❹降低了高通量分析误差

操作步骤上因为减少了少量分装操作及稀释操作，降低了高通量分析时的误差。另外，没有细胞裂解时的吹打混匀操作，而且进行了 gDNA Remover 处理，提高了操作性。无需反应停止液的添加，也无需引起 RNA 不稳定的加热操作。

❺可以与各种荧光定量 PCR 试剂组合使用

可与各种荧光定量 PCR 试剂组合使用（SYBR® Green I、TaqMan® Assay 均可使用）。另外，通过与本公司的 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix（Code No. QPS-101）、KOD SYBR® qPCR Mix（Code No. QKD-201）组合使用，可以确认能够从培养细胞开始简便且高精度地进行基因表达分析。此外，与本公司的 THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit（Code No. QRZ-101）、*RNA-direct*™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (Code No. QRT-201) 等一步法荧光定量 PCR 试剂组合使用，也可进行简易分析。

➔ 用 途 : Realtime PCR 用的 cDNA 合成

➔ 说 明

SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR 是由通过荧光定量 PCR 对基因表达进行分析用的细胞裂解试剂（Lysis Reagents）与逆转录反应试剂 (RT Reagents) 组成的试剂盒。使用本产品，可以从用 96 孔板等培养的细胞开始，简便地配制含有可作为逆转录反应模板用 RNA 的细胞裂解液。另外，本试剂盒中含有的逆转录反应（RT）试剂，最适用于从细胞裂解液开始直接逆转录反应。使用本试剂盒，可以简便、迅速地从培养细胞开始直接合成荧光定量 PCR 用的模板 cDNA，可用于高通量分析。

SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR 是细胞裂解试剂（Lysis Reagents）的单独销售品。也可用于配制一步法荧光定量 RT-PCR 用的细胞裂解液。

基本反应条件：

< 裂解液的配制 >

按以下比例（1 次反应量）向 Lysis Solution 中添加 RNase Inhibitor 以及 gDNA Remover

Lysis Solution	58.7 μl
RNase Inhibitor	1 μl
gDNA Remover	0.3 μl

↓

向已加入细胞的各孔中添加 Lysis Solution（含 RNase Inhibitor 以及 gDNA Remover）60μl

↓

振荡 30 秒后，
室温温育 4 分 30 秒

↓

置于冰上

< 逆转录（RT）反应 >

按以下比例（1 次反应量）在冰上配制 RT Master Mix

5 × RT Master Mix	8 μl
Nuclease-free Water	24 μl

↓

每管分装 32 μl

↓

添加裂解液 8 μl

↓

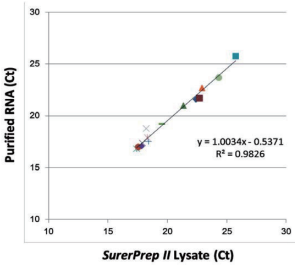
37°C，15min.
50°C， 5min.
98°C， 5min. （酶失活）
4°C，Hold

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

➔ 说 明

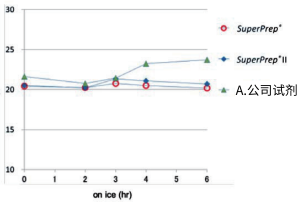
❶纯化过的 RNA 与用细胞裂解液的 Ct 相关性验证

使用 *SuperPrep*® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR(Code No. SCQ-401)，从 2.5×10⁴ 个 HUVEC 细胞开始合成 cDNA(40μl 反应体系)。另外，从 HUVEC 细胞抽提的 Total RNA 66.6ng 开始，用 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix(Code No. FSQ-201)，进行 cDNA 的合成(40μl 反应体系)。之后，以各自的 cDNA 为模板，使用 THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix(Code No. QPS-201)，对 15 种管家基因进行荧光定量 PCR，检验得到的 Ct 值的相关性。结果表明，本次分析的 15 种基因，纯化 RNA 与使用细胞裂解液分析得到的结果具有良好的相关性



❷细胞裂解液在冰上稳定性的确认

使用 *SuperPrep*® II Cell Lysis Kit for qPCR(Code No. SCQ-401)，将 4×10⁴ 个 HeLa S3 细胞制成细胞裂解液，放置于冰上后，0~6 小时后进行细胞裂解液的取样，随即进行 cDNA 合成。同样使用本公司以前的产品 (*SuperPrep*®) 及 A 公司试剂，制备细胞裂解液，同样地进行取样，进行 cDNA 合成。以合成的 cDNA 为模板，使用 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix(Code No. QPS-101)，进行荧光定量 PCR 对 GAPDH 基因的表达量进行分析。结果表明，HeLa S3 细胞即使在冰上放置 6 个小时，也没有观察到显著的 Ct 值的延迟。

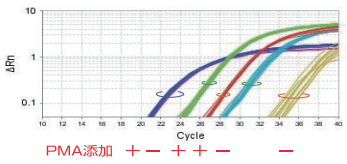


❸将数据的误差考虑在内进行分析体系的质量评价

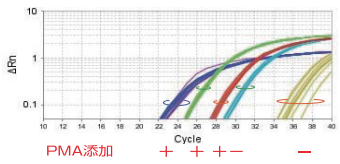
将 HeLa S3 细胞接种到 96 孔板中， 每孔加入 2×10⁴ 个细胞，加 100nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)，培养 24 小时，用 PBS(-) 洗涤 PMA 处理过的及未处理的各 12 个孔的细胞，用 *SuperPrep*® II Cell Lysis Kit for qPCR(Code No. SCQ-401) 处理后进行 cDNA 的合成。得到 cDNA 以后，使用 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix(Code No. QPS-101)，对 IL-6、IL-1β、*β*-actin 基因进行 TaqMan® 探针分析（按 n=12 进行实验）。同样，使用 B 公司的同类产品进行 qPCR(逆转录与 qPCR 试剂也用 B 公司试剂盒中附带的产品)。IL-6、IL-1β 基因的 Ct 用 *β*-actin 基因进行校正（△Ct），计算有无 PMA 处理的差异（△△ Ct）。最后计算出 Z'-factor 并进行比较。

Z'-factor ： 是将数据的误差考虑在内，以高通量分析体系质量为标准的数值。通常认为 0.5 以上是良好的结果。计算公式如下。Z'-factor = 1-3×(ΔCt(+) 标准偏差 +ΔCt(-) 标准偏差) / |ΔΔCt|

SuperPrep® II



B公司试剂



IL-1β		Ct (IL-1β)	ΔCt (IL-1β-β-actin)			
	PMA	平均值	平均值	标准差	Δ Δ Ct	Z'
SuperPrep® II	(＋)	27.83	5.93	0.18	-6.81	0.66
	(－)	34.85	12.75	0.59		
B公司试剂	(＋)	28.42	5.01	0.28	-7.38	0.59
	(－)	35.98	12.39	0.74		

IL-6		Ct (IL-6)	ΔCt (IL-6-β-actin)			
	PMA	平均值	平均值	标准差	Δ Δ Ct	Z'
SuperPrep® II	(＋)	25.35	3.45	0.20	-4.05	0.66
	(－)	29.60	7.50	0.26		
B公司试剂	(＋)	25.64	2.24	0.19	-3.94	0.64
	(－)	29.76	6.18	0.29		

结果表明：虽然两种试剂得到的 Z'-factor 都超过了良好分析体系的标准，但是使用本公司的 *SuperPrep*® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401) 搭配 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code: QPS-101) 试剂时，比其他公司的试剂得到了更高的 Z'-factor，可见是相对质量更高的分析体系。

➔ 相关产品

❶ 高效率 1-step qRT-PCR Kit

THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit	QRZ-101	100 次份	¥2,400	→ 1-8 页
RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix 系列	-	-	-	→ 1-12 页

最适用于 Realtime PCR 用 cDNA 合成的预混型逆转录试剂。

Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒 完全预混型

ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix 系列

ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix		
Code: FSQ-201	200次份	￥2,000

ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(含去除基因组 DNA 的组分)		
Code: FSQ-301	200次份	￥2,800

ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix 系列是使用高效率逆转录酶 ReverTra Ace® （→ 3-14 页）开发的 Realtime PCR 用的逆转录反应试剂盒。将以往的 ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Code No. FSQ-101) 完全预混之后的产品是 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (Code No. FSQ-201)，



在此基础上，为了能简便地配制不含基因组 DNA 的 cDNA，添加了能强力分解 DNA 的 gDNA Remover 的组分，该产品为 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code No. FSQ-301)。

产品内容:

<FSQ-201>

5×RT Master Mix	400 μl × 1 支
5×RT Master Mix no-RT Control	40 μl × 1 支
Nuclease-free Water	1000 μl × 2 支

<FSQ-301>

gDNA Remover	10 μl × 1 支
4×DN Master Mix	440 μl × 1 支
5×RT Master Mix II	400 μl × 1 支
5×RT Master Mix II no-RT Control	40 μl × 1 支
Nuclease-free Water	1000 μl × 2 支

※10 μl 反应体系情况下，各可以使用 200 次。

保存:

-20°C

➔ 特 征

❶完全预混型试剂

本产品为完全预混型试剂，放置于 -20°C也不会冻结。只要添加模板 RNA 与水，就可以简便高效率地合成 cDNA，且重复性良好。

❷容易配制逆转录反应 (-) 对照

因为添附有预混型 no-RT 对照，能够方便地配制逆转录反应 (-) 对照。

❸可得到更广的可定量扩增区域

将 Oligo dT 与 Random Primer 按最适比例预混，可均一、高效地在 RNA 全序列范围内进行逆转录反应，因此可得到更广的可定量扩增区域。

❹与 Realtime PCR 试剂的配合性良好

采用了对 Realtime PCR 反应体系影响最小的组分，即使在 PCR 中添加最多 20% 的逆转录反应液，也可以得到很高的直线相关性。最适用于表达量少的 mRNA 的高灵敏度检测。

❺简便、迅速地去除基因组 DNA

只要依次添加去除基因组 DNA 的试剂和逆转录反应试剂，约 20 分钟就可以配制不含基因组 DNA 的 cDNA。【ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code No. FSQ-301)】

➔ 用 途 : Realtime PCR 用 cDNA 的合成

➔ 说 明

ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (Code No. FSQ-201)是使用高效率逆转录酶ReverTra Ace®（→ 3-14 页）开发的 Realtime PCR 用的逆转录反应试剂盒，是含有逆转录反应必需的全部组分的 5× 浓度的完全预混型试剂，只要添加模板 RNA 与水，就能迅速地开始反应。另外，通过优化组分，适用于作为 Realtime PCR 目的基因的短链 cDNA 的合成，因此可以在短时间内高效率地配制适用于 Realtime PCR 的 cDNA。

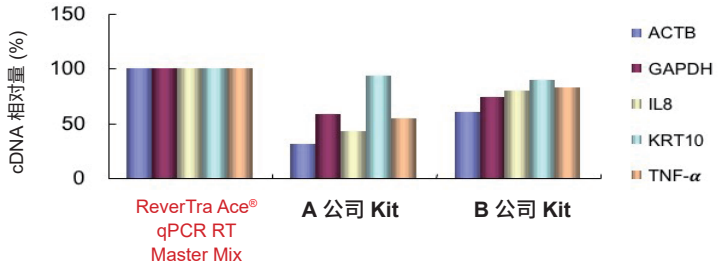
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code No. FSQ-301)中添附了能强力分解 DNA 的 gDNA Remover，在逆转录反应前对模板 RNA 进行处理，就可以简便地配制无基因组 DNA 的 cDNA。最适用于待检测目的基因中存在假基因，或在跨越内含子位置不能设计引物，以及模板 RNA 中残存有基因组 DNA 污染等问题时的 Realtime PCR 实验。

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

➔ 结果示例

❶ 与其他公司预混型 cDNA 合成试剂的逆转录反应效率（cDNA 合成量）比较

以 HeLa total RNA 100ng 为模板，按各公司试剂盒的推荐条件进行逆转录反应，接着用 Realtime PCR 对 5 种目的基因进行定量。结果显示，用本试剂盒可以得到最高的得量。



(1) cDNA 合成

试剂：ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (Code No. FSQ-201) 及其他公司同类型（预混型）产品

模板：HeLa total RNA 100ng/10μl 反应体系

条件：根据各公司试剂盒推荐的条件进行

(2) Realtime PCR

试剂：THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No. QPS-201)

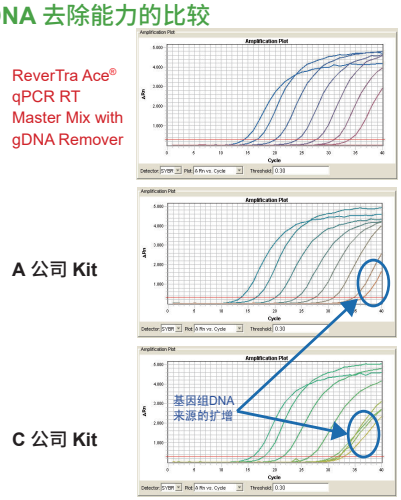
模板：上述 cDNA 2μl/20μl 反应体系（添加量 10%）

Target: 代表基因 5 种

仪器：Applied Biosystems 7900HT

❷ 与其他公司同类型产品基因组 DNA 去除能力的比较

在 HeLa total RNA 中添加过量的人基因组 DNA，与其他公司同类型试剂盒进行基因组 DNA 去除能力的比较模拟实验。结果显示，ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 在基因组 DNA 去除方面效果更加显著。



(1) cDNA 合成

试剂：ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code No. FSQ-301) 及其他公司同类型试剂盒 2 种

模板：HeLa total RNA (0.1pg, 10pg, 100pg, 1ng, 10ng, 100ng, 1μg)+ 人 gDNA 100ng/20μl 反应体系

条件：根据各公司试剂盒推荐的条件进行

(2) Realtime PCR

试剂：THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No. QPS-201)

模板：上述 cDNA 2μl /20μl 反应体系（添加量 10%）

Target: ACTB(188bp)

仪器：Applied Biosystems 7900HT

基本反应条件：

<FSQ-201>

<RNA 变性 >

将 RNA 置于 65°C，5min.

↓

置于冰上

<cDNA 的合成 >

Nuclease-free Water	Xμl
5×RT Master Mix	2μl
RNA template	1pg~1μg
Total volume	10μl

↓

37°C，15min.

98°C， 5min.

4°C，hold

<FSQ-301>

<RNA 变性 >

将 RNA 置于 65°C，5min.

↓

置于冰上

<gDNA 去除反应（DNase）>

Nuclease-free Water	Xμl
4×DN Master Mix（已添加 gDNA Remover）	2μl
RNA template	0.5pg~0.5μg
Total volume	8μl

↓

37°C，5min.（4°C）

<cDNA 的合成 >

上述反应液	8μl
5×RT Master Mix II	2μl
Total volume	10μl

↓

37°C，15min.

98°C， 5min.

4°C，hold

➔ 相关产品

❶ 高效率 Realtime PCR Master Mix

THUNDERBIRD® qPCR Mix 系列	-	-	-	→ 1-19 页
Realtime PCR Master Mix 系列	-	-	-	→ 1-21 页
KOD SYBR® qPCR Mix	QKD-201	1.67ml×3 支	¥2,450	→ 1-13 页

❷ 高效率逆转录酶

ReverTra Ace®	TRT-101	10,000U	¥800	→ 3-14 页

经过最优化的最适用于合成 Realtime PCR 用 cDNA 的逆转录试剂盒全新登场!

Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒

ReverTra Ace® qPCR RT Kit

Code: FSQ-101　200次份 × 1　¥1,500

最适于 Realtime PCR 用模板 cDNA 合成的简便、高效率的逆转录试剂盒。



➔ 特　征

❶超群的 cDNA 合成效率

通过 mix primer(Oligo dT 和 Random primer) 的最优化及 Buffer 的改良，可实现高效率的逆转录反应。

❷短时间 • 简单的实验步骤

逆转录反应仅需 15 分钟即可完成。即便是要去除对 Realtime PCR 反应有抑制的残留的模板 RNA，也无须追加 RNase H 处理。

❸提高了与 Realtime PCR 试剂的适合性

通过改良，使带入到 Realtime PCR 反应体系的逆转录反应液的影响降到最小。

➔ 用　途 : Realtime PCR 用 cDNA 的合成

➔ 说　明

本试剂盒由于使用了高效率逆转录酶「ReverTra Ace®（→ 3-14 页）」，具有非常出色的反应效率。另外，为了使带入到 Realtime PCR 反应体系中的逆转录反应液的影响降低到最小，本产品对组成成分进行了改良。即便带入最大 20%(V/V) 的液量，也能显示良好的扩增线性。因此，最适合用于检测低拷贝 mRNA。
除此之外，由于精简了试剂盒的构成，可非常简便地进行操作。

➔ 结果示例

❶与其他公司产品的 cDNA 合成量比较

以来源于 HeLa 细胞的 total RNA 100ng 为模板，根据各公司试剂盒的推荐条件进行逆转录反应。在 Realtime PCR 反应液 [本公司 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix（→ 1-12 页）] 中分别加入上述的逆转录反应液各 1%(V/V)，用 Realtime PCR 对 β-Actin 和 Polymerase ε 的 cDNA 量进行定量。结果可见，在使用本试剂盒的情况下，两个目的片段都有最高的检测灵敏度。

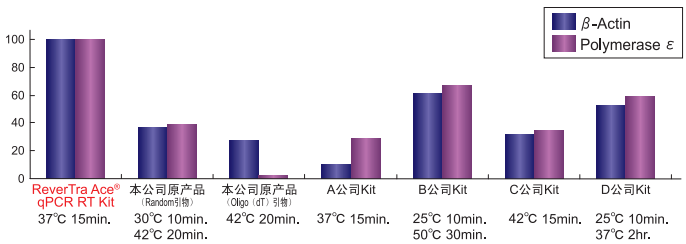


图 1. cDNA 合成量比较
图下的数值为逆转录反应的温度与时间

产品内容:

<FSQ-101>

5×RT Buffer*	400 μl
Enzyme Mix	100 μl
Primer Mix	100 μl
Nuclease-free Water	1ml × 2 支

*5 × RT Buffer 溶解时，可能会出现白色沉淀，但不影响其品质。请使用振荡器等仪器使其混合均匀，等完全溶解之后再使用。

保存:

-20℃

参考文献:

1) M.Hatta et al., *Intl.J.Mol.Med.*, **9**:147-152(2002)

基本反应条件:

<RNA 的变性 >*

将 RNA 在 65℃下变性 5min.
↓
迅速置于冰上

* 此步处理对于容易形成复杂高级结构的 RNA 可以提高逆转录的效率。

<cDNA 的合成 >

灭菌蒸馏水	X μl
5 × RT Buffer	2 μl
RT Enzyme Mix	0.5 μl
Primer Mix	0.5 μl
RNA	0.5pg~1 μg
Total volume	10 μl

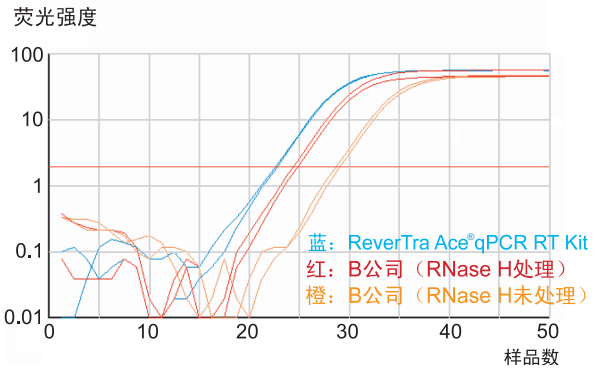
↓
37℃，15min.
98℃，　5min.

TEL: 021-5879-4900　FAX: 021-5879-4901　E-mail: tech@bio-toyobo.cn　URL: http://www.bio-toyobo.cn　营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

❷RNaseH 处理与否对检测灵敏度影响的比较

以来源于 HeLa 细胞的 total RNA 100ng 为模板，使用本试剂盒及另外添附 RNaseH 的 B 公司试剂盒，按各自推荐的实验步骤进行逆转录反应（B 公司试剂盒分别按 RNaseH 处理和未处理两种方法进行）。然后，按和结果示例 1 同样的方法检测 β-Actin 的扩增效果。结果显示，用 B 公司的试剂盒 (RNaseH 未处理)，检测效果大幅下降，而用本试剂盒进行反应，即便不追加 RNaseH 处理也能显示出很高的扩增效率。已经过实验证明，用本试剂盒 RNaseH 处理与否灵敏度相等。

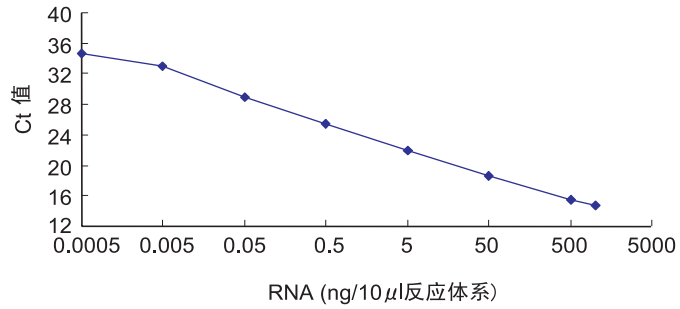
※ 本试剂盒不包含 RNaseH 处理步骤。



RNase H 处理与否对检测灵敏度影响的比较

❸模板 RNA 的添加量对合成效率影响的探讨

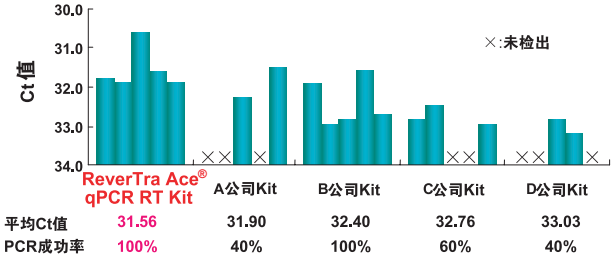
在 ReverTra Ace® qPCR RT Kit 10μl 反应体系中，分别添加 0.5μg~0.5pg 的 HeLa total RNA，采用和结果示例 2 同样的方法进行 cDNA 的合成并比较。结果可见，在探讨的范围内，模板 RNA 的量和 cDNA 的得率密切相关，但无论模板 RNA 量的多寡，仍可维持很高 cDNA 合成效率。由此可见，在目标片段浓度有差异的样品之间，逆转录反应效率的变化并不大，因此可将定量结果的误差控制在最小范围内。



模板 RNA 的添加量对合成效率的影响

❹低表达量基因检测效率的比较

对 HeLa 细胞系的低表达量 TNF-α 基因的检测效率进行比较。用各公司的试剂盒，对来源于 HeLa 细胞的 Total RNA 100ng 进行逆转录，然后将其添加到 Realtime PCR 反应液 [使用本公司的 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix] 中，使其达到约 2%，做 5 个重复，对 Ct 值和 PCR 成功率进行比较。结果可见，虽然由于 TNF-α 的表达量很低，所有反应的 Ct 值均超过了 30，但使用本试剂盒，Ct 值更低更好，且 PCR 的成功率为 100%。而使用其他公司的试剂盒，存在 Ct 值高而 PCR 成功率低的倾向。



TNF-α 基因检测效率的比较

➔ 相关产品

❶ 高效率 Realtime PCR Master Mix

THUNDERBIRD® qPCR Mix 系列	-	-	-	→ 1-19 页
Realtime PCR Master Mix 系列	-	-	-	→ 1-21 页
KOD SYBR® qPCR Mix	QKD-201	1.67ml×3 支	¥2,450	→ 1-13 页

使用改良型 M-MLV 逆转录酶的高效率 cDNA 合成试剂盒。

高效率 cDNA 合成试剂盒

ReverTra Ace -α-®

Code：FSK-101　100次份×1　￥1,950

本试剂盒为使用高效率逆转录酶「ReverTra Ace®（→ 3-14 页）」的高效率 cDNA 合成试剂盒。

➔ 特　征

❶高效率

本试剂盒使用高效率逆转录酶「ReverTra Ace®（→ 3-14 页）」，可进行高效率的 cDNA 合成。

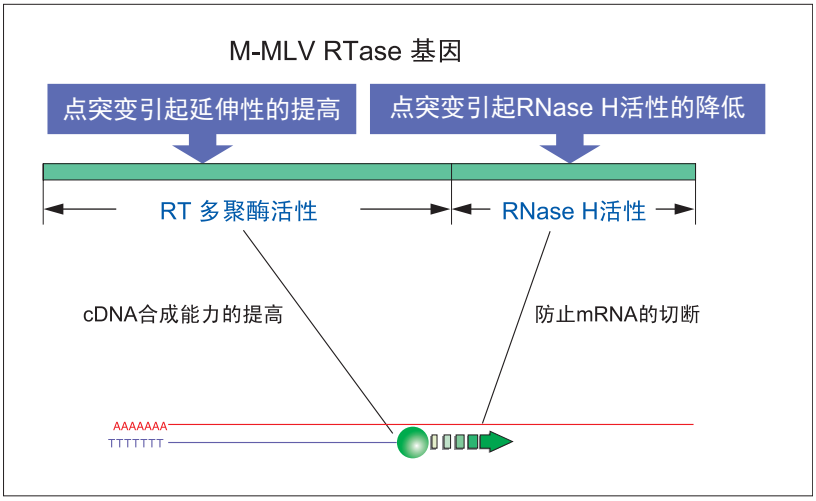
❷广泛的应用范围

可用于使用 Random Primer、Oligo dT Primer、及 Specific Primer 的逆转录反应中。

➔ 用　途：RT-PCR 用 cDNA 的合成

➔ 说　明

本试剂盒使用的逆转录酶 ReverTra Ace® 属于在高温反应性和反应效率方面进行了提高的改良型 M-MLV RTase(RNaseH⁻)，与以往的 RTase 相比，可以合成更长的 cDNA(已确认到可以合成 cDNA 长度最长可达 14kb)。



➔ 几点建议

❶模板 RNA

Total RNA、mRNA、tRNA、rRNA 均可用作模板 RNA。不论采用哪种模板，如果采用高纯度的样品，则均可获得较好的实验效果。

❷对照组

建议在样品首次进行的 RT-PCR 反应时同时加入对照组。该试剂的对照专用的 G3PDH 引物适用于 Human、Mouse、Rat、Swine，可产生 0.45kb 的 PCR 产物。

产品内容：

ReverTra Ace® (10U/μl)	100μl
5×RT Buffer*	400μl
Random Primer	100μl
Oligo(dT)$_{20}$ Primer	100μl
10mM dNTPs	200μl
RNase Inhibitor	100μl
RNase Free H_2O	1.2ml

*5×RT Buffer 与 ReverTra Ace 用 Buffer 组分相同。5×RT Buffer 在溶解时，可能会出现白色沉淀现象，但不影响其品质。此时，请使用振荡器等仪器使其混合均匀，等完全溶解后再使用。

保存条件：

-20°C

参考文献：

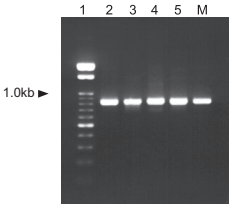
1）M.Hatta et al., *Intl.J.Mol.Med.*, **9:** 147-152(2002)

TEL: 021-5879-4900　FAX: 021-5879-4901　E-mail: tech@bio-toyobo.cn　URL: http://www.bio-toyobo.cn　营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

➔ 结果示例

❶ 用于 PCR 反应的酶的比较

采用 ReverTra Ace -α-® 以 HeLa Total RNA(1 μ g) 为模板，在进行 1st strand cDNA 合成反应后，采用各种 PCR 酶，以 β-actin(838bp) 为目的片段进行 PCR 反应。
1st strand cDNA 合成反应在 20 μ l 的溶液中 42°C下反应 20min.，在 99°C下进行 5min. 的失活。然后，使用全量的 cDNA 合成反应液，在 100 μ l 的溶液中用 2.5U 的 PCR 专用酶进行 PCR 反应。
结果显示，ReverTra Ace -α-® 的反应产物可适用于各种 DNA 多聚酶的 PCR 反应。



M : 100bp Ladder
1 : rTth DNA Polymerase
2 : rTaq DNA Polymerase
3 : A公司的改良型Taq DNA多聚酶
4 : B公司的改良型Taq DNA多聚酶
5 : KOD Dash

基本反应条件：

<cDNA 合成 >	
灭菌蒸馏水	X μl
模板 RNA	
Total RNA	100-1000ng
mRNA	10-100ng
引物	
Oligo(dT)$_{20}$	1 μl
Random	1 μl
Gene Specific	10pmoles*
5×RT Buffer	4 μl
10mM dNTPs	2 μl
ReverTra Ace®	1 μl
RNase Inhibitor	1 μl
Total Volume	20 μl

* 该引物与 PCR 3' 引物(与 anti-sense 链具有相同的序列)相同

30°C	10min.*
42°C	20min.
99°C	5min.

* 该步骤仅在使用随机引物时才需要。

➔ 相关产品

❶ RT 反应用的引物				
10mM dNTPs Mixture	NTP-301	0.2ml×1 支	¥200	→ 2-39 页
Oligo(dT)$_{20}$	FSK-201	1nmole	¥200	→ 3-13 页
Random Primer(9mer)	FSK-301	2.5nmoles	¥200	→ 3-13 页
❷ 高效率逆转录酶				
ReverTra Ace®	TRT-101	10,000U	¥800	→ 3-14 页
❸ Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒				
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	FSQ-301	200 次份	¥2,800	→ 3-8 页
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix	FSQ-201	200 次份	¥2,000	→ 3-8 页
ReverTra Ace® qPCR RT Kit	FSQ-101	200 次份	¥1,500	→ 3-10 页
❹ RNase Inhibitor				
RNase Inhibitor Recombinant type	SIN-201	25,000U	¥300	→ 3-16 页

对 M-MLV RTase 进行了改良。提高了延伸性、反应效率及高温反应性。

高效率逆转录酶

ReverTra Ace®

Code：TRT-101　10,000U × 1支　￥800

本酶是对 M-MLV 逆转录酶改良后的高效率逆转录酶。提高了延伸性、反应效率及高温反应性。

➔ 特 征

❶提高了延伸性

在 M-MLV RTase 的 RNaseH 活性区域内导入了点突变、去除了 RNaseH 活性，延伸性有了明显的提高。

❷提高了反应效率和高温反应性

在 M-MLV RTase 的 DNA 合成区域中导入了点突变，及改良了反应组成，提高了反应效率和高温反应性。

❸最适合于 RT-PCR

适合更多种 RT 反应，尤其适用于 RT-PCR。

➔ 用 途：第一链 cDNA 的合成

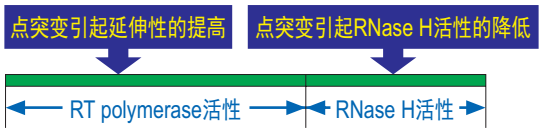
➔ 说 明

RNaseH 活性在 cDNA 合成中，会分解作为模板 / 引物的 DNA-RNA 杂交体中的 RNA，导致反应效率的下降。

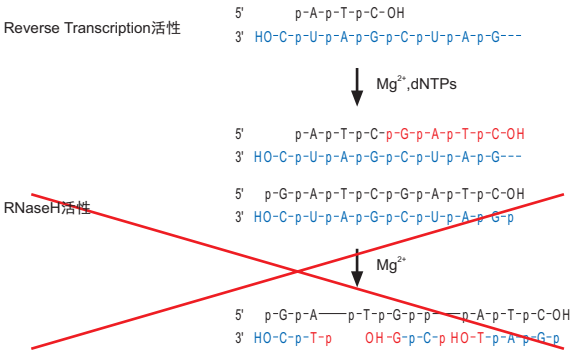
ReverTra Ace® 在 M-MLV(Moloney Murine Leukemia Virus)RTase 基因的 RNaseH 活性区域和 DNA 合成区域中导入了本公司独特的点突变，在改变了酶机能的同时，对缓冲液也进行了最优化，实现了更好的高温反应性、延伸性和反应效率。

另外，RNA 的高级结构也阻碍了 RTase 反应的正常进行，给 cDNA 合成带来了困难。由于提高了 RTase 的高温反应性，故可通过提高反应温度而缓和模板 RNA 的高级结构，以促进 RTase 对 cDNA 的合成反应。

本酶具有比 deletion 型 M-MLV RTase 高 4 倍的比活，可进行高效率的 RT-PCR 反应。



➔ 原 理



➔ 几点建议

❶反应温度

本酶通常在 42℃下进行反应。为了缓和 RNA 高级结构的影响而需提高反应温度时，须注意引物的结合效率。使用随机引物时，请先在 25-30℃下温育 10 分钟后再开始反应。

产品内容：

<TRT-101>

ReverTra Ace®(100U/μl)	100μl
5×Buffer*	1ml

*5×Buffer 中不包含 dNTPs(参照相关产品)。5×RT Buffer 在溶解时，可能会出现白色沉淀现象，但不影响其品质。此时，请使用振荡器等仪器使其混合均匀，等完全溶解后再使用。

组成：

50mM	Tris-HCl(pH7.5)
100mM	NaCl
0.1mM	EDTA
10mM	DTT
0.01%	Nonidet P-40
50%	Glycerol

活性的定义：

以Poly(rA)：Oligo(dT)$_{20}$为模板/引物，在42℃下，10分钟内摄入1nmole的dTTP使成为酸不溶性沉淀物时所需的酶量为1U。

来源：

E.coli 重组体

保存条件：

-20℃

纯度：

50U的本酶和0.2μg的MS2 RNA在42℃下反应1小时，RNA电泳模式未见变化。

参考文献：

1) K.Miyazaki et al., *J.Bacteriology*., **185:** 2219-2226(2003)
2) A.Nezu et al., *Biochem.J.*, **263:** 59-66(2002)
3) S.Nakamura et al., *J.Biochem*. (Tokyo), **131:** 241-246(2002)
4) S.Atsumi et al., *EMBO J.*, **20:** 5453-5460(2001)
5) Y.Yabuta et al., *Plant Cell Physiol.*, **41:** 666-675(2000)
6) S.Lee et al., *Gene*, **245:** 253-266(2000)

商品使用文献：

1) T.Ikeda et al., *Endocrinology* **142** (4):1419-1426.(2001)
2) S.Ohuchi et al., *Nucleic Acids Research*, **30**(15):3473-3480(2002)
3) K.Minami et al., *Toxicological Sciences*, **87**(1): 296-305(2005)

TEL: 021-5879-4900　FAX: 021-5879-4901　E-mail: tech@bio-toyobo.cn　URL: http://www.bio-toyobo.cn　营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

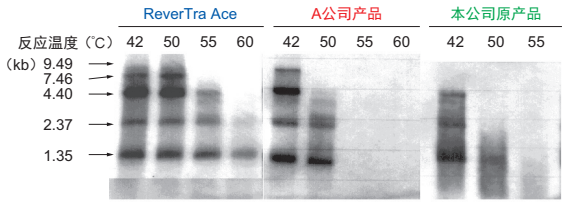
❷mRNA 的热变性

为了缓和高级结构，须先让 mRNA 发生热变性(65℃，5 分钟，立即置于冰上)预处理后再进行反应，这样反应效率可能会有所提高。此时在热变性处理后再加入本酶。

➔ 结果示例

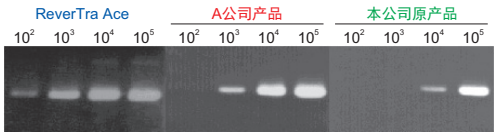
❶在 42~60℃时的 cDNA 合成反应

100U 的本酶同带有 poly(A)Tail 的 RNA 模板 0.4 μg(长度分别为 9.49、7.46、4.40、2.37、1.35kb)及 25pmoles 引物 [Oligo(dT)$_{20}$]，在 42~60℃下进行 30min. 的 cDNA 合成反应。结果显示，在 42℃及 50℃时生成了 9.49kb，55℃生成了 4.4kb，60℃时生成了 2.37kb 的 cDNA 合成产物。



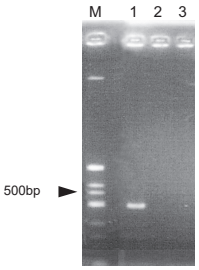
❷cDNA 合成效率的比较

以在 *in vitro* 条件下合成的 G3PDH 的 RNA 10^2~10^5 copies 为模板，使用 G3PDH 的下游引物，在 42℃下进行 20min. 的 cDNA 合成反应。然后，再加入 G3PDH 上游引物，用 rTaq DNA Polymerase(Code No. TAP-201) 进行 PCR 反应。
结果可见，用 ReverTra Ace®，即便是以 10^2 copies 的 RNA 为模板，也可确认到扩增产物。



❸14kb cDNA 合成反应

制备针对 dystrophin mRNA 3' 末端的特异性 cDNA 合成引物，并以人类骨骼肌 poly(A)$^+$ RNA 为模板，在 42℃下，反应 30min.，然后加入对 mRNA 5' 末端特异 PCR 引物组(位于 cDNA 合成引物上游 14kb 处)，用 KOD Dash(Code No. LDP-101) 进行 PCR 实验。
结果显示，使用 ReverTra Ace®，可合成 14kb 以上的 cDNA。



M: φ X174/*Hinc* Ⅱ Marker
1: ReverTra Ace®
2: A 公司产品
3: 本公司原产品

基本反应条件：

<RT-PCR 用 cDNA 合成 >

灭菌蒸馏水	X μl
模板 RNA	
total RNA	100-1000ng
poly(A)$^+$ RNA	50-500ng
Primer	
Oligo(dT)$_{20}$	5pmoles
Random	25pmoles
Gene Specific	5pmoles
5×Buffer	4 μl
10mM dNTPs	2 μl(1mM)
ReverTra Ace®(100U/μl)	1 μl(100U)
RNase Inhibitor	1 μl
Total Volume	20 μl

30℃	10min.*
42℃	20~60min.
99℃	5min.

* 该步骤只在使用随机引物时才需要。

<1st strand DNA 合成 >

灭菌蒸馏水	X μl
poly(A)$^+$ RNA	0.4 μg
Oligo(dT)$_{20}$	25pmoles
5×Buffer	4 μl
10mM dNTPs	2 μl(1mM)
ReverTra Ace®(100U/μl)	1 μl(100U)
RNase Inhibitor	20U
Total Volume	20 μl

42℃	30min.
99℃	5min.

➔ 相关产品

❶RT 反应用的引物

Oligo(dT)$_{20}$	FSK-201	1nmole	¥200	→ 3-13 页
Random Primer(9mer)	FSK-301	2.5nmoles	¥200	→ 3-13 页
❷dNTPs				
dNTPs Mixture(10mM)	NTP-301	各 2 μ moles	¥200	→ 2-39 页
❸RNase Inhibitor				
RNase Inhibitor Recombinant type	SIN-201	25,000U	¥300	→ 3-16 页
❹高效率 cDNA 合成试剂盒				
ReverTra Ace -α-®	FSK-101	100 次份	¥1,950	→ 3-12 页

与 RNase A 结合抑制 RNase 的活性。最适用于 RT-PCR。

RNase Inhibitor

Recombinant type | Code：SIN-201 | 2,500U × 1支 | ￥300
<工业包装请询价 >

本酶是针对 Ribonuclease A(RNase A) 蛋白质性的抑制剂。逆转录反应时使 RNA 保持稳定。

➔ 特 征

❶在较广的 PH 值范围内保持活性
在 DTT 存在下，可在 PH 5~8 的环境下使用。

➔ 用 途

❶在 cDNA 的合成及 *in vitro* 翻译等使用 RNA 的实验中使 RNA 保持稳定
❷在 RNA 探针的制备及 *in vitro* 翻译等产生 RNA 的实验中使 RNA 保持稳定

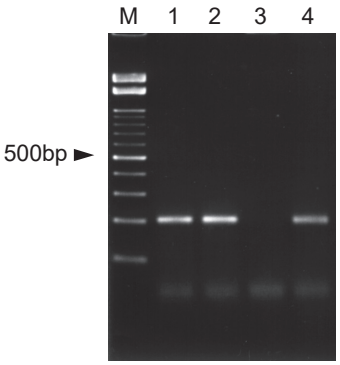
➔ 说 明

本酶是人胎盘来源的、分子量为 51kDa 的重组蛋白，与 RNaseA 以 1：1 的比例形成复合体，对 RNase 的活性表现出可逆非拮抗性抑制作用。
特别在 RT-PCR 中的 RTase 反应时添加本产品，可以得到稳定的 RT-PCR 结果。

➔ 结果示例

❶RNase Inhibitor 在 RT-PCR 反应中的效果

使用 MagExtractor™ -RNA-(Code No. NPK-201F) 从 HL60 细胞提取 RNA 来进行 RT-PCR。
分别在加入和不加入 RNase A 的条件下，用随机引物进行 cDNA 合成，然后用 Human IL-8 RT-PCR Primer Set 来进行 PCR。
结果显示，样品中即使存在 RNase，加入 RNase Inhibitor 后 RNA 也未见分解，能顺利进行 RT-PCR 反应。



M：100bp Ladder
1：RNase 不添加、RNase Inhibitor 不添加
2：RNase 不添加、RNase Inhibitor 添加
3：RNase 添加、RNase Inhibitor 不添加
4：RNase 添加、RNase Inhibitor 添加

产品内容：
RNase Inhibitor(20~40U/μl)

组成：

20mM	Hepes-KOH(pH7.6)
50mM	KCl
8mM	DTT
50%	Glycerol

活性的定义：
抑制5ng的RNase A活性的50%的酸可溶性核糖核酸酶进行纯化所需要的酶量为1U。

来源：
E.coli 重组体 (Recombinant type)

保存条件：
-20°C

比活性：
100U/μg protein

参考文献：
1) J.Sambrook et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Laboratory(1982)
2) G.Scheele, and P.Blackburn, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **76:**4898-4902(1979)
3) P.Blackburn et al., *J.Biol.chem.*, **252:** 5904-5910(1977)
4) P.Blackburn, and B.Jaikhani, *J.Biol.Chem.*, **254:** 12488-12493(1979)

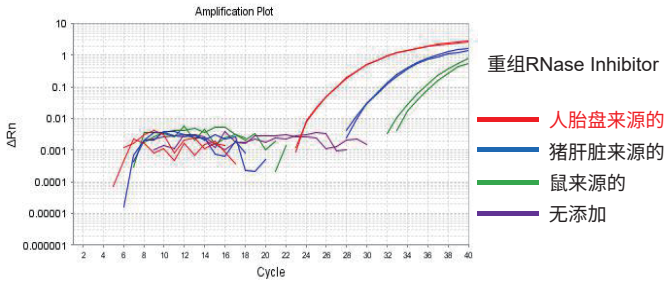
备注：
本产品一般在其他酶的反应 buffer 中进行使用，但反应液中的DTT浓度至少要有1mM。其反应液的pH值最好在5.0~8.0之间。

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

❷不同来源的 RNase Inhibitor 使用效果对比

往 2500 个 U937 细胞中分别加入人胎盘（TOYOBO）、猪肝脏、鼠来源的重组 RNase Inhibitor 后，用蛋白酶 K 裂解处理，随后以此裂解液为模板合成 cDNA，用荧光定量的方法测定各自的基因表达量。

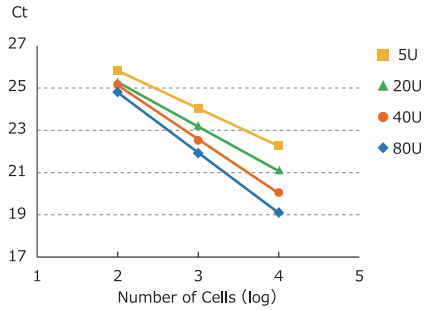
结果显示，使用人类胎盘来源的重组 RNase Inhibitor 时，能够得到的 cDNA 量最多。由此得出，根据 RNase Inhibitor 来源的差异，抑制效果将会有不同，相比其他动物来源的 RNase Inhibitor，人胎盘来源的 RNase Inhibitor 抑制效果更佳。



❸不同添加量的 RNase Inhibitor 在 RT-qPCR 中的效果

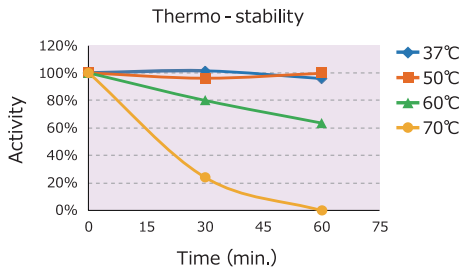
将高活性的 RNase U937 细胞分为三组，数量分别为 100，1,000，10,000 个，每组均进行加入 5，20，40，80U 四种不同浓度 RNase Inhibitor (Code No.SIN-201) 的添加测试，细胞裂解后合成 cDNA，并进行荧光定量分析。

分析 Ct 值后得出，随着 RNase Inhibitor 量的增加，Ct 值相应减少。由此可见，如果添加足量的 RNase Inhibitor，可以抑制 RNA 降解，提高实验精度。



❹ 热稳定性测试

在 37-70°C温度下将 RNase Inhibitor 进行 0-60 分钟的热处理后，测定其剩余活性。结果得出，即使在 50°C的温度进行 60 分钟热处理的情况下，活性依然保持不变。由此可见，本产品在 30-50°C的温度范围内，可以正常发挥 RNase 抑制作用。



		Incubation time (min.)		
		0	30	60
Temperature	37℃	100%	102%	96%
	50℃	100%	96%	100%
	60℃	100%	80%	64%
	70℃	100%	24%	0%

➔ 相关产品

❶ 逆转录酶

ReverTra Ace®	TRT-101	10,000U	¥800	→ 3-14 页

❷ RNA 多聚酶

Thermo T7 RNA Polymerase 《*TT7*》	TRL-201	7,500U	¥500	→ 4-15 页

cDNA 合成试剂盒选择指导

东洋纺使用高效率逆转录酶 ReverTra Ace® 生产出了各种各样的 cDNA 合成试剂盒。
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	适用	裂解液的稳定性	效率	合成 cDNA 的长度	Master Mix	基因组 DNA 去除	页面
ReverTra Ace -α-®	常规 PCR	-	++	++(>10kb)	-	-	3-14
ReverTra Ace® qPCR RT Kit	qPCR	-	++	++(<5kb)	-	-	3-12
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix	qPCR	-	++	++(<5kb)	√	-	3-10
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	qPCR	-	++	++(<5kb)	√	√	3-10
SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR	从培养细胞裂解液开始的 qPCR	++	+	++(<10kb)	√	√	3-5

「基因重组・克隆」

第 4 章　目录　4-1

➔ 按用途分类的产品流程图　4-2
关于基因克隆　4-3
关于突变导入　4-4

➔ 试剂盒类
TArget Clone /TArget Clone -Plus-　4-6
KOD -Plus- Mutagenesis Kit　4-8
Ligation high　4-10
Ligation high Ver.2　4-11
ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit　4-13

➔ 多聚酶类（PCR 酶以外）
多聚酶比较表　4-14
Thermo T7 RNA Polymerase《*TT7*》　4-15

INDEX

「基因重组・克隆」

{ 按用途分类的产品流程图 }

想进行高效率的基因克隆

产生平滑末端的 DNA 聚合酶（高保真性）

高保真性 PCR 酶 ➔ （2-14 页）

- KOD One® PCR Master Mix 系列
- KOD -Plus- / KOD -Plus- Ver.2
- KOD -Plus- Neo

高成功率 PCR 酶 ➔ （2-22 页）

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

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 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。

突变导入实验

特异部位的突变导入试剂盒

➔ （4-8 页）

- KOD -Plus- Mutagenesis Kit



TA 克隆

高效率 TA 克隆试剂盒 ➔ （4-6 页）

- TArget Clone

扩增产物末端加 A 的 DNA 聚合酶

通用 PCR 酶 ➔ （2-31 页）

- rTaq DNA Polymerase
- Quick Taq® HS DyeMix
- rTth DNA Polymerase

高效率 PCR 酶 ➔ （2-29 页）

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

1. 扩增产物末端形状与 TA 克隆

（1）TdT活性与3'→5'Exonuclease（校正）活性

如第2章所介绍的，在扩增片段的3'末端添加一个碱基（主要是腺嘌呤）的TdT（Terminal deoxynucleotidyl transferase）活性是所有PCR酶所具备的活性。但是，校正活性很强的酶，其扩增产物的末端往往已被平滑化。加A的扩增片段可直接用TA克隆法进行克隆，但被平滑化的扩增片段不能与T载体连接，请务必注意。下表为用本公司代表性PCR酶扩增产物的末端。

表1 各PCR酶扩增产物末端形状的差异

扩增产物末端加 A 的酶	扩增产物末端被平滑化的酶
rTaq DNA Polymerse（→ 2-33 页）	KOD One® Master Mix 系列（→ 2-14 页）
rTth DNA Polymerase（→ 2-34页）	KOD -Plus- / KOD -Plus- Ver.2（→ 2-20 页）
KOD Dash（→ 2-30 页）	KOD -Plus- Neo（→ 2-18 页）
Blend Taq / Blend Taq -Plus- （→ 2-29页）	KOD FX（→ 2-24 页）、KOD FX Neo（→ 2-22 页）、KOD -Multi & Epi-（→ 2-26 页）

※KOD Dash和Blend Taq虽然混有α型PCR酶（→ 2-5页），但混合量较少，因此末端基本上都会加一个碱基。

（2）TA克隆

如上所述，加A的DNA片段可直接用使用T载体（3'末端有一个T碱基突出的载体）的方法【TArget Clone（→ 4-6页）等】进行克隆。

另一方面，平滑末端的扩增产物进行TA克隆时，需要特别的方法。 TArget Clone -Plus-（→ 4-6页）就是为上表右边KOD系列PCR酶的扩增产物直接进行TA克隆而开发的试剂盒。如图1所示，TArget Clone -Plus-中使用了KOD DNA Polymerase（以下称KOD）的中和抗体和Taq DNA Polymerase（以下称Taq）。KOD的耐热性比Taq等要高，PCR反应液中的酶在反应后仍能保持活性。因此，即便在该溶液中加入Taq用来添加碱基，KOD残留的校正活性仍会将DNA末端再次平滑化。为防止该现象，在该试剂盒中加入了KOD的中和抗体。Taq通过TdT活性在PCR产物的3'末端添加一个碱基，KOD的中和抗体抑制校正活性防止末端被再次平滑化，从而使得添加了一个碱基的PCR产物可直接与试剂盒添附的T载体连接。

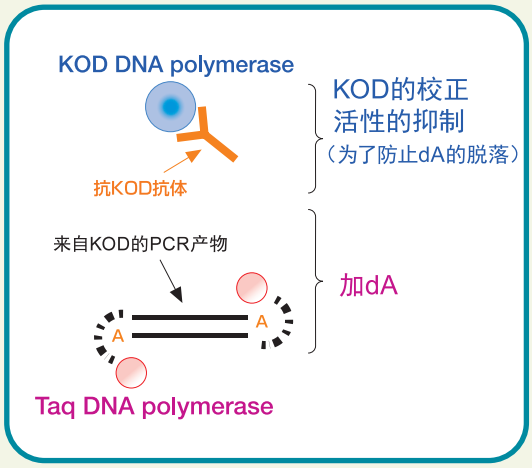


图 1 TArget Clone -Plus- 的原理
抗 KOD 抗体抑制 KOD 酶的校正活性。
同时 Taq 在 PCR 产物的平滑末端添加 dA。

2. 平滑末端克隆

（1）平滑末端克隆的注意点

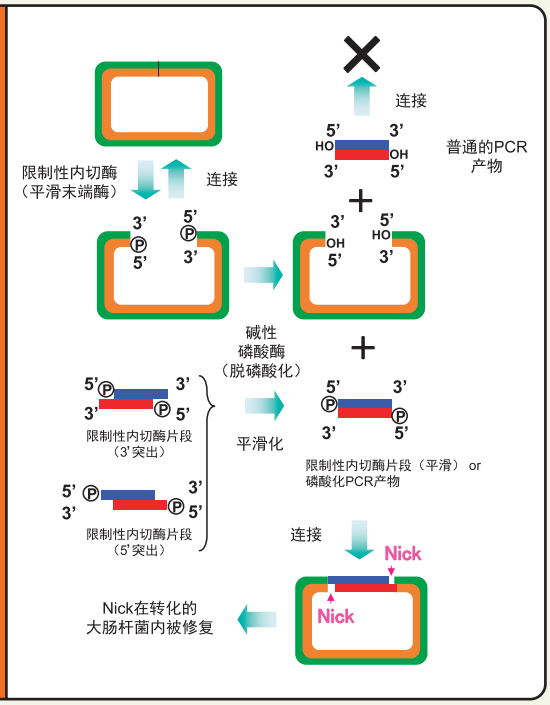
平滑末端DNA片段插入至载体时，虽然可利用甲基克隆位点上的*Sma* Ⅰ、*EcoR* Ⅴ等平滑末端位点，但由于载体之间产生的再结合，会导致克隆效率显著下降。因此，在使用限制酶处理的同时，还要用Alkaline Phosphatase对载体进行脱磷酸化处理。由于DNA的5'末端磷酸化是DNA连接的必要条件，因此经脱磷酸化的载体末端之间不会发生自连接。

这里必须注意的是，对用KOD系列酶扩增得到的已经脱磷酸化的平滑位点的连接。通常PCR中所用的引物的5'末端未被磷酸化，因此，从原理上讲对脱磷酸化位点的连接不可能实现。此时，应将引物预先磷酸化后进行PCR或将PCR产物磷酸化。经常会出现忘记引物未被磷酸化的情况，请务必注意。

另一方面，用限制酶进行酶切后的平滑末端的两端，5'末端一般会被磷酸化，可直接使用。而如果用限制酶进行酶切后得到的是突出末端，即便用聚合酶进行平滑化（Blunting），仍能保持5'末端的磷酸基，可直接与脱磷酸化位点结合。

下页主要讲述用平滑末端位点的一般克隆的流程以及经常使用的磷酸化•脱磷酸化的实验步骤。

平滑末端克隆的流程



Protocol # 1: 引物的磷酸化

【使用试剂】

- 50pmole/μl（μM）以上的Primer溶液
- T4 Polynucleotide Kinase
- rATP ➔稀释为10mM后使用

Primer（50pmole/μl［50μM］）	14μl
10×Protruding End Kinase Buffer	2μl
10mM rATP	2μl
T4 Polynucleotide Kinase（5~20U/μl）*1	2μl
Total	20μl

↓

37°C、1h 反应

↓

95°C、5min（使 T4 Polynucleotide Kinase 失活）

↓ ←添加 50μl 灭菌 Milli-Q 水

10pmole/μl［10μM］作为 primer 溶液使用*2*3

↓

PCR

＊1 T4 Polynucleotide Kinase 按最大允许量添加（最终液量的 10%）。

＊2 直接用在 PCR 反应中。

＊3 即便反复冻融仍能使用。

Protocol # 2: PCR 产物的磷酸化

【使用试剂】

- 纯化PCR产物（平滑末端）
- T4 Polynucleotide Kinase
- rATP ➔稀释为10mM后使用

纯化 PCR 产物	~1μg
10×Blunt End Kinase Buffer	5μl
10mM rATP*1（Code No.ATP-111 稀释后使用）	5μl
T4 Polynucleotide Kinase（5~20U/μl）*1	5μl
Total	50μl

＊1 T4 Polynucleotide Kinase 按最大允许量添加（最终液量的 10%）。

↓

37°C、1h 反应

↓

纯化

Protocol # 3: 载体的脱磷酸化

【使用试剂】*E.coli* Alkaline Phosphatase

纯化载体溶液（限制酶处理后经纯化的溶液）	0.5~2.5μg
10×Buffer	10μl
E.coli Alkaline Phosphatase（0.1~1U/μl）*	10μl
Total	100μl

＊按 5~20pmoles 的 5' 末端 2U 的标准，但按最大量（最终液量的 10%）添加基本上也可顺利地脱磷酸化。

↓

平滑末端、3' 突出末端 ➔60°C、60min.

5' 突出末端 ➔37°C、60min.

↓

用 MagExtractor -PCR & Gel Clean up-（Code No.: NPK-601:➔5-10页）等试剂盒纯化

2 关于突变导入

1. 点突变导入

（1）用iPCR法进行特异性点突变导入的好处

点突变导入法（Site-Directed Mutagenesis）不仅仅用于改变蛋白质的功能，也是向蛋白质插入tag标记、终止子，或是对启动子等顺式作用元件进行分析所必须的手段。在这里，以「KOD -Plus- Mutagenesis Kit（→4-8页）」为中心，介绍一下基于Inverse PCR（iPCR）法的位点特异性突变导入法的实验流程及要领。

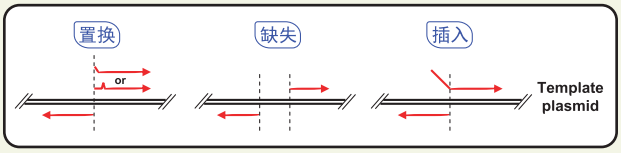


图 2 iPCR 法的引物设计方法

突变导入大致可分为三类。特异性点突变导入方法，除iPCR法外，还有许许多多方法，其中最广泛的是，引物全部或一部分设计为互补性重合，用PCR酶进行热循环反应的突变导入方法。该方法的产物并不是按指数扩增，因而并不是严格意义上的PCR法（这里称为Non-PCR法）。

通过表 2 比较可知，iPCR 法显示了更出色的性能。iPCR 法的难点在于，由于使用了 PCR 法，目的外突变（2nd-site mutation）被导入的概率比 Non-PCR 法高。但 KOD -Plus-Mutagenesis Kit 由于使用了高保真性的 PCR 酶「KOD -Plus- 」，目的外突变导入的值与其他公司 Non-PCR 法试剂盒差不多。

	iPCR法	Non-PCR法
置换	◎	○ 不能使用混合碱基引物
缺失	◎	△ 不能导入大的缺失
插入	◎	△ 不能插入10碱基以上的片段

（2）使用KOD -Plus- Mutagenesis Kit进行突变导入的顺序

使用该试剂盒进行突变导入的步骤如下。首先，①以Plasmid DNA 为模板，使用导入了突变的引物进行Inverse PCR（想取得缺失突变体时，可在该缺失区域的外侧设计引物）。其次，②在PCR产物中添加限制酶 *Dpn* I，消化质粒模板【*Dpn* I只有在识别位点（GATC）中的腺嘌呤被甲基化时才会对其进行切断。用一般的Dam甲基（+）的大肠杆菌（JM109、DH5α等）制备的质粒由于已被甲基化，因而会被*Dpn* I切断】。最后，③直链状的质粒PCR产物通过自连接（Self-ligation）环化以后，可用于转化大肠杆菌，取得突变导入克隆。

2. iPCR 法进行引物设计的要领

右图是进行引物设计注意事项。此外，针对导入的各种突变，还需参照如下说明。

【置换】

通常进行最多的是1~5个碱基的置换。

另外，由于KOD -Plus- Mutagenesis Kit采用了Inverse PCR法，可通过导入混合碱基制作氨基酸点突变库。图3为制作氨基酸点突变库引物例。在这里，NNN无须完全设定在5'末端，设定在5'末端附近也没有问题。而且，如果设定在5'末端附近，由于被连接末端的序列被统一，可统一克隆时的连接效率。

【缺失】

缺失的导入是最大程度发挥Inverse PCR法优点的突变导入之一。引物的设计只要使欲缺失区域不要扩增即可，无需在引物中导入突变。因此，用该方法可以制作向广泛区域移动的缺失突变体。

【插入】

用采用Inverse PCR法的KOD -Plus- Mutagenesis Kit可非常容易地插入。图4为His-tag序列插入用引物例。在这里，只在一条引物上设计了tag序列，如果担心插入序列较长而导致PCR效率低下，也可将插入序列分成两部分，给两条引物都设计tag序列。用该方法，除了tag序列的插入外，也可进行100bp左右的Exon的插入。

• 其他注意点

Dpn I是只能切断被甲基化识别序列的特异性限制酶（不能切断PCR产物）。由于用一般的JM109、DH5α等Dam甲基（+）的大肠杆菌制备的质粒已被甲基化，因而会被*Dpn* I酶切。另外，一般情况下，*Dpn* I反应中用的是TA buffer，但在KOD -Plus-的反应Buffer中也能充分发挥其活性。

引物设计的注意事项

- 突变导入的部位，请设计在引物的 5' 末端，或靠近引物的 5' 末端。
- 引物的 3' 末端与模板 DNA 至少有 20 个碱基（最好 25 碱基以上）匹配。
- 引物超过 50 个碱基，建议使用纯度高的引物（引物较长时，混入 5' 端碱基缺失的不完整引物的可能性较大）。
- 使用 KOD -Plus- Mutagenesis Kit 时，因为设定了 PCR 产物磷酸化步骤，所以引物不必事先磷酸化。

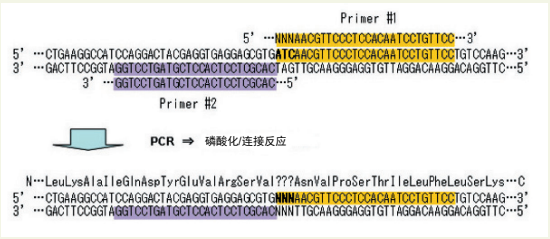


图 3 氨基酸点突变库制作例

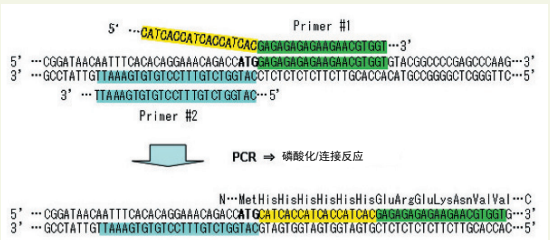


图 4 His-tag 序列插入例

可对 KOD 酶系列扩增的平滑末端 PCR 产物直接进行克隆。

高效率 TA 克隆试剂盒

TArget Clone/ TArget Clone -Plus-

TArget Clone Code: TAK-101 10次份×1 ￥300　　TArget Clone -Plus- Code: TAK-201 10次份×1 ￥380

高效率TA克隆试剂盒。Taq 系列酶扩增的 PCR 产物（可使用 TArget Clone）及 KOD 系列酶扩增的平滑末端 PCR 产物（可使用 TArget Clone -Plus-）可直接进行 TA 克隆。



➔ 特 征

❶快速・高效率

连接反应最快可在 5 分钟内完成。

❷可靠

载体中有 *LacZ*，可进行蓝白斑筛选。

❸方便

在多克隆位点的两端带有转录用的启动子 (T7、T3)，可用于转录产物的配制。

❹可用于平滑末端 PCR 产物 [TArget Clone -Plus-]

对 KOD、KOD -Plus-、KOD -Plus- Ver.2、KOD -Plus- Neo、及 KOD FX、KOD FX Neo、KOD -Multi & Epi-®、KOD One® PCR Master Mix 的 PCR 产物可直接进行克隆。将 PCR 产物与 A-attachment Mix 混合，只需 10 分钟即可完成加 dA 反应。

➔ 用 途

❶普通的 TA 克隆 [TArget Clone]

❷对来自 KOD 酶系列的平滑末端产物进行 TA 克隆 [TArget Clone -Plus-]

TArget Clone	A ═══ A → TA克隆
TArget Clone -Plus-	═══ → A ═══ A → TA克隆 A-attachment mix（60℃・10min） ・抗KOD pol.抗体（KOD活性的抑制） ・Taq pol.（对有TdT活性的末端加A）

➔ 说 明

以 Taq、rTth DNA polymerase、Blend Taq®、KOD Dash 等为基础得到的 PCR 产物的 3' 末端通常带有 dA，可直接进行 T 载体连接。

另外，由于 KOD 系列（KOD DNA Polymerase、KOD -Plus-、KOD -Plus- Ver.2、KOD -Plus- Neo、及 KOD FX、KOD FX Neo、KOD -Multi & Epi-®、KOD One® PCR Master Mix）的 PCR 产物 3' 末端基本上已被平滑化，不能直接对其进行 TA 克隆，因此需使用 TArget Clone -Plus- 中的 A-attachment Mix 在平滑末端添加碱基（主要为 dA）。A-attachment Mix 中含有在平滑末端添加碱基用的 Taq DNA polymerase 和用来中和反应后残留的 KOD 3' → 5' Exonuclease 活性（校正活性）的抗 KOD 抗体。（原理请参照下页图示）。

产品内容：

<TArget Clone>

pTA2 Vector（50ng/μl）	10μl
2×Ligation Buffer	50μl
T4 DNA Ligase	10μl

<TArget Clone -Plus->

pTA2 Vector（50ng/μl）	10μl
2×Ligation Buffer	50μl
T4 DNA Ligase	10μl
10×A-attachment Mix	10μl

保存：

-20℃

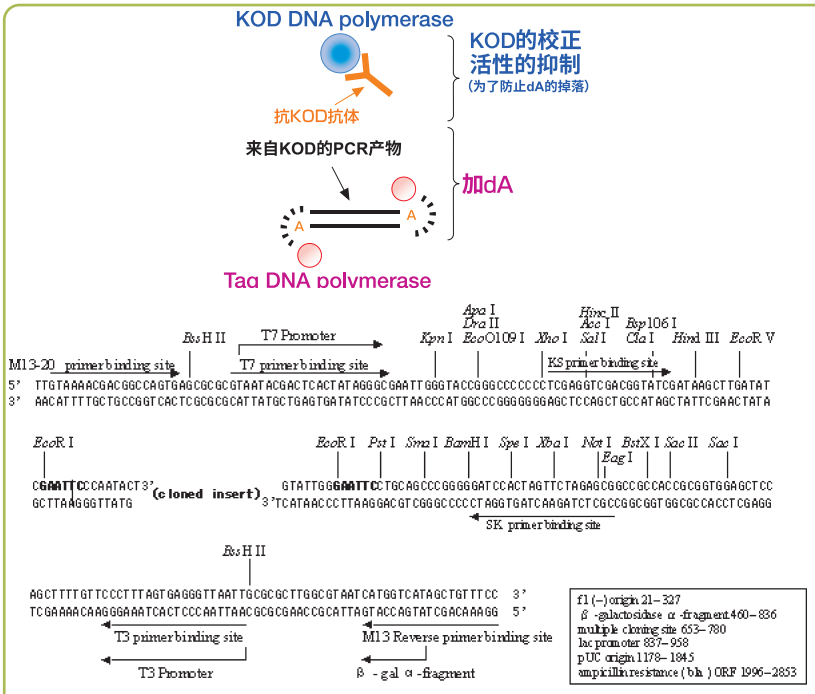
参考文献：

1）H.Mizuguchi et al., *J.Biochem*（Tokyo）, **126:**762-768（1999）

商品使用文献：

1）F.Ge et al., *Journal of Biochemistry,* **143**（5）:603-609.（2008）

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）



pTA2 Vector 的 MCS 构成情况

➔ 几点建议

❶ 采用纯化后 PCR 产物时 A-attachment Mix 的使用方法

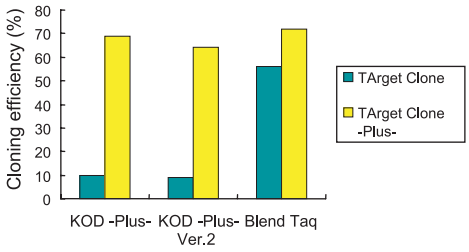
如 PCR 反应后产生杂带，则需对 PCR 产物进行纯化后再使用。此时，添加 A-attachment Mix、dNTP、$MgCl_2$ 和 1×浓度的 PCR Buffer 后再进行反应。

➔ 结果示例

❶ 对各种 PCR 产物进行 TA 克隆的效率比较

高保真性酶：使用 KOD -Plus-、KOD -Plus- Ver.2 及 Blend Taq®，对来自 human genome 的 β-globin 基因 0.5kb 进行 PCR 扩增。然后，分别使用 TArget Clone 及 TArget Clone -Plus- 对未经纯化的 PCR 产物进行 pTA2 Vector TA 克隆。

结果可见，在对 KOD -Plus- 及 KOD -Plus- Ver.2 的扩增产物进行克隆的情况下，如使用 TArget Clone -Plus- 则克隆效率可得到大幅提高。对 Blend Taq® 的扩增产物进行克隆后并比较，可见即便使用 TArget Clone 也可进行高效率的 TA 克隆。



基本反应条件：

<TArget Clone>

灭菌蒸馏水	（3-X）μl
2×Ligation Buffer	5μl
pTA2 Vector(50ng/μl)	1μl
PCR 产物	Xμl
T4 DNA Ligase	1μl
Total Volume	10μl

室温（15~25°C），30min.

<TArget Clone -Plus->

PCR 产物 from KOD	9μl
10×A-attachment Mix	1μl
Total Volume	10μl

60°C，10min.

↓

灭菌蒸馏水	（3-X）μl
2×Ligation Buffer	5μl
pTA2 Vector(50ng/μl)	1μl
上述已处理 PCR 产物	Xμl
T4 DNA Ligase	1μl
Total Volume	10μl

室温（15~25°C），30min.

➔ 相关产品

❶ Target Clone 相关 PCR 酶

Blend Taq® / Blend Taq® -Plus-	-	-	-	→ 2-27 页
KOD Dash	LDP-101	250U × 1 支	¥350	→ 2-30 页
Quick Taq® HS DyeMix	DTM-101	100 次份	¥375	→ 2-31 页

❷ Target Clone -Plus-相关PCR酶

KOD -Plus- / KOD -Plus- Ver.2	-	-	-	→ 2-20 页
KOD -Plus- Neo	KOD-401	200U × 1 支	¥1,000	→ 2-18 页
KOD FX	KFX-101	200U × 1 支	¥1,200	→ 2-24 页
KOD FX Neo	KFX-201	200U × 1 支	¥2,400	→ 2-22 页
KOD -Multi & Epi-®	KME-101	200 次份	¥2,000	→ 2-26 页
KOD One® PCR Master Mix 系列	-	-	-	→ 2-14 页

可适用于数十 bp 的插入（如 Tag 插入）或数百 bp 的缺失突变。

定点突变导入试剂盒

KOD -Plus- Mutagenesis Kit

Code: SMK-101　20次份　￥1,800

本品是基于利用 KOD -Plus- 高保真性的 Inverse PCR 法的位点特异性突变导入试剂盒。Inverse PCR 法以质粒为模板，使用反向引物进行 PCR，对质粒全长进行扩增。此时，通过添加了置换、插入序列的引物，可导入各种突变。



产品内容：

KOD -Plus-（1U/μl）	25μl
10×Buffer for iPCR	125μl
2mM dNTPs	125μl
Dpn Ⅰ	50μl
T4 Polynucleotide Kinase	50μl
Ligation high	250μl
Control Plasmid	10μl
Control Primer #1	10μl
Control Primer #2	10μl

保存：
-20°C

备注：
本试剂盒中用的 KOD -Plus- 与 2-20 页的产品相同。10×Buffer for iPCR 进行了最优化组合，为本试剂盒专用。

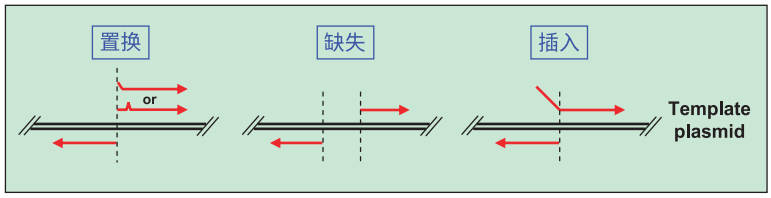
商品使用文献：

1) S.Arai et al., *FEBS Letters*,**581**(29):5649-5657.(2007)
2) Y.Torisu et al., *Cancer Science*, **99**(6):1139-1146.(2008)
3) N.Shinmen et al., *FEBS Letters*. **583**(12):1916-1922.(2009)

➔ 特　征

❶导入突变的多样性

与通常的突变导入相比，本试剂盒可进行数十 bp 的插入（如 Tag 的插入）和数百 bp 的缺失突变。另外，也可通过导入不同的碱基突变来创建氨基酸的点突变体库。



❷导入突变的可靠性

最大可得到 95% 的突变导入效率。另外对可能来自 PCR 差错的 2nd-site mutation（目的突变以外的突变）的可能性降到最低。我们对最大 11kb 的质粒突变导入进行了确认。

❸操作简便性

使用本试剂盒不需要使用磷酸化引物。PCR 产物自身环化时，磷酸化反应和连接反应同时进行，包括转化在内只需简单的三个步骤。

➔ 用　途：定点突变导入（置换、缺失、插入）

➔ 说　明

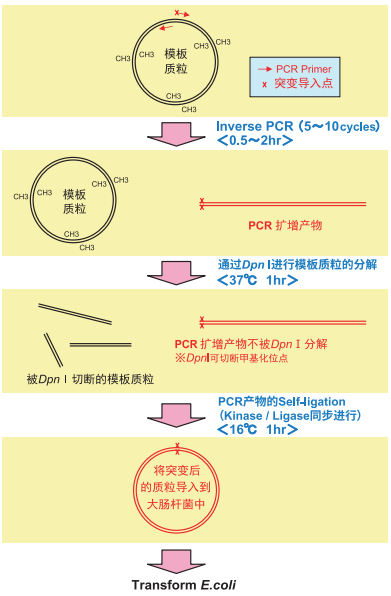
本试剂盒按以下的顺序进行突变导入。

① 以质粒 DNA 为模板，使用导入突变的引物进行 Inverse PCR。如想取得缺失突变体，则可在该缺失领域的外侧设计引物。

② 在 PCR 产物中添加限制性内切酶 *Dpn* Ⅰ，消化模板质粒。（*Dpn* Ⅰ只在识别位点 [GATC] 中的 dA 被甲基化时才对其进行酶切。由于用一般的 Dam^+ 大肠菌株 [JM109、DH5 α 等] 配制的质粒已被甲基化，因而会被 *Dpn* Ⅰ酶切。）

③ 直链状质粒 PCR 产物通过 Self-ligation 环状化，可用于大肠肝菌的转化。

TEL: 021-5879-4900　FAX: 021-5879-4901　E-mail: tech@bio-toyobo.cn　URL: http://www.bio-toyobo.cn　营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）



基本反应条件：

灭菌蒸馏水	X μl
10 × Buffer for iPCR	5 μl
2mM dNTPs	5 μl
Forward Primer	15pmoles
Reverse Primer	15pmoles
模板质粒 DNA	50ng
KOD -Plus-（1U/μl）	1 μl
Total Volume	50 μl

Cycle
94℃， 2min.
↓
98℃， 10sec.
68℃， Xmin. ← 4~10 Cycles

※ 延伸时间 X 根据扩增片段的大小在 1min./kb 左右调整。

※ 循环数也根据扩增片段的大小在 1 循环 /kb 左右调整。初次实验时，可在配制好反应液后分成 2 份分别进行 2 种不同循环数的反应（例：5 循环、10 循环）。

↓
Kination/Ligation
↓
转化

➔ 几点建议

❶ 关于引物的设计

请参见我公司中文网站中关于 iPCR 法下引物设计要领的介绍（→ 4-5 页）。引物不必事先磷酸化。

❷ 关于模板质粒

一般情况下可以使用 JM109、DH5 α 等 Dam⁺ 大肠杆菌来源的质粒。不能使用 Dam Methylase(-) 菌株来源的质粒。

➔ 结果示例

❶ 缺失及插入突变效率的比较

以 7.3kb 的质粒 FLJ32066 为对象，用本试剂盒和 A 公司的 non-PCR 法试剂盒进行 90 碱基的缺失突变，以及用于 6 × His 的 18 碱基的导入。结果可见，用其他公司试剂盒很难做成功的缺失和插入等突变导入，用本试剂盒可高效率地得到突变体。

● 90bp 缺失

	测序的克隆数	有目的突变的克隆数	有目的突变的比例
本试剂盒	**16**	**14**	**88%**
A公司试剂盒	**16**	**7**	**44%**

● 18bp 插入

	测序的克隆数	有目的突变的克隆数	有目的突变的比例
本试剂盒	**16**	**15**	**94%**
A公司试剂盒	**16**	**0**	**0%**

❷ 目的外突变（2nd-site mutation）插入频率的评价

以试剂盒附带的对照质粒（4.3kb）为模板进行突变导入（PCR 8Cycles），从得到的产物中随机选取 24 个克隆，以 2000bp 长度分成几段分别进行测序。结果可见，使用本试剂盒，实际解析的 48000 个碱基中，只有一个目的外碱基发生突变。

	突变导入率	确认的克隆数	总测序碱基数	目的外的突变碱基数	目的外突变插入率（x10^{-5}）
本试剂盒	**＞80%**	**24**	**48000**	**1**	**2.08**
A公司试剂盒	**＞80%**	**24**	**48000**	**2**	**4.16**

➔ 相关产品

❶ 高保真性 PCR 酶

KOD -Plus- / KOD -Plus- Ver.2	-	-	-	→ 2-20 页

高效率单管型连接试剂。只需与样品混合即可，非常方便！

高效率连接试剂

Ligation high

Code: LGK-101　375μl×2支　￥550

本试剂是 T4 DNA 连接酶为主体的高效率单管型连接试剂，广泛地应用于各种 DNA 末端的连接反应。

➔ 特 征

❶简便

用本试剂盒进行反应，只需在 DNA 样品溶液中混入 Ligation high，便可立即进行连接反应。

❷高效率

与单独使用 T4 DNA 连接酶相比，可获得 50 倍以上的效果。

❸高稳定性

经实验确认即使反复进行 50 次的冻结 / 融解，也不会降低连接反应的效率。

➔ 用 途：DNA 连接

➔ 说 明

为了提高反复冻结 / 融解时的稳定性和反应效率，对组成条件进行了最优化。连接反应必需的反应缓冲液、rATP 和 DTT 等已全部都包含在本产品里面，只需加入 DNA 样品溶液的一半到相同量的 Ligation high，就可以得到比单独使用 T4 DNA 连接酶更好的结果。

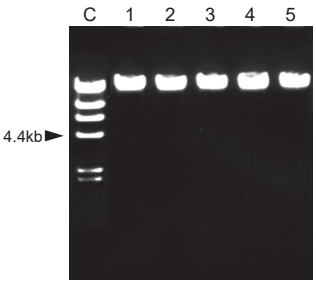
➔ 几点建议

❶关于 TA 克隆

T 载体与 PCR 产物的连接反应，16°C条件下 16 小时以上效果较好。

➔ 结果示例

❶反应时间的探讨



使用 λ/*Hind* III在 16°C下进行连接反应，EtOH 沉淀后进行电泳。
结果显示，Ligation high 在 5 分钟内完成了连接反应。

C: 未处理
1: 5min.
2: 10min.
3: 20min.
4: 30min.
5: 1hr.

产品内容：

Ligation high　375μl×2 支

※1 次使用量为 7.5μl 的情况下，可使用 100 次。

保存：

-20°C

参考文献：

1) R. L.Hawkins et al., *Current Microbiol.*,**38**:335-341(1999)

商品使用文献：

1) H.Kamiya et al., *Nucleic Acids Research*,**28**(7):1640-1646.(2000)
2) H.Kamiya et al.,*Biol.Pharm. Bull.*,**27**(5):621-623(2004)
3) Tatsuya Suzuki et al., *Analytical Sciences*,**23**(1):65-70(2007)

基本反应条件：

载体 DNA+ 目的 DNA　15μl
Ligation high　7.5~15μl
↓
16°C，30-60min.
↓
在 100μl 的感受态细胞中加入 ~10μl 的反应液进行转化。

※ 用电泳获得的产物，需进行脱盐处理或通过乙醇沉淀法等将DNA纯化后再使用。

注意：

作为稳定剂使用的 BSA 可能会形成沉淀。但对反应没有影响。

➔ 相关产品

❶ 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

❷ 高效率连接试剂盒

Ligation high Ver.2	LGK-201	200μl×1 支	¥750	→ 4-11 页

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

TA 克隆效率得到了飞跃性的提高。即便在 -20°C也不会冻结，使用非常简便。

高效率连接试剂

Ligation high Ver.2

Code: LGK-201	750 μl×1支	￥750

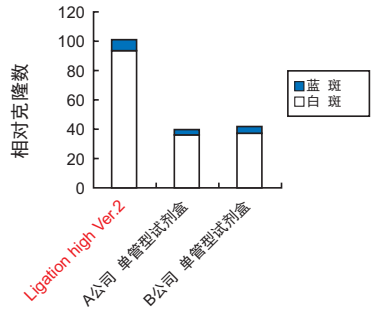
本试剂是 T4 DNA 连接酶为主体的高效率单管型连接试剂。广泛地应用于各种 DNA 末端的连接反应。通过对原产品进行改良，可简便地用于各种用途。



➔ 特 征

❶高效率

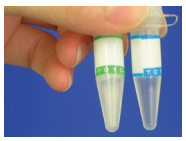
TA 克隆效率得到了大幅度的提高。下图是使用本产品与其他公司试剂盒获得的 TA 克隆效率比较。



❷即便在 -20°C条件下保存也不会冻结

由于本产品在 -20°C状态下也不会冻结，因此从 -20°C冷冻柜中取出后可立即使用，非常节省时间。下面的照片为 -20°C保存下的试剂状态。

[原有产品: Ligation high< 绿 >、本产品 Ligation high Ver.2< 蓝 >]。



❸简便的单管型

使用方法与原有产品一样，只要将试剂和 DNA 片段混合即可，非常简便。

➔ 用 途 : DNA 片段连接反应

➔ 说 明

本产品是在 Ligation high (→ 4-10 页) 基础上进行改良，使用更加简便的高效率单管型连接试剂。将其与 DNA 片段混合，只需短时间的反应即可发生高效率的连接。可广泛应用于突出末端、平滑末端及 TA 克隆等。

产品内容:

Ligation high Ver.2 750 μl × 1支

※ 每次使用量为 3.75 μl 时，可使用 200 次。

保存:

-20°C

参考文献:

1) R. L.Hawkins et al., *Current Microbiol.*,**38**:335-341(1999)

注意:

- 在 -30°C以下长期保存，或在冷冻柜的冷气出风口处保存时，可能会产生冻结。但经实验证明，将其融解后使用不影响活性。产生冻结时，可用手指捏着离心管使其融解，但注意不要使其升温。
- 产生白色沉淀时也可按照上述方法将沉淀溶解后正常使用。

基本反应条件:

载体 DNA+ 目的 DNA 7.5 μl
Ligation high Ver.2 3.75~7.5 μl*
↓
16°C，30min.
↓
在 100 μl 的感受态细胞中加入 ~10 μl 的反应液进行转化。

*TA 克隆时 Ligation high Ver.2 为 7.5 μl。

※ 用电泳获得的产物，需进行脱盐处理或通过乙醇沉淀法等将DNA纯化后再使用。

➔ 几点建议

❶反应时间

一般推荐 16℃、30 分钟。但普通的突出末端连接通常只需 5 分钟即可完成。当平滑末端或 TA 克隆的反应效率低下时，将反应时间延长至 2 小时左右通常可提高连接效率。结果示例 1 的图记载了连接效率与反应时间相关的数据。

❷反应液带入

盐的带入会影响到连接反应。在 TA 克隆时，未经纯化的PCR 产物的带入为 0.5~1μl(15μl 反应体系）时，可获得很高的连接效率。使用 MagExtractor -PCR & Gel Clean up-(→ 5-10 页）进行纯化，TA 克隆可获得更高的连接效率。

❸TA 克隆的效率

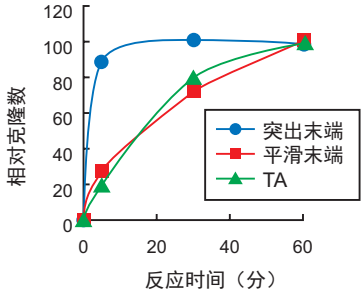
如想获得更高的连接效率，可使用磷酸化的引物进行 PCR。关于引物的磷酸化请参照 4-4 页的相关说明

➔ 结果示例

❶DNA 末端形状与连接效率的关系

在 16 ℃条件下反应时，将 DNA 片段(0.5kb) 的克隆效率与末端形状另外进行比较。结果可见，突出末端的连接约 5 分钟即可完成。而平滑末端及 TA 克隆 30 分钟约完成 70~80%。

另外，平滑末端克隆及 TA 克隆时间超过 1 小时，到 2 小时为止，连接效率会逐渐提高。因此当克隆效率比较低时，可将反应时间提高至 2 小时左右可提高连接效率。

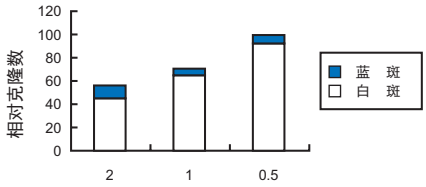


※ 各反应以 60 分钟后的白斑数为 100 作为标准

❷使用未经纯化 PCR 产物的 TA 克隆

将 T 载体 (50ng,25fmol) 和具有良好扩增效率的未纯化 PCR 产物（用 Taq DNA Polymerase 扩增的 0.5kb 片段）按照各种比例混合，在该 DNA 溶液 <7.5μl> 中添加 Ligation high Ver.2<7.5μl>，在 16℃条件下反应 30 分钟。然后，用 10μl 的反应液对 *E.coli* DH5 α 感受态细胞 <100μl> 进行转化，用 LB/Amp(X-Gal) 培养基培养后点克隆数。结果可见，尽量少带入 PCR 反应液可得到良好的结果。

由于用纯化后的 DNA 片段可得到高效率，当效率低下时，可使用纯化后的 PCR 产物。



未纯化PCR产物添加量（μl）〈15μl反应体系〉

以0.5μl的添加量为100作为标准

➔ 相关产品

❶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

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

以耐热性及比活性都非常优秀的Thermo T7 RNA Polymerase为基础的高效转录试剂。

高效率 RNA 合成试剂盒

ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit

Code: TSK-101　60次份×1　￥1,300

以高耐热性RNA合成酶「Thermo T7 RNA Polymerase《*TT7*》（→4-15页）」为基础的RNA合成量大幅提高的高效率RNA合成试剂盒。



➔ 特 征

❶高效率

通过添加 Accelerator Solution 可制备比以往高 2~4 倍的高浓度的 RNA。

❷绝佳的耐热性

采用高热稳定性的 Thermo T7 RNA Polymerase《*TT7*》，与野生型 T7 RNA Polymerase 相比，具有更高的耐热性。

❸最适合用于无细胞体外蛋白合成用的 mRNA 合成

最适合用于无细胞体外蛋白合成用的 mRNA 合成。

➔ 用 途

❶从环状及线性 DNA 模板出发进行 in vitro translation 反应时的 mRNA 的制备

❷大量合成 tRNA、rRNA、ribozyme 及 anti-sense RNA 等

❸RNAi 用双链 RNA 的合成

❹RNA splicing 反应的前体的合成

❺Hybridization Assay 用的高标记 RNA 探针的合成

❻合成以 Cap 类似物为引物的具 Cap 构造的 mRNA

➔ 说 明

本试剂盒中的 Accelerator Solution 可保证实验获得比以往提高 2~4 倍浓度的 RNA。
本试剂盒中采用的 Thermo T7 RNA 多聚酶根据野生型导入突变，比野生型具有更高的热稳定性，可在大范围温度内进行反应，且在 37°C的比活也有了大幅度的提高。

产品内容：

Thermo T7 RNA Polymerase	60μl
10×Basal Reaction Buffer	400μl
5×Accelerator Solution	400μl
25mM rNTPs Mixture	280μl
RNase Inhibitor(40U/μl)	30μl
Nuclease-free Water (not DEPC treated)	1ml

保存：

-20°C

备注：

本产品中添附的 10×Basal Reaction Buffer 与 Thermo T7 RNA Polymerase 中添附的 Buffer 组成不同。

网络版追加信息：

- 简要备注
- 实验例
- 基本反应条件

参考文献：

1) K.Ishikawa et al.,*Nucl.Acids. Res.*,**33:**e112(2005)
2) M.Itoh et al.,*Nucl.Acids Res.*, **30:**5452-5464(2002)
3) M.Chamberlin and J.Ring, *J.Biol.Chem.*,**248:**2235(1973)
4) M.Chamberlin and J.Ring,*J. Biol.Chem.*,**248:**2245(1973)

➔ 相关产品

❶ 高效率 T7 RNA Polymerase

Thermo T7 RNA Polymerase<<*TT7*>>	-	-	-	→ 4-15 页

❷ RNase抑制剂

RNase Inhibitor	-	-	-	→ 3-16 页

TOYOBO 公司 DNA 多聚酶特性一览表

多聚酶比较表

	DNA Polymerase Ⅰ	Klenow Fragment	T4 DNA Polymerase	Taq DNA Polymerase	Tth/rTth DNA Polymerase	△Tth® DNA Polymerase	KOD DNA Polymerase	KOD Dash®	KOD -Plus-	Blend Taq	Blend Taq -Plus-
<反应>											
DNA多聚酶活性	+	+	+	+	+	+	+	+	+（常温下受抑制）	+	+（常温下受抑制）
双链DNA 5'→3'核酸外切酶活性	+	-	-	±	±	-	ND	ND	ND	+	+（常温下受抑制）
双链DNA 3'→5'核酸外切酶活性	+	+	+	-	-	-	+	+	+（常温下受抑制）	+	+
单链DNA 3'→5'核酸外切酶活性	+	+	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
RNaseH活性	+	-	-	ND	+	-	ND	ND	ND	ND	ND
从双链模板进行链的置换反应	+	+	-	+	+	-	ND	ND	ND	+	+
NickTranslation活性	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Exchange活性	+	+	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<模板>											
双链DNA	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
与引物结合的单链DNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
与引物未结合的单链DNA	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
有gap或具有5'突出末端的双链DNA	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	+	+
有nick的双链DNA	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
单链RNA	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<要求性>											
二价阳离子	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}
SH试剂	+	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
其他											
<酶特性>											
分子量	109kDa	76kDa	141kDa	90kDa	85kDa	58kDa	90kDa	90kDa	90kDa	90kDa	90kDa
组成亚单元数	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
伸长率（bases/sec.）	约30	约30	约100	约60	约60	约40	106-138	106-138	106-138	约60	约60
类似物的摄入	+	+	+++	+	+	+	+	+	+	+	+
最适反应温度	37℃	37℃	37℃	72℃	75℃	75℃	75℃	75℃	75℃	72℃	72℃
最适PH值（Tris 缓冲液）	7.4 (25℃)	8.4 (25℃)	8.0-9.0 (25℃)	8.0-8.5 (75℃)	8.8 (25℃)	9.0 (25℃)	6.5-7.5 (75℃)	6.5-7.5 (75℃)	6.5-7.5 (75℃)	8-8.5 (75℃)	8-8.5 (75℃)
<用途>											
DNA 3'端的标记	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
DNA 5'端的标记	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nick Translation导入的标记	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DNA测序	-	+	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
RNA测序	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
使用oligo引入突变	-	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1st链cDNA合成	-	-	-	-	+（Mn^{2+}存在下）	+（Mn^{2+}存在下）	-	-	-	-	-
2nd链cDNA合成	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DNA的平滑化	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-

ND：无数据

PCR酶也可在第2章中参见特性一览表。（→2-11 页）

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

耐热性提高的 T7 RNA polymerase。50℃条件下仍可进行反应。

Thermo T7 RNA Polymerase《*TT7*》

Code: TRL-201　7,500U×1支　￥500

用基因工程学方法对 T7 RNA 多聚酶进行了改良，提高了耐热性。

➔ 用 途

1. 高标记 RNA 探针的制作
2. RNA splicing 反应前体的制备
3. 以 Cap 类似物为引物，制备具有 Cap 构造的 mRNA
4. 制备 in vitro 翻译用的 mRNA

➔ 说 明

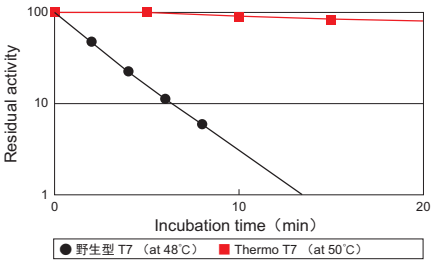
Thermo T7 RNA Polymerase 用基因工程学方法对来源于 T7 phage 的 RNA Polymerase 导入了点变异、提高了耐热性。
相对于野生型 T7 RNA Polymerase，提高了耐热性，在高达 50℃下仍可进行反应、并且与野生型 T7 RNA Polymerase 相比，在 37℃下的比活也有了提高。

➔ 原 理：和 T7 RNA Polymerase 相同。

➔ 结果示例

1 热稳定性的比较

对野生型 T7 RNA Polymerase 和本酶的热稳定性进行了比较。
将野生型 T7 RNA Polymerase 在 48℃，Thermo T7 RNA Polymerase 在 50℃下进行温育，然后测定其残余活性。
结果显示，野生型 T7 RNA Polymerase 在 48℃温育 5min. 后，活性降到了原来的 1/10，而 Thermo T7 RNA Polymerase 在 50℃孵化 15min. 后活性仍未见下降。

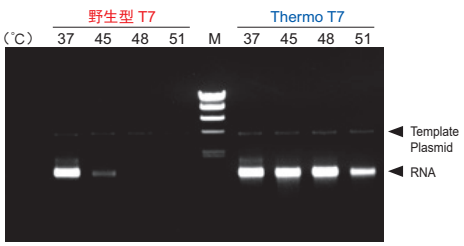


50℃时的半衰期
野 生 型 T7 RNA Polymerase ＜ 1.9min.
Thermo T7 RNA Polymerase 84.5min.

2 高温下 in vitro 转录反应

对野生型 T7 RNA Polymerase 和 Thermo T7 RNA Polymerase 的 in vitro 转录反应效果进行了比较。

以内含 T7 启动子的质粒 0.5μg 为模板，加入 RNase Inhibitor 20U 和两种酶各 25U，在 37-51℃的各温度点下进行反应 60min.，然后对反应产物进行电泳。
结果显示，Thermo T7 RNA Polymerase 在 51℃条件下，仍可以进行转录反应。



产品内容：

Thermo T7 RNA Polymerase（50U/μl）	150μl
10×Buffer	1ml×2 支

组成：

20mM	KPO_4（pH7.5）
100mM	NaCl
0.1mM	EDTA
5mM	DTT
0.01%	Triton X-100
50%	Glycerol

10×Buffer 组成：

400mM	Tris-HCl（pH8.0）
500mM	NaCl
80mM	$MgCl_2$
50mM	DTT

活性的定义：
以 T7 DNA 为模板，在 37℃下，在 1 小时内将 1nmole 的 [^{3}H]-rNTP 摄入为酸不溶性沉淀物所需的酶量为 1U。

来源： *E.coli* 重组体
保存： -20℃

纯度：
25U 的本酶和 1.5μg 的 pT7-2 DNA 在 37℃下反应 2 小时，DNA 的电泳模式未见改变。
100U 的本酶和 2.4μg 的 [^{3}H]-RNA 在 37℃下反应 2 小时，生成的酸可溶性分解物在 0.02μg 以下。
100U 的本酶和 1.7μg 的 [^{3}H]-T7 DNA 在 37℃下反应 4 小时，生成的酸可溶性分解物在 0.02μg 以下。

参考文献：

1) K.Ishikawa et al.,*Nucl.Acids Res.*,**33**:e112(2005)
2) M.Itoh et al., *Nucl.Acids Res.*, **30**:5452-5464(2002)
3) M.Chamberlin and J.Ring, *J.Biol. Chem.*,**248**:2235(1973)
4) M.Chamberlin and J.Ring, *J.Biol. Chem.*,**248**:2245(1973)

基本反应条件：

10×Buffer	5μl
10mM rNTPs	2μl
RNase inhibitor	20U
模板 DNA	100~1000ng
Thermo T7 RNA Polymerase	25~100U
Total Volume	50μl

↓
37~50℃、30~60min.

➔ 相关产品

1 高效率 RNA 合成试剂盒

ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit	-	-	-	→ 4-13 页

2 RNase的抑制

RNase Inhibitor	-	-	-	→ 3-16 页

Note

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

「核酸／蛋白质抽提・纯化」

第 5 章　目录 5-1

➔ 按用途分类的产品流程图 5-2

➔ 关于核酸抽提 5-3

➔ 核酸纯化（磁珠法）
MagExtractor -Genome- 5-4
MagExtractor -Plant Genome- 5-5
MagExtractor -RNA- 5-6
MagExtractor -Viral RNA- 5-8
MagExtractor -Plasmid- 5-9
MagExtractor -PCR ＆ Gel Clean up- 5-10

➔ 纯化用仪器
Magical *Trapper* 5-11
Handy Pestle 5-12

INDEX

{ 按用途分类的产品流程图 }

核酸高效率的纯化

磁珠法基因组 DNA 抽提试剂盒

高效率基因组 **DNA** 抽提试剂盒 ➔ （5-4 页）

- •MagExtractor -Genome-
- • KOD -Plus- / KOD -Plus- Ver.2
- • KOD -Plus- Neo

高效率植物基因组 **DNA** 抽提试剂盒 ➔ （5-5 页）

- • MagExtractor -Plant Genome-



磁珠法质粒抽提试剂盒

高效率质粒抽提试剂盒 ➔ （5-9 页）

- •MagExtractor -Plasmid-

磁珠法 DNA fragment 抽提试剂盒

高效率 **DNA** 抽提试剂盒 ➔ （5-10 页）

- • MagExtractor -PCR ＆ Gel Clean up-

磁珠法 RNA 抽提试剂盒

高效率 **Total RNA** 抽提试剂盒 ➔ （5-6 页）

- • MagExtractor -RNA-

高效率病毒 **RNA** 抽提试剂盒 ➔ （5-8 页）

- • MagExtractor -Viral RNA-

磁珠分离

磁珠分离台架 ➔ （5-11 页） • Magical *Trapper*



关于核酸抽提

1. 利用硅胶载体（silica carrier）进行核酸抽提

很久以前我们就知道，在胍盐等离液盐（蛋白质变性剂） 存在条件下，核酸会被硅胶表面吸附的现象。本公司利用带有硅胶涂层的磁珠可吸附核酸的现象研发了一系列核酸抽提用试剂盒。该系列核酸抽提试剂盒，主要通过吸附用buffer成分的最适化，可选择性地吸附、纯化各种成分。而且，使用该系列试剂盒，无需借助苯酚等有害试剂，可减轻废液处理问题的负担。

磁硅珠通过磁珠架即可迅速抽提，无需离心分离等步骤。

同时，有低成本、高性价比的优点。

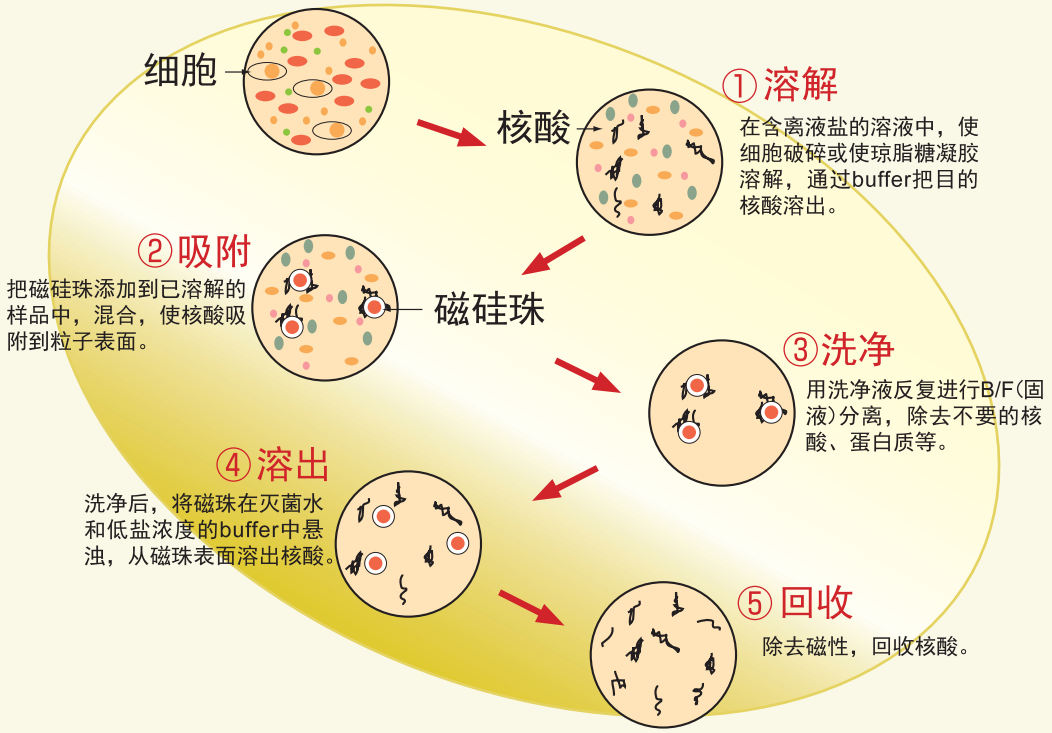


图1 利用磁硅珠进行核酸抽提的原理

使用磁硅珠高效率的基因组 DNA 抽提试剂盒。可从全血中抽提。

高效率基因组 DNA 抽提试剂盒

MagExtractor -Genome-

Code: NPK-101 100次份 ￥1200
< 大包装请询价 >

本试剂盒是用来从血液和培养细胞等生物样品中抽提高纯度基因组 DNA 的试剂盒。



➔ 特 征

❶适用于各种不同来源的样品
能从全血、动物培养细胞、动物组织、mouse tail 中抽提出基因组 DNA。

❷可简便地在短时间内完成抽提
其基本原理是利用磁硅珠对基因组 DNA 的吸附性，能简便地在短时间内抽提出基因组 DNA。
从血液抽提 DNA 的时候，可以直接把全血作为样品进行使用。

❸安全
无需使用苯酚 / 氯仿等有害溶剂，所以不会产生废液处理的问题。

❹可以纯化出高纯度的基因组 DNA
用本试剂盒抽提出的基因组 DNA，几乎不包含 RNA 和蛋白质等杂质，可直接用于各种实验。

➔ 用 途：从全血、动物培养细胞、动物组织、mouse tail 中抽提基因组 DNA

➔ 说 明

利用磁硅珠能吸附破碎溶液中的基因组 DNA 的原理来回收 DNA。无需借助苯酚等有害的试剂来进行除蛋白操作和乙醇沉淀 • 高速离心分离操作，就能简便地抽出基因组 DNA。回收的基因组 DNA 可以直接用于 PCR 和其他的酶反应中。
本试剂盒除可与核酸自动抽提装置「MFX 系列」组合使用外，还可与磁珠分离台架一起使用，作为进行 B/F(固液) 手动分离时的试剂盒。
在血液抽提时，因为是直接从全血中抽提基因组 DNA，所以不必进行以往所需的白血球分离步骤。

主要对应样品	得 率	$A_{260/280}$
血 液	2μg/100μl 全血	1.8±0.1
培养细胞	3μg/5×10^5cell(HeLa)	
组 织	5μg/5mg 组织（猪精巢）	
mouse tail	3μg/2mm tail	

※ 得率根据样品的种类和状态不同会有所差异。

产品内容：
溶解 • 吸附液
洗净液
磁珠

※除试剂盒以外还需要准备以下的试剂。
灭菌水
EtOH

保存条件：
4°C

参考文献：
1) B.Vogelstein and D.Gillespie,*Proc.Natl. Acad.Sci.USA*,**76:**615-619（1979）
2) R.Boom et al.,*J.Clin. Microbiol*.,**28:**495-503（1990）

备注：
MagExtractor 试剂盒系列中包含的磁珠因为组成成分各有不同，不能与其他的试剂盒中的磁珠混用。

➔ 相关产品

❶ 磁珠分离用台架

Magical *Trapper*	MGS-101	1 个	¥1,000	→ 5-11 页

❷ MagExtractor 系列

MagExtractor -RNA-	NPK-201F	100 次份	¥2,600	→ 5-6 页
MagExtractor -Plasmid-	NPK-301	500 次份	¥2,200	→ 5-9 页
MagExtractor -Viral RNA-	NPK-401F	100 次份	¥1,600	→ 5-8 页
MagExtractor -Plant Genome-	NPK-501	100 次份	¥1,600	→ 5-5 页
MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	NPK-601	200 次份	¥1,200	→ 5-10 页

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

使用磁硅珠高效率的植物基因组 DNA 抽提试剂盒。

高效率植物基因组 DNA 抽提试剂盒

MagExtractor -Plant Genome-

Code: NPK-501　100次份　￥1,600

本试剂盒是用来从叶子、种子等植物组织和植物培养细胞等植物样品中抽提高纯度的基因组 DNA 的试剂盒。回收的 DNA 可以直接用于 PCR 等酶反应中。

➔ 特 征

❶ 高效率

可以从叶子、种子等组织和培养细胞等植物样品中抽提出高纯度的基因组 DNA。与其他公司的试剂盒相比，本试剂盒即使从少量的样品中也能抽提出 DNA。

❷ 简便・短时间

其基本原理是利用磁硅珠对基因组 DNA 的吸附性，能简便地在短时间内抽提出基因组 DNA。

❸ 可进行高纯度的 DNA 抽提

用本试剂盒抽提出的基因组 DNA，几乎不含 RNA 和蛋白质等杂质，可直接使用于 PCR 等的酶反应中。

➔ 用 途：从植物培养细胞、植物组织中抽提基因组 DNA

➔ 说 明

本试剂盒是利用磁硅珠能吸附破碎溶液中的基因组 DNA 的原理来回收 DNA。无需借助苯酚等有害的试剂来进行除蛋白操作和乙醇沉淀・高速离心分离操作，就能简便地抽提出基因组 DNA。

本试剂盒除可与核酸自动抽提装置「MFX 系列」组合使用外，还可与磁珠分离台架一起使用，作为进行 B/F（固液）手动分离的试剂盒。

样　品	得　率	$A_{260/280}$
烟草（叶子）	3~5μg/100mg	1.8±0.1
烟草（培养细胞）	2~3μg/100mg	
水稻（叶子）	3~5μg/100mg	
拟南芥（叶子）	1μg/100mg	
西红柿（叶子）	3μg/100mg	
南瓜（叶子）	3μg/100mg	
玉米（叶子）	3~4μg/100mg	
大豆（冷冻干燥）	2μg/25mg	

※ 得率根据样品的种类和状态不同会有所差异。

产品内容：

溶解液 *
吸附液
洗净液
磁珠

* 若在溶解液中发现析出物，请在 50℃下把析出物溶解后再在室温下进行保存。

※除试剂盒以外还需要准备以下的试剂。
灭菌水
EtOH
氯仿
3- 甲基丁醇

※ 试剂在使用前的温度必须回至室温左右。

保存条件：

溶解液　室温
其他　4℃

备注：

MagExtractor 试剂盒系列中包含的磁珠因为组成成分各有不同，不能与其他的试剂盒中的磁珠混用。

➔ 相关产品

❶ 磁珠分离用台架

Magical Trapper	MGS-101	1 个	¥1,000	→ 5-11 页

❷ MagExtractor 系列

MagExtractor -Genome-	NPK-101	100 次份	¥1,200	→ 5-4 页
MagExtractor -RNA-	NPK-201F	100 次份	¥2,600	→ 5-6 页
MagExtractor -Plasmid-	NPK-301	500 次份	¥2,200	→ 5-9 页
MagExtractor -Viral RNA-	NPK-401F	100 次份	¥1,600	→ 5-8 页
MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	NPK-601	200 次份	¥1,200	→ 5-10 页

使用磁硅珠高效率的 Total RNA 抽提试剂盒。

高效率 Total RNA 抽提试剂盒

MagExtractor -RNA-

Code: NPK-201F　100次份　￥2,600

本试剂盒是利用磁硅珠从血清・血浆中抽提高纯度的病毒 RNA 的试剂盒。抽提的病毒 RNA 可直接用于 PCR 等反应中。



➔ 特　征

❶适合于各种样品

能从培养细胞、动物组织、酵母等中抽提出 Total RNA。Total RNA 中主要包含 rRNA 和 mRNA。

❷简便・短时间

其基本原理是利用磁硅珠对 Total RNA 的吸附性，能简便地在短时间内抽提出 Total RNA。

❸可以进行高纯度的 Total RNA 抽提

用本试剂盒抽提出的 Total RNA，几乎不包含 DNA 和蛋白质等杂质，可直接用于 RT-PCR 等的酶反应中。

➔ 用　途：从培养细胞、动物组织、酵母等中抽提 Total RNA

➔ 说　明

本试剂盒是利用磁硅珠能吸附裂解溶液中的 Total RNA 的原理来回收 Total RNA，无需再借助苯酚等有害的试剂来进行除蛋白操作和乙醇沉淀操作・高速离心分离操作（AGPC 法），就能简便地抽提出 Total RNA。
本试剂盒除可与核酸自动抽提装置「MFX 系列」组合使用外，还可与磁珠分离台架一起使用，作为进行 B/F（固液）分离的手动试剂盒。

主要对应样品	样　品	得　率	纯度 ($A_{260/280}$)
培养细胞	~5×10^6cells	~10μg/10^6cell	1.9±0.1
组织	~30mg	~15μg/30mg	
酵母	~10 O.D.(660nm) 从 0.5ml 培养液回收的细胞	~20μg/5 O.D.	

※ 根据样品的种类及培养、保存条件等不同，RNA 的得率会发生变动。

➔ 步　骤

本试剂盒根据以下步骤可抽提出高纯度的 total RNA。

①首先在样品中加入含有离液盐的溶解・吸附液，以便把样品中的细胞进行溶解。
②通过添加、混合磁硅珠来把样品中的 RNA 吸附到硅胶的表面。
③使用 2 种洗净液将磁珠洗净，除去蛋白质、DNA、盐等。
④使用灭菌水或低盐浓度的缓冲液等，从磁珠中把 RNA 溶出，再进行回收。

➔ 几点建议

❶ B/F 分离

使用本试剂盒手工操作时，若使用磁珠分离专用台架 Mag*ical Trapper*（→ 5-11 页）会使操作更简便。也可用简易台式离心机来代替磁珠分离专用台架以进行 B/F 分离。

产品内容：

溶解・吸附液
洗净液 Ⅰ *
洗净液 Ⅱ *
溶出液
磁珠

* 洗净液Ⅰ、Ⅱ在使用前必须回至室温左右。

保存条件：

4°C

参考文献：

1) B.Vogelstein and D.Gillespie,*Proc.Natl. Acad.Sci.USA*,**76:**615-619（1979）
2) R.Boom et al.,*J.Clin. Microbiol.*,**28:**495-503（1990）

备注：

MagExtractor 试剂盒系列中包含的磁珠因为组成成分各有不同，不能与其他的试剂盒中的磁珠混用。

基本反应条件：

< 培养细胞的前处理 >
细胞　≤1 × 10^6cells
溶解・吸附液　700μl

仔细搅拌
vortex　30sec.
室温　10~15min.

< 组织的前处理 >
用液氮对组织（≤30mg）进行冻结处理
↓
加入：
溶解・吸附液（冰中冷却）　750~900μl

置于冰上，匀浆
vortex　30~60sec.
离心、回收上清液
室温　10~15min.

< 酵母的前处理 >
酵母菌体：用金属取菌棒从 0.5ml 培养液或菌落中提取少量后，再放入 50μl 预冰冷的 Zymolyase 中混合。

37°C　5~20min.
↓
加入：
溶解・吸附液（冰中冷却）　700μl

TEL: 021-5879-4900　FAX: 021-5879-4901　E-mail: tech@bio-toyobo.cn　URL: http://www.bio-toyobo.cn　营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

❷从血液中抽提 RNA

抽提全血时，必须先进行白血球的 Ficoll 离心分离等的操作。

❸抽提时要使用的样品量

过多的样品可能会降低回收率。建议使用适度的样品量。

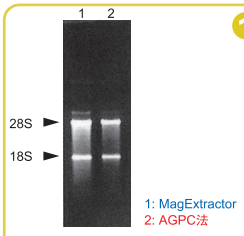
❹从组织中抽提

从组织中进行抽提的时候，不同组织会有不同的得率。从心脏、肌肉中抽提时，回收率会有所降低。

❺DNase Ⅰ处理

在进行 RT-PCR 前如果先进行 DNase Ⅰ处理，会得到更稳定的结果。

➔ 结果示例



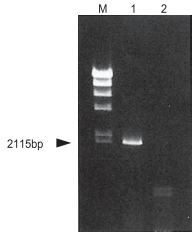
❶得率与纯度的探讨

使用本试剂盒及使用一般的 RNA 抽提法（AGPC 法）的试剂盒，从 2×10^6 的 HL60 细胞抽提 Total RNA。
结果显示使用本试剂盒的得率大致与使用 AGPC 法的得率相等。
根据电泳模式及 O.D. 等测定，使用本试剂盒则几乎不混有蛋白质及 DNA 等杂质，可抽提出高纯度的 RNA。

	MagExtractor	AGPC法
得 率	18 μg	13 μg
$A_{260/280}$	1.87	1.86

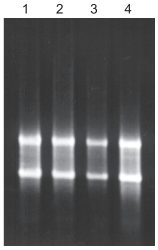
❷抽提 RNA 的 RT-PCR 示例

从 2 × 10^6 的 HeLa 细胞里抽提出的 Total RNA 中取出 1 μg，以 transferrin receptor mRNA 为目的片段（2115bp）进行 RT-PCR。
结果显示，只有在进行了逆转录反应后 transferrin receptor mRNA 才有扩增，说明即使从表达量相对较少的 transferrin receptor 中还是检测出了其表达。
由此可见，用本试剂盒得到的 RNA 可用于针对各种目的片段的 RT-PCR 中。



❸从 rat 的组织中进行抽提

从 rat 的各组织中利用本试剂盒进行 Total RNA 的抽提。
把 50~100mg 的组织放入液氮中，冷冻过后用铁锤捣碎，再加入冰浴过的溶解・吸附液 750~900 μl（含 2-ME），用 pestle 充分匀浆，回收上清后放置于室温下 10min.，进行抽提。
结果显示，使用本试剂盒即使从匀浆过的组织中也能抽提出高质量的 RNA。



	得率(μg)	$A_{260/280}$
肝脏	10.4 μg	2.08
睾丸	9.3 μg	2.09
脑	5.2 μg	2.04
肾脏	9.7 μg	2.09

仔细搅拌
vortex 30~60sec.
室温 10~15min.
经过前处理的样品 700 μl
磁珠 50 μl

vortex 20sec.
室温 40~60sec.
B/F 分离
↓
加入：
洗净液 Ⅰ 600 μl

vortex 10sec.
B/F 分离
↓
加入：
洗净液 Ⅱ 800 μl ←┐
vortex 5sec. │ 重复 2 次
B/F 分离 │
spin down，除去上清液 ┘
↓
加入：
溶出液 40 μl

搅拌 5sec.
65°C 2min.
搅拌 5sec.
spin down, 回收上清液

➔ 相关产品

❶磁珠分离用台架

Magical Trapper	MGS-101	1 个	¥1,000	→ 5-11 页

❷MagExtractor 系列

MagExtractor -Genome-	NPK-101	100 次份	¥1,200	→ 5-4 页
MagExtractor -Plasmid-	NPK-301	500 次份	¥2,200	→ 5-9 页
MagExtractor -Viral RNA-	NPK-401F	100 次份	¥1,600	→ 5-8 页
MagExtractor -Plant Genome-	NPK-501	100 次份	¥1,600	→ 5-5 页
MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	NPK-601	200 次份	¥1,200	→ 5-10 页

使用磁硅珠高效率的血清・血浆病毒 RNA 抽提试剂盒。

高效率病毒 RNA 抽提试剂盒

MagExtractor -Viral RNA-

Code: NPK-401F　100次份　￥1,600

本试剂盒是利用磁硅珠从血清・血浆中抽提高纯度的病毒 RNA 的试剂盒。抽提的病毒 RNA 可直接用于 PCR 等反应中。



➔ 特　征：从血清和血浆中抽提病毒 RNA

➔ 说　明

本试剂盒是利用磁硅珠对破碎溶液中的病毒 RNA 的吸附性，无需借助苯酚等有害的试剂来进行除蛋白操作和乙醇沉淀操作・高速离心分离操作（AGPC 法），就能简便地抽提出病毒 RNA。
本试剂盒除可与核酸自动抽提装置「MFX 系列」组合使用外，还可与磁珠分离台架一起使用，作为进行 B/F（固液）分离的手动试剂盒。

➔ 步　骤

本试剂盒根据以下步骤可抽提出高纯度病毒 RNA。

①首先在样品中加入含有离液盐的溶解・吸附液，以便把样品中的病毒粒子加以溶解。
②通过添加、混合磁硅珠来把样品中的病毒 RNA 吸附到硅胶表面。
③使用 2 种洗净液将磁珠洗净，除去蛋白质、盐等。
④使用灭菌水或低盐浓度的缓冲液等，从磁珠中把病毒 RNA 溶出，进行回收。

➔ 几点建议

样品

反复进行过冻结 / 融解操作的样品回收率会降低。而且，样品中如混入 DNA，那么回收到的溶液中也可能会混入 DNA。

➔ 结果示例

从血清中抽提 HCV RNA 进行 RT-PCR 的检测例



使用本试剂盒和其他公司的试剂盒，同时以 HCV 阳性血清的稀释系列（10^2-10^4copies）各 100 μl 为样品，进行 HCV-RNA 的抽提。将所获得的 RNA 的 1/40 量用 RT-nested PCR 法做 HCV-RNA 的检测。
结果显示，本试剂盒与 B 公司的试剂盒一样能从 10^3copies/100 μl 血清中抽提出 RNA。

➔ 相关产品

① 磁珠分离用台架

Mag*ical Trapper*	MGS-101	1 个	¥1,000	→ 5-11 页

产品内容：

溶解・吸附液
洗净液 Ⅰ
洗净液 Ⅱ
溶出液
磁珠

※试剂在使用前必须回至室温左右。若可见析出物，请在室温下把析出物完全溶解后再进行使用。

保存条件：

4℃

参考文献：

1) B.Vogelstein and D.Gillespie,*Proc.Natl. Acad.Sci.USA*,**76:**615-619（1979）
2) R.Boom et al.,*J.Clin. Microbiol.*,**28:**495-503（1990）

备注：

MagExtractor 试剂盒系列中包含的磁珠因为组成成分各有不同，不能与其他的试剂盒中的磁珠混用。

基本反应条件：

血清或血浆		≤300 μl
溶解・吸附液		700 μl
vortex		10sec.
↓		
加入：		
磁珠		50 μl
vortex		10min.
B/F 分离		
↓		
加入：		
洗净液 Ⅰ	700 μl	重复 2 次
vortex	10sec.	
B/F 分离		
↓		
加入：		
洗净液 Ⅱ	900 μl	重复 2 次
vortex	10sec.	
B/F 分离		
↓		
spin down，除去上清液		
加入：		
溶出液		55 μl
vortex		5sec.
65℃		2min.
spin down，回收上清液		

TEL: 021-5879-4900　FAX: 021-5879-4901　E-mail: tech@bio-toyobo.cn　URL: http://www.bio-toyobo.cn　营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

使用磁硅珠高效率的质粒抽提试剂盒。

高效率 Plasmid 抽提试剂盒

MagExtractor -Plasmid-

Code: NPK-301　500次份　￥2,200

本试剂盒是用来从大肠杆菌等细菌中抽提高纯度质粒 DNA 的试剂盒。回收的质粒 DNA 可以直接用于限制性酶处理和 PCR、测序等的酶反应和转化反应中。



➔ 特 征

❶惊人的低成本

作为手动试剂盒，每处理一个样品的成本非常低。

❷简便 • 短时间

其基本原理是利用磁硅珠对质粒 DNA 的吸附性，能简便地在短时间内抽提出质粒 DNA。

❸安全

不必使用苯酚 / 氯仿等有害溶剂，所以不会产生废液处理的问题。

➔ 用 途 : 质粒 DNA 抽提

➔ 说 明

利用磁硅珠能吸附匀浆溶液中质粒 DNA 的原理来回收质粒 DNA，无需借助苯酚等有害试剂来进行除蛋白操作和乙醇沉淀操作。而且，能将使用高速度离心机进行的离心操作次数减到最少，可简便地抽提出 DNA。

本试剂盒用做手动试剂盒时，每处理 1 个样品只需花费很少的成本，与其他公司的试剂盒相比，价格非常合理。

本试剂盒除可与核酸自动抽提装置「MFX 系列」组合使用外，还可与磁珠分离台架一起使用，作为进行 B/F（固液）分离的手动试剂盒。

主要对应样品	得　率	$A_{260/280}$
大肠杆菌	3~6μg/3~9 O.D. (pUC18/JM109)	1.8±0.1

产品内容:

2 次悬浊液
溶解液 Ⅰ *
溶解液 Ⅱ
中和液
吸附液
溶出液
磁珠 Ⅰ
磁珠 Ⅱ
5 × Loading Dye

* 溶解液 Ⅰ 中有时会出现析出物。请在室温 ~40°C下把析出物完全溶解后再进行使用。

※除试剂盒以外还需要准备以下的试剂。
灭菌水
EtOH

保存条件:

4°C

备注:

MagExtractor 试剂盒系列中包含的磁珠因为组成成分各有不同，不能与其他的试剂盒中的磁珠混用。

➔ 相关产品

❶ 磁珠分离用台架

Mag*ical Trapper*	MGS-101	1 个	¥1,000	→ 5-11 页

❷ MagExtractor 系列

MagExtractor -Genome-	NPK-101	100 次份	¥1,200	→ 5-4 页
MagExtractor -RNA-	NPK-201F	100 次份	¥2,600	→ 5-6 页
MagExtractor -Viral RNA-	NPK-401F	100 次份	¥1,600	→ 5-8 页
MagExtractor -Plant Genome-	NPK-501	100 次份	¥1,600	→ 5-5 页
MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	NPK-601	200 次份	¥1,200	→ 5-10 页

使用磁硅珠从酶反应液和琼脂糖凝胶中简便地抽提出高纯度的DNA的纯化试剂盒。

高效率 DNA 片段抽提试剂盒

MagExtractor -PCR & Gel Clean up-

Code: NPK-601　200次份　￥1,200

从酶反应后的 DNA 溶液和电泳后的琼脂糖凝胶中纯化出高纯度 DNA 片段的试剂盒。



产品内容：
吸附液
洗净液
磁珠

※除试剂盒以外还需要准备以下的试剂。
灭菌水
EtOH

保存条件：
室温

备注：
MagExtractor 试剂盒系列中包含的磁珠因为组成成分各有不同，不能与其他的试剂盒中的磁珠混用。

➔ 特 征

① 从各种样品中进行提纯，能获得良好的回收率
能从酶反应溶液和电泳琼脂糖凝胶中以平均 70% 以上得率回收高纯度的 DNA。

② 可简便地在短时间内完成抽提
其基本原理是利用磁硅珠对 DNA 的吸附性，能简便地在短时间内抽提出 100bp~50kb 的 DNA（DNA 溶液约 5 分钟，琼脂糖凝胶约 15 分钟）。
从琼脂糖凝胶中提纯的时候，不需要以往进行琼脂糖融解所需的加热或水浴等步骤。

③ 安全
无需使用苯酚 / 氯仿等有害溶剂，所以不会产生废液处理的问题。

④ 低成本
每处理 1 个样品只需要花费很少的成本，非常实惠。

➔ 用 途

① 从酶反应后的 DNA 溶液中提纯 DNA
② 从琼脂糖凝胶（TBE 及 TAE 凝胶）中提纯 DNA

➔ 说 明

本试剂盒是用于从酶反应后的 DNA 溶液和电泳后的琼脂糖凝胶中纯化出高纯度 DNA 的试剂盒。纯化后的 DNA 中不包含蛋白质和盐等杂质，可以直接用于 PCR 产物的测序、限制酶处理、连接反应等多种用途。
利用磁硅珠能吸附溶液中的 DNA 的原理来回收 DNA，无需借助苯酚等有害的试剂来进行除蛋白操作和乙醇沉淀操作 • 高速离心分离操作，就能简便地低成本地进行提纯。
与市场上使用硅胶或 matrix 的 spin column 不同，本产品能根据样品量来自由改变处理规模，因而既经济又方便。
本产品可用于 PCR 反应后的引物 •dNTPs 去除、BAP 处理等反应后的脱蛋白处理、电穿孔前的 DNA 样品的脱盐处理、酶反应后的缓冲液置换等多种用途。
电泳后从琼脂糖中纯化 DNA 时，本产品使用了威力强大的离液盐来代替以往的 NaI 法来进行融解凝胶，所以在室温下能在短时间内融解琼脂糖。
本试剂盒除可与核酸自动抽提装置「MFX 系列」组合使用外，还可与磁珠分离台架一起使用，作为进行 B/F（固液）分离的手动试剂盒。

➔ 相关产品

① 磁珠分离用台架

Mag*ical Trapper*	MGS-101	1 个	¥1,000	→ 5-11 页
② MagExtractor 系列				
MagExtractor -Genome-	NPK-101	100 次份	¥1,200	→ 5-4 页
MagExtractor -RNA-	NPK-201F	100 次份	¥2,600	→ 5-6 页
MagExtractor -Plasmid-	NPK-301	500 次份	¥2,200	→ 5-9 页
MagExtractor -Viral RNA-	NPK-401F	100 次份	¥1,600	→ 5-8 页
MagExtractor -Plant Genome-	NPK-501	100 次份	¥1,600	→ 5-5 页

TEL: 021-5879-4900　FAX: 021-5879-4901　E-mail: tech@bio-toyobo.cn　URL: http://www.bio-toyobo.cn　营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

多功能、低价格的磁珠分离专用台架。

磁珠分离专用台架

Magical Trapper

Code: MGS-101　　1个　　￥1,000



最适用于使用磁硅珠手动法抽提纯化核酸、蛋白质的磁珠分离专用台架。

产品内容：
Magical Trapper

保存条件：
室温

注意：
本产品具有强磁力，请勿靠近软盘等磁性记忆介质。
另外，使用心脏起搏器的人请勿使用。

➔ 特 征

1 多功能
可装入 1.5~2ml 的微型试管（10 支）、15ml 的试管（1 支）。试管在其中能保持稳定，保证顺利进行分离操作。

2 低价格
一体型制作，价格低廉。

3 重量轻
与以往的台架相比，采用了轻量设计。

➔ 用 途：使用磁珠抽提、提纯核酸和蛋白质

➔ 说 明

本产品中能放置 1.5~2ml 的微型试管（10 支）、15ml 的试管（1 支），能方便地对样品进行抽提和纯化。
另外，试管在台架上能保持非常稳定的状态，可顺利进行分离操作，因此要比使用台式简易离心机进行 B/F（固液）分离简便得多。最适用于与 MagExtractor 系列核酸、蛋白质纯化试剂盒一起使用。

➔ 相关产品

MagExtractor 系列

MagExtractor -Genome-	NPK-101	100 次份	¥1,200	→ 5-4 页
MagExtractor -RNA-	NPK-201F	100 次份	¥2,600	→ 5-6 页
MagExtractor -Plasmid-	NPK-301	500 次份	¥2,200	→ 5-9 页
MagExtractor -Viral RNA-	NPK-401F	100 次份	¥1,600	→ 5-8 页
MagExtractor -Plant Genome-	NPK-501	100 次份	¥1,600	→ 5-5 页
MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	NPK-601	200 次份	¥1,200	→ 5-10 页

顶端具有特异构造能防止样品滑脱并高效地进行粉碎。

高效的粉碎组织

Handy Pestle

Code: HMX-301　100支　￥700

➔ 特 征

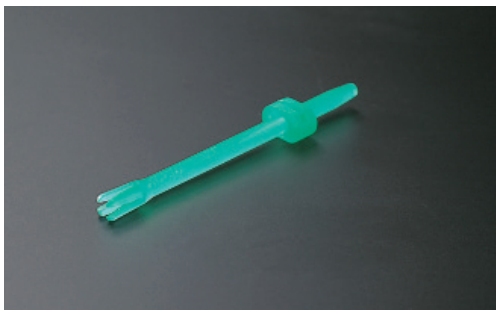
高效的粉碎功能

被分割成 4 个分叉的前端构造，与试管的形状紧密配合能有效的锁住样品，达到彻底粉碎样品的效果。与以前的乳棒相比，能更加高效、迅速地粉碎组织。

➔ 用 途：溶液中的组织粉碎

➔ 说 明

本产品是能将放在 1.5ml 微型试管中的组织进行迅速粉碎的一次性乳棒。从组织中抽提 DNA 和 RNA 时，必须先把组织进行粉碎（匀浆）。该乳棒前端部被分割成 4 个分叉，与试管的形状紧密配合能有效地锁住样品，达到彻底粉碎样品的效果。与以前的乳棒相比，能在更短的时间内粉碎组织。而且，即使样品的比重较小，样品也不会从乳棒中滑出来，因为前端 4 个分叉能牢牢抓住样品并进行高效的粉碎。
该乳棒除与样品自动粉碎装置「HMX®-2000」组合使用外，也可作为手动使用，最适于在从组织中抽提核酸和抽提蛋白质之前的前处理中使用。





产品内容：

Handy Pestle*

* 本产品已采用电子射线进行了灭菌。

保存条件：

室温

参考文献：

1) M.Kusumoto et al., *Analytical Biochem.*, **294:**185~186（2001）

➔ 相关产品

MagExtractor 系列

MagExtractor -Genome-	NPK-101	100 次份	¥1,200	→ 5-4 页
MagExtractor -RNA-	NPK-201F	100 次份	¥2,600	→ 5-6 页
MagExtractor -Plasmid-	NPK-301	500 次份	¥2,200	→ 5-9 页
MagExtractor -Viral RNA-	NPK-401F	100 次份	¥1,600	→ 5-8 页
MagExtractor -Plant Genome-	NPK-501	100 次份	¥1,600	→ 5-5 页
MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	NPK-601	200 次份	¥1,200	→ 5-10 页

TEL: 021-5879-4900　FAX: 021-5879-4901　E-mail: tech@bio-toyobo.cn　URL: http://www.bio-toyobo.cn　营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

「综合」

第 6 章　目录　6-1

➔ 按用途分类的产品流程图　6-2

➔ 关于抗体检测　6-5

➔ 免疫反应增强液
Can Get Signal immunoreaction Enhancer Solution　6-6
Can Get Signal immunostain Immunoreaction Enhancer Solution　6-8

INDEX

「综合」

{ 按用途分类的产品流程图 }

高效率检测分析

想进行抗体检测

Western Blot 分析 •ELISA

免疫反应增强剂

➔（6-6 页）

• *Can Get Signal* Immunoreaction Enhancer Solution



免疫组织染色

免疫反应促进剂

➔（6-8 页）

• *Can Get Signal* Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution



想直接进行 mRNA 表达量测定

Realtime PCR 用 Master Mix

高效率 **Realtime PCR Master Mix**

➔（1-13 页）

- THUNDERBIRD® Next qPCR Mix 系列
- THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix
- Realtime PCR Master Mix
- KOD SYBR® qPCR Mix
- THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix
- SYBR® Green Realtime PCR Master Mix

THUNDERBIRD® Probe One-Step qRT-PCR Kit ➔（1-8 页）

***RNA-direct* Realtime PCR Master Mix 系列**

➔（1-12 页）

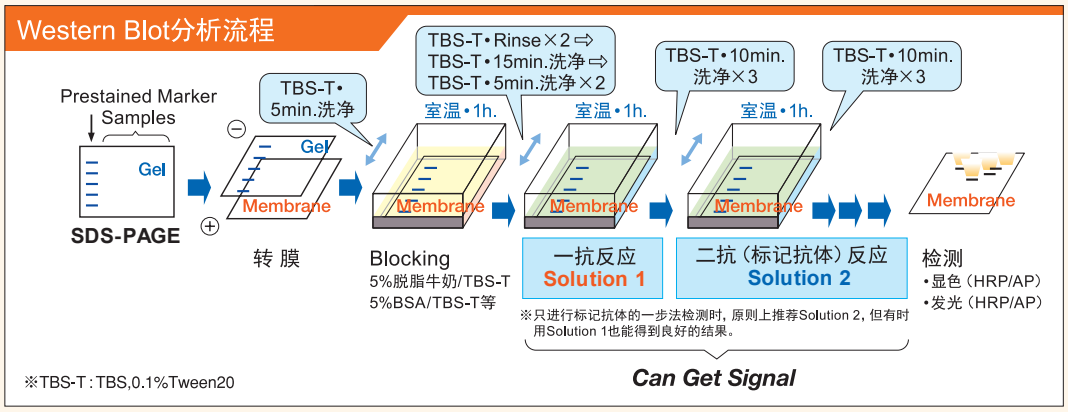
1 关于抗体检测

1. Western Blot 检测

Western Blot分析作为各种蛋白质特异性检测的方法，是蛋白质研究领域不可或缺的技术。

Western Blot分析是使用抗体通过抗原抗体反应进行检测的实验方法，但经常会出现信号弱，背景高，非特异性条带等结果，使得实验者非常苦恼。本公司的*Can Get Signal* Immunoreaction Enhancer Solution【以下简称*Can Get Signal*】具有促进抗原抗体反应的功能，使用方法与现在通常使用的TBS-T、Blocking溶液一样，作为抗体稀释液使用即可，如下图，Solution 1用于一抗反应，Solution 2用于二抗反应，非常简便。

该试剂具有很强的增强信号、降低背景的效果，现在已被很多实验室作为Western Blot分析的标准Protocol。这里以使用*Can Get Signal*的实验流程为中心，解说一下Western Blot分析中的注意点。



（1）关于抗体量

过量的抗体往往会导致高背景，特别是使用*Can Get Signal*，只要少量抗体就能得到充分的信号，因此需要注意抗体浓度。

通过Western Blot分析法检测His-ERK2蛋白质（使用抗His-tag抗体），从右图的结果可见，用以往方法（1抗浓度1:1000）虽然确认到了特异性条带，但背景很高，而且能看到很强的非特异性反应(图1)。

另一方面，使用*Can Get Signal*（1抗浓度1:5000），抗体浓度虽然是以往方法的1/5，但信号强度与以往方法处于同等水平，且非特异性条带明显减少。

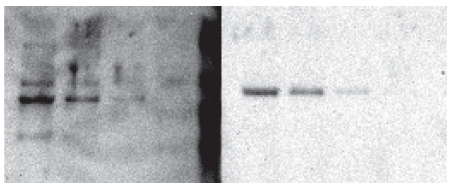


图1 HIS-ERK2蛋白质的检测例（使用抗His-tag抗体）

此外，以检出量多的抗原作为样品时，在发光法检测中有时会出现完全没有条带的情况。其原因是，通过在目的条带中过量浓缩标记抗体的过氧化物酶来进行发光的底物在检测之前基本上已被消耗了。出现这种情况时，应该减少电泳的样品量，同时减少抗体量。

（2）关于Blocking

使用*Can Get Signal*时仍需Blocking步骤。通过改变Blocking剂的种类有时能够改善检测灵敏度、背景等，因此，无法得到满意的结果时，可尝试改变Blocking剂的种类。另外，检测磷酸化蛋白质时，请避免使用酪蛋白等含磷酸化蛋白质多的Blocking剂。

在这里，以使用5%脱脂牛奶/TBS-T和5%BSA/TBS-T为例进行说明。下图左边为EGFR检测例，可知使用5%脱脂牛奶/TBS-T能减少非特异性条带（图2）。再看下图右Actin检测例，可知以5%BSA/TBS-T为Blocking剂灵敏度更高（图3）。

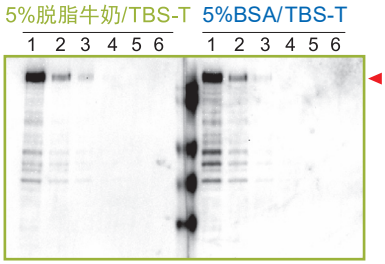


图2 Human EGFR检测例

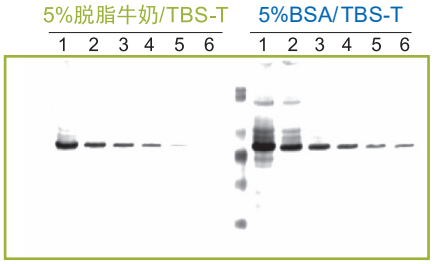
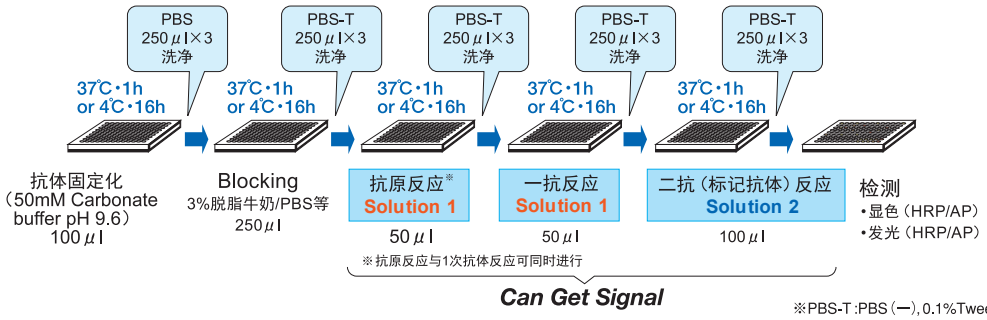


图3 Human Actin检测例

2. ELISA

*Can Get Signal*通过三明治ELISA法等使用反应板进行检测的方法，也能降低背景、提高灵敏度。三明治ELISA法中的抗体固定化使用常用的碳酸缓冲液，接下去的Western Blot分析也同样进行Blocking。然后，固相抗体与抗原、及抗原与一抗反应用Solution 1，二抗反应用Solution 2。另外，Solution 1中固相抗体与抗原的反应和一抗反应同时进行可缩短检测时间。反应用的抗体浓度，以推荐浓度为标准，或少于推荐浓度，可得到较好的结果。

ELISA分析流程

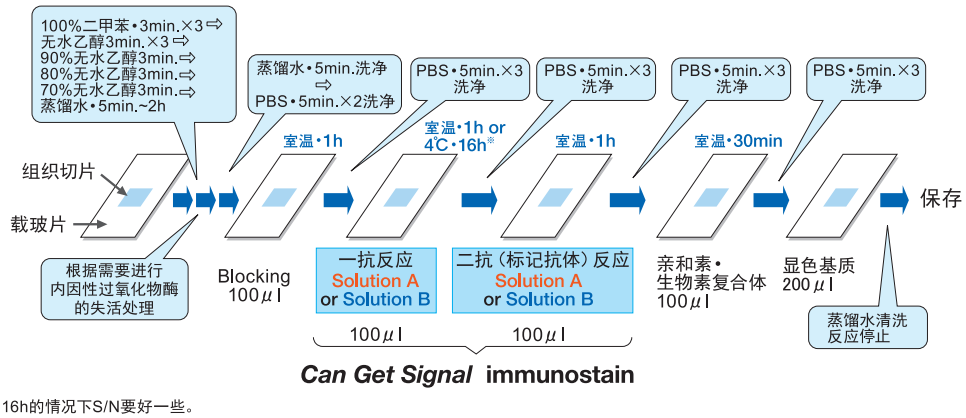


3. 免疫组织染色

免疫组织染色作为检测（通过组织切片、固化细胞等发现的）蛋白质的局部存在及检出量的方法，是非常有效的。由于该方法使用的样品含有各种成分，因此相比Western Blot分析等，条件设定要详细得多。

Can Get Signal immunostain Immunoreaction Enhancer Solution【以下简称*Can Get Signal* immunostain】和*Can Get Signal*一样具有促进抗原抗体反应的功能，特别适用于免疫组织染色用。使用方法也和*Can Get Signal*一样，只要替换抗原抗体反应步骤中用的溶液即可，可简便地用于各种检测法。下面为采用ABC法的免疫组织染色流程〈几乎可用同样的操作进行荧光免疫染色等〉

ABC法免疫组织染色流程



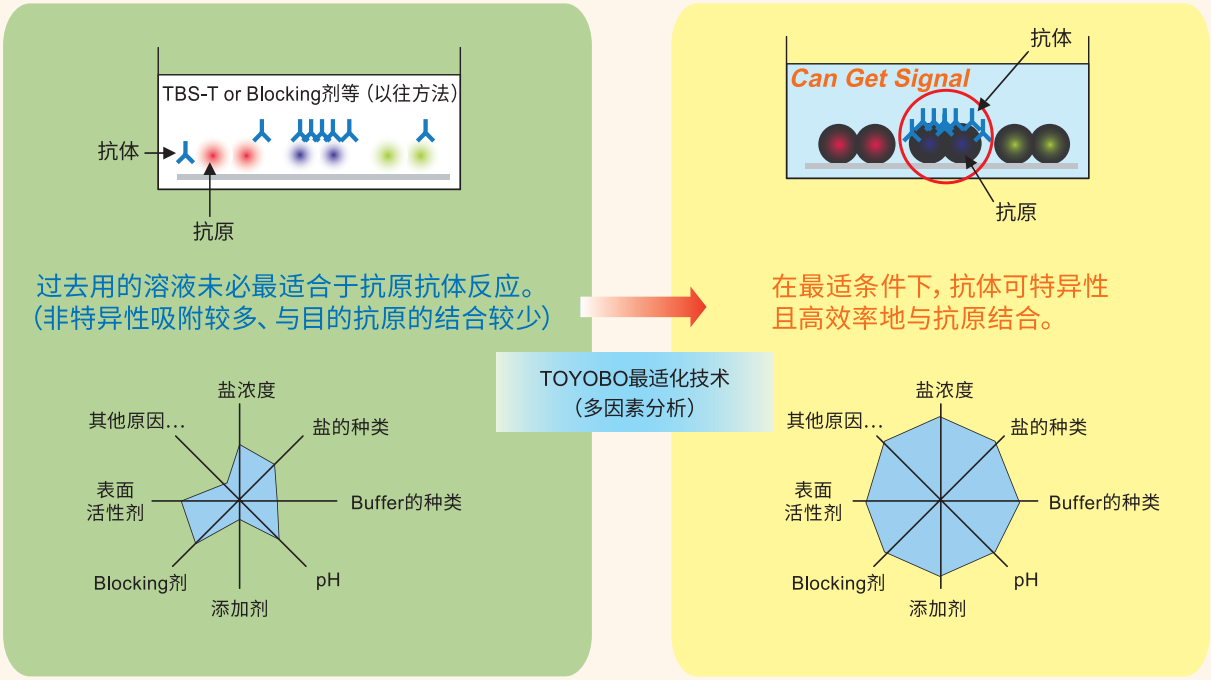
※4℃、16h的情况下S/N要好一些。

Can Get Signal immunostain中有Solution A和Solution B两种溶液，均可用于一抗及二抗反应。由于各试剂对抗原抗体反应的促进效果不同，对灵敏度及背景的影响也不同，因此，进行最初实验时，建议分别用Solution A和B摸索条件，根据使用的样品和抗体，选择最合适的Solution。反应用的抗体浓度，以推荐浓度为标准，或少于推荐浓度，可得到较好的结果。固化组织、冻结切片及固化细胞等都可以作为样品使用；固化和活性化用一般方法即可。

4. *Can Get Signal* 系列产品特性及使用标准

(1) 关于产品特性

*Can Get Signal*系列产品通过优化盐浓度、pH值、添加剂等，在增强检测信号，降低背景等方面有着显著的效果，是最适合用于抗原抗体反应的Buffer溶液。



(2)关于使用标准

Can Get Signal		*Can Get Signal* **immunostain**	
• Western Blot • Dot Blot • ELISA等	■Western Blot・Dot Blot分析 ●使用2种抗体的情况下 一抗反应→Solution 1 二抗（标记）反应→Solution 2 ●直接使用抗体标记反应的情况下 抗体标记反应→Solution 2（也可根据情况使用Solution 1） ■三明治ELISA 固相抗体→用碳酸缓冲液等固定化 抗原反应→Solution 1 一抗反应→Solution 1 二抗（标记）反应→Solution 2	免疫组化 （组织・细胞等）	●第一步:试一下Solution A的效果 一抗→Solution A 二抗→Solution A ●第二步:试一下Solution B的效果 一抗→Solution B 二抗→Solution B ※初次使用时，需要对两种试剂的使用效果进行预测试，选择使用效果更好的Solution。

增强 Western Blot 及 ELISA 等的检测信号，降低背景。

Western Blot·ELISA 用免疫反应增强液

Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution

Solution 1 & 2	Code：NKB-101T	各 50ml×1瓶	￥200	Solution 1	Code：NKB-201	250ml×1瓶	￥380
Solution 1 & 2	Code：NKB-101	各 250ml×1瓶	￥700	Solution 2	Code：NKB-301	250ml×1瓶	￥380

本试剂可直接作为一抗及二抗的反应液（稀释液）用，是改善 Western Blot 分析、ELISA 的灵敏度及特异性的 buffer。



➔ 特 征

❶改善了灵敏度及特异性

在保持高特异性的基础上，对抗原抗体反应具有很强的促进效果，与以往的方法相比可得到高几倍到几十倍的信号。
特别是对反应性低的抗体的效果更为显著。

❷广泛的适用性

可用于各种使用标记抗体的化学发光检测体系、化学显色检测体系以及荧光检测体系等。

❸使用方便的 Ready-to-use 型

已经按照使用浓度进行了配制，无须进行稀释。

➔ 用 途：Western Blot、Dot Blot、ELISA（参照 6-5 页相关说明）

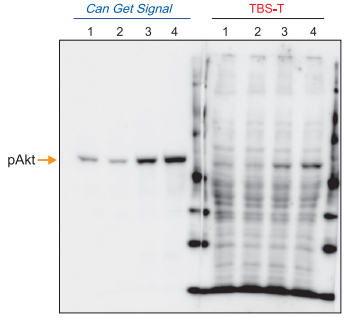
➔ 说 明

本产品含有 Solution1 和 Solution2 分为一抗用及二抗用，其溶液都经过最优化处理，故可得到低背景、高信号的结果。

➔ 结果示例

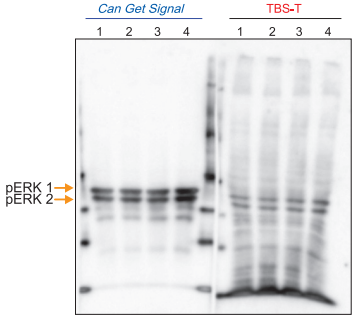
❶通过 Western Blot 检测磷酸化蛋白质

往培养牛肾上腺髓质 chromafin 细胞培养液里添加任意浓度的胰岛素，进行 5 分钟刺激后以细胞的裂解物为样品，通过 Western Blot 法检测磷酸化 Akt 及 ERK 蛋白质。结果可见，与以往方法(使用 TBS-T)相比，使用 *Can Get Signal* 得到的信号明显增强而背景很低。



样品：培养牛肾上腺髓质细胞
1. Control (H_2O)
2. Insulin (1nM, 刺激5分钟)
3. Insulin (10nM, 刺激5分钟)
4. Insulin (100nM, 刺激5分钟)

通过抗Phospho-Akt抗体，Akt磷酸化的检测结果



样品：培养牛肾上腺髓质细胞
1. Control (H_2O)
2. Insulin (1nM, 刺激5分钟)
3. Insulin (10nM, 刺激5分钟)
4. Insulin (100nM, 刺激5分钟)

通过抗Phospho-ERK抗体，ERK磷酸化的检测结果

※数据由宫崎大学医学部药理学教研室的柳田俊彦老师提供。

产品内容：

<NKB-101T, Starter Set>
Solution 1 50ml×1瓶
Solution 2 50ml×1瓶

<NKB-101>
Solution 1 250ml×1瓶
Solution 2 250ml×1瓶

<NKB-201>
Solution 1 250ml×1瓶

<NKB-301>
Solution 2 250ml×1瓶

保存条件：
4℃

商品使用文献：

1) N.Watanabe, et al., *Proc Natl Acad Sci USA.*, **102**(33): 11663-8.(2005)
2) M.Katsuno, et al., *Proc Natl Acad Sci USA.*, **102**(46): 16801-6.(2005)
3) K.Shimono, et al., *J Biol Chem.*, **280**(47): 39436-47.(2005)
4) Y.Matsuzono, et al., *J Biol Chem.*, **281**(1): 36-42.(2006)
5) T.Hanada, et al., *Autophagy.*, **2**: 110-118.(2006)

备注：

请另行准备 Blocking 试剂和检测试剂。本试剂不适合用于 Blocking。
免疫组织染色和免疫细胞染色推荐使用 *Can Get Signal* Immunostain（→ 6-8 页）

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

❷通过 Western Blot 检测 EGFR

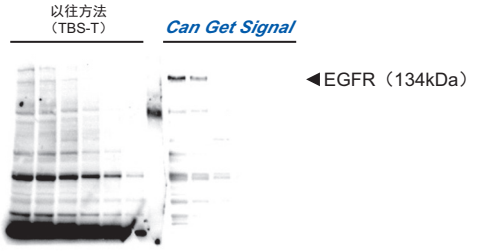
通过 Western Blot 检测从人的扁平上皮细胞（A431）中发现的 EGFR（Epidermal Growth Factor）。

以 A431 细胞的裂解液为样品，一抗反应用 *Can Get Signal* Solution 1 [一抗：抗人 EGFR 抗体（mouse IgG1）]，

二抗反应用 Solution 2 [二抗：抗小鼠 IgG（Fab Specific、HRP 标记）] 进行检测。

同时，作为对照，用 TBS-T（以往方法）进行同样的实验。

结果可见，用以往方法非特异性条带很浓，几乎无法检测出目的条带，而用 *Can Get Signal* 则非特异性条带显著减少，同时可确认到信号增强。

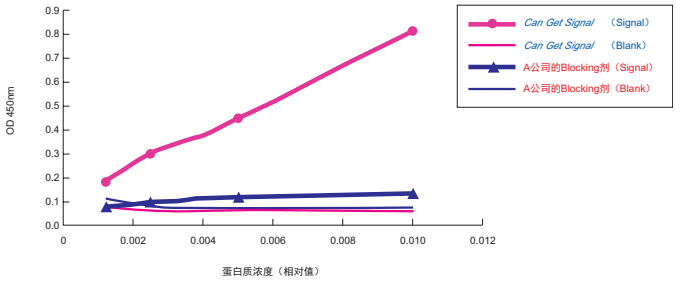


Human EGFR的检测例

❸通过 ELISA 检测 His -tag- 融合型 ERK2 蛋白质

通过三明治 ELISA 法（固相抗体 : 抗 ERK2 单克隆抗体、1 抗：抗 His -tag- 多克隆抗体、2 抗 : 抗兔 IgG-HRP 抗体），对用无细胞蛋白质合成法合成的人源由来的 His -tag- 融合型 MAP 激酶（His-ERK2）进行检测。

结果可见，通过在市售的封闭液中进行抗体反应的原方法，几乎得不到检测结果。而使用 *Can Get Signal*，则无论在低浓度区域还是在高 S/N 比的条件下均可得到高灵敏度的检测结果。



通过三明治ELISA法的评价结果

➔ 相关产品

❶ 组织免疫染色用免疫反应增强液

Can Get Signal immunostain	-	-	-	→ 6-8 页

增强免疫组织染色的检测信号，降低背景。

免疫组织染色用免疫反应增强剂

Can Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution

Starter set(Solution A&B)	Code：NKB-401	各 5ml × 1瓶	￥400
Solution A	Code：NKB-501	20ml × 1瓶	￥1,000
Solution B	Code：NKB-601	20ml × 1瓶	￥1,000

本试剂可直接作为免疫组织染色抗体的反应液（稀释液）用，是改善免疫组织、免疫细胞染色实验灵敏度及特异性的buffer。



➔ 特 征

❶灵敏度及特异性得到改善

在保持高特异性的基础上，对抗原抗体反应具有很强的增强效果，与以往的方法相比可得到高 S/N 比的良好的信号。另外，减少 2 抗的使用量，可抑制背景，得到明亮的图象。

❷广泛的适用性

可用于化学显色、化学发光以及荧光等检测体系。
也可与 ABC 法、Polymer Complex 法等增强灵敏度的系统一起使用。

❸使用方便的 Ready-to-use 型

已经按照使用浓度进行了配制，无须进行稀释。

➔ 用 途：免疫组织染色、免疫细胞染色 （参照 6-5 页相关说明）

➔ 说 明

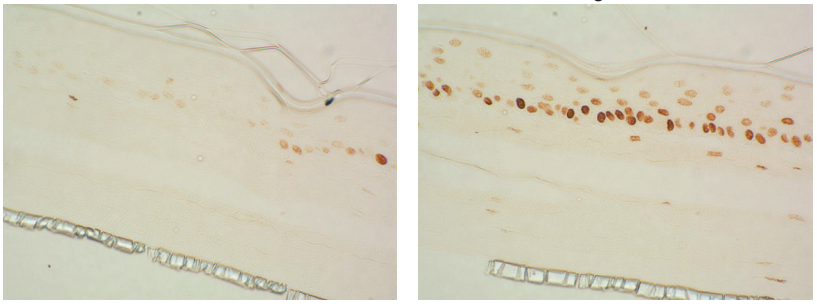
Can Get Signal immunostain 是在广受好评的 Western Blot、ELISA 用 *Can Get Signal*（→ 6-6 页）的基础上改良的免疫染色专用抗体反应缓冲液。本试剂备有不同反应促进效果的 SolutionA 和 B，最初探讨时就可用 Starter Set（Code No.NKB-401）进行评价。SolutionA 和 B 都可用于一抗及二抗（标记抗体）的反应，和分别对应于 1 抗和 2 抗的 *Can Get Signal* 的 Solution1 和 2 不同。

➔ 结果示例

❶通过免疫组织染色检测 PCNA（增殖细胞核抗原）

用通过人皮肤组织为模型配制的石蜡包埋切片作为抗原，分别使用抗 PCNA mouse 单克隆抗体（1 抗），生物素标记的抗 mouse IgG 的 2 抗，通过免疫组织化学染色对 PCNA 进行检测（ABC 法）。分别使用 *Can Get Signal* immunostain 和含 1.5% 马正常血清的 PBS（以往方法）对抗体的反应进行染色效率的比较。结果可见，与以往方法相比，用 *Can Get Signal* immunostain 可得到高信号、低背景、明亮的染色图象。

以往方法 | *Can Get Signal* immunostain



通过抗 PCNA 抗体法的免疫组织染色

产品内容：

<NKB-401, Starter Set>
Solution A 5ml×1瓶
Solution B 5ml×1瓶

<NKB-501>
Solution A 20ml×1瓶

<NKB-601>
Solution B 20ml×1瓶

保存条件：
4°C

商品使用文献：

1) K.Moriguchi, et al., *Plant Cell.*, **17**(2): 389-403.(2005)
2) Tokuda M, et al., *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, **76**: 130-141.(2007)
3) K.Tamura, et al., *The Plant Cell* **19**: 320-332.(2007)
4) H.li, et al., *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **31** (3): 363.(2008)
5) K.Tokuhiro, et al., *Asian J Androl* **10**(5): 711-718. (2008)

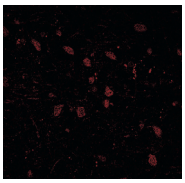
备注：

Western Blot ELISA 推荐使用 *Can Get Signal* Immunoreaction Enhancer Solution （→ 6-6 页）。

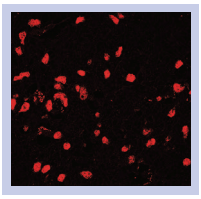
TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

❷ Olig2 染色与以往方法的比较探讨

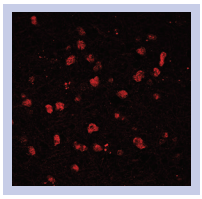
用 1%BSA/PBS、Solution A 或 Solution B 稀释 Anti-Human Olig2 Rabbit IgG 和 Alexa 594 goat anti-rabbit IgG（H+L），来检测人・脑肿瘤（恶性胶质瘤 glioblastoma）[石蜡包埋切片] 的 Olig2 的染色。
结果可见，用以往方法信号很微弱，而用 *Can Get Signal* immunostain 信号可得到增强。特别是用 Solution A 的情况下，染色非常明亮，且抑制了背景。
但考虑到非特异性反应，从观察角度来讲用 Solution B 也足够了。



以往方法



Can Get Signal immunostain
Solution A使用



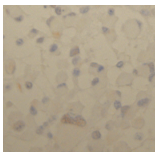
Can Get Signal immunostain
Solution B使用

恶性胶质瘤 glioblastoma 中表达的 Olig2 的荧光染色

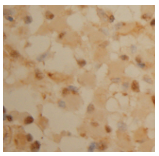
※ 数据由北海道大学研究生院 医学研究科 分子细胞病理学领域
野田頭未步 老师、笹井研 老师提供

❸ CD133 免疫染色与以往方法的比较探讨

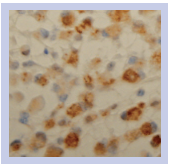
用 1%BSA/PBS、Solution A 或 Solution B 稀释 Rabbit polyclonal to CD133-Stem Cell Marker 和 Envision（Dako ChemMate），来检测人・脑肿瘤（恶性胶质瘤 glioblastoma）[石蜡包埋切片] 的 CD133 的染色。
结果可见，用以往方法信号很微弱，而用 *Can Get Signal* immunostain 信号可得到增强。但是，用 Solution A 的情况下背景很高，整体来看染色程度与以往方法差不多，不适合观察。
而用 Solution B，通过优化抗体稀释倍率，可看到更好的染色条件。



以往方法

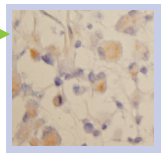


Can Get Signal immunostain
使用Solution A



Can Get Signal immunostain
使用Solution B

还可以提高抗体的稀释倍率！



本实验的老师之后在Solution B实验条件的基础上，将一抗稀释100倍（反应时间：4℃•O/N），仍可得到良好的充分诊断的结果。由此可节约抗体。

恶性胶质瘤 glioblastoma 中表达的 CD133 的染色

【数据提供】
※ 数据由北海道大学研究生院 医学研究科 分子细胞病理学领域
野田頭未步 老师、笹井研 老师提供

➔ 相关产品

❶ Western Blot•ELISA 用免疫反应增强液

Can Get Signal	-	-	-	→ 6-6 页

Note

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

「Appendix」

第 7 章　目录　7-1

➔ 主要大肠杆菌的基因型　7-2

➔ 遗传 Marker　7-4

➔ DNA 片段的泳动　7-6
凝胶电泳
聚丙烯酰胺凝胶电泳

➔ 遗传密码 • 氨基酸省略符号表　7-8

➔ 计算式 • 换算式　7-8
寡聚核苷酸 Tm 值的计算公式
寡聚核苷酸摩尔数的计算公式
各种换算式

➔ 基因工程中常用的培养基和试剂组成　7-9

➔ TOYOBO 常见问题 Q&A　7-11

INDEX

主要大肠杆菌的基因型

Strain	Genotype
AG1	*end*A1, *gyr*A96, *hsd*R17(r_K^- m_K^+), *rec*A1, *rel*A1, *sup*E44, *thi*-1, F^-
BB4	*gal*K2,*gal*T22, *hsd*R514(r_K^- m_K^+), *lac*Y1, *mcr*A^-, *met*B1, *sup*E44, *sup*F58, *trp*R55, Δ(*arg* F-*lac*)U169, F' [*pro*AB,*lacI*^{q} ZΔM 15, Tn1 0]
BL21	*E. coli* B, F^-, *dcm, omp*T, *hsd*S(r_B^- m_B^-), *gal*
BL21(DE3)	*E. coli* B, F^-, *dcm, omp*T, *hsd*S(r_B^- m_B^-), *gal,* λ (DE3)
BL21(DE3)pLysS	*E. coli* B, F^-, *dcm, omp*T, *hsd*S(r_B^- m_B^-), *gal,* λ (DE3)[pLysS,Cam^r]
BL21-CodonPlus-RIL	*E. coli* B, F^-, *omp*T, *hsd*S(r_B^- m_B^-), *dcm*$^+$, Tet^r, *gal, end*A, Hte, [*arg*U,*ile*Y,*leu*W, Cam^r]
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	*E. coli* B, F^-, *omp*T, *hsd*S(r_B^- m_B^-), *dcm*$^+$, Tet^r, *gal,* λ (DE3),*end*A, Hte, [*arg*U,*ile*Y,*leu*W, Cam^r]
BL21-CodonPlus(DE3)–RIL-X	*E. coli* B, F^-, *omp*T, *hsd*S(r_B^- m_B^-), *dcm*$^+$, Tet^r, *gal,* λ (DE3), *end*A, Hte,*met*A::Tn5(Kan^r),[*arg*U,*ile*Y, *leu*W,Cam^r]
BL21-CodonPlus-RP	*E. coli* B, F^-,*omp*T, *hsd*S(r_B^- m_B^-), *dcm*$^+$, Tet^r, *gal, end*A, Hte, [*arg*U,*pro*L,*Cam*^{r}]
BL21-CodonPlus(DE3)-RP	*E. coli* B, F^-,*omp*T, *hsd*S(r_B^- m_B^-), *dcm*$^+$, Tet^r, *gal,* λ (DE3),*end*A, Hte, [*arg*U,*pro*L,Cam^r]
BL21-CodonPlus(DE3)-RP-X	*E. coli* B, F^-,*omp*T, *hsd*S(r_B^- m_B^-), *dcm*$^+$, Tet^r, *gal,* λ (DE3),*end*A,Hte
BL21-Gold	*E. coli* B, F^-, *omp*T, *hsd*S(r_B^- m_B^-), *dcm,* Tet^r, *gal, end*A, Hte
BL21-Gold(DE3)	*E. coli* B, F^-, *omp*T, *hsd*S(r_B^- m_B^-), *dcm,* Tet^r, *gal, end*A, Hte, λ (DE3)
BL21-Gold(DE3)pLysS	*E. coli* B, F^-, *omp*T, *hsd*S(r_B^- m_B^-), *dcm,* Tet^r, *gal, end*A, Hte, λ (DE3) [pLysS Cam^r]
BM25.8	*sup*E44, *thi*, Δ(*lac-pro*AB),[*F' tra*D36,*pro*AB+,*lacI*^{q}ZΔM15], λ*imm*434 (*Kan*), P1(Cam^r), *hsd*R(r_{k12}-m_{k12}-)
C600	F^-, *thi*-1, *thr*-1, *leu*B6, *lac*Y1, *ton*A21, *sup*E44, λ^-
C600(BNN93)	*lac*Y1, *leu*B6, *mcr*B$^+$,*sup*E44, *thi*-1, *thr*-1, *ton*A21, F^-
C600 *hfl*(BNN102)	*hfl*A150[Chr::Tn10], *lac*Y1,*leu*B6,*mcr*B$^-$,*sup*E44,*thi*-1,*thr*-1,*ton*A21,F^-
DH1	*end*A1, *gyr*A96, *hsd*R17(r_K^- m_K^+), *rec*A1,*rel*A1, *sup*E44, *thi*-1, F^-
DH5	*des*Rend*A*1,*gyr*A96, *hsd*R17, *rec*A1, *sup*E44, *rel*A1,*thi*-1
DH5α	*deo*R, *end*A1, *gyr*A96, *hsd*R17(r_K^- m_K^+), *rec*A1,*rel*A1, *sup*E44, *thi*-1, Δ(*lac* ZYA-*arg*F)U169, ϕ80*lac*Z ΔM15,F-, λ–
DP50, *supF*	F^-, *ton*A53, *dap*D8, *lac*Y1, *gln*V44(*sup*E44), Δ (*gal-uvr*B)47, λ–, *tyr*F58 (*sup*T58),*gyr*A29, Δ (*thy*A57), *hsd*S3
Electro Ten-Blue™	Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173,*end*A1, *sup*E44, *thi*-1, *rec*A1, *gyr*A96, *rel*A1,*lac,* Kan^r, Hee, [F',*pro*AB, *lacI*^{q}ZΔM15, Tn10 (Tet')]
HB101	F^-, *hsd*S20(r_B^-,m_B^-), *rec*A13, *ara*-14, *pro*A2, *lac*Y1, *gal*K2, *rps*L20 (Sm^r), *xyl*-5, *mtl*-1, *sup*E44, λ–
JM83	*ara*Δ(*lac-pro*AB), *rsp*L, ϕ80*lac*ZΔ M15
JM101	*sup*E, *thi-1,* Δ(*lac-pro*AB),[F', *tra*D36, *pro*AB,*lacI*^{q}/ ZΔM15]
JM105	*thi*-1, *rps*L, *end*A, *sbc*BC, *hsd*R4 Δ(*lac-pro*AB),[F' *tra*D36, *pro*AB, *lacI*^{q}/ ZΔM15]
JM106	e14- (*Mcr*A-), *end*A1, *gyr*A96, *thi-1, hsd* R17, *sup*E44, *rel*A1, Δ(*lac-pro*AB)
JM107	e14- (*Mcr*A-), Δ(*lac-pro*AB), *thi*-1, *gyr*A96, *end*A1, *hsd*R17, *rel*A1, *sup*E44, [F', *tra*D36, *pro*AB *lacI*^{q}Z ΔM15]
JM108	e14- (*Mcr*A-), *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi-1, hsd*R17, *sup*E44, *rel*A1, Δ(*lac-pro*AB)
JM109	e14- (*Mcr*A-), *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi-1, hsd*R17 (r_K^-, m_K^+), *sup*E44, *rel*A1, Δ(*lac-pro*AB), [F', *tra*D36, *pro*AB, *lacI*^{q}Z ΔM15]
JM110	*rps*L(Str^r),*thr, leu, thi*-1, *lac*Y,*gal*K, *gal*T,*ara, ton*A,*tsx, dam,dcm, sup*E44, Δ(*lac-pro*AB), [F', *tra*D36, *pro*AB, *lacI*^{q}ZΔ M15]
K802	e14- (*Mcr*A-), *mcr*B1, *hsd*R2, *gal*K2, *gal*T22, *sup*E44, *met*B1
K803	*gal*K2, *gal*T22, *hsd* S3(r_K^-, m_K^-), *lac*Y1, *met*B1, *mrr*$^+$, *sup*E44, F^-
LE392	F^-, *hsd*R514(r_K^-, m_K^+), *sup*E44, *sup*F58, *lac*Y1 orΔ(*lac*IZY)6, *gal*K2, *gal*T22, *met*B1, *trp*R55, λ^-
MM294	*end*A1, *hsd*R17(r_K^- m_K^+), *sup*E44, *thi*-1, F^-
MV1184	*ara-*,Δ(*lac-pro*AB), Δ (*srl-rec*A)306:: Tn10,ϕ80d*lac*ZΔM15, *rps*L-, *thi-*, [F' , *lacI*^{q}*lac*Z Δ M15, *pro*AB, *tra*D36]
MV1190	Δ (*lac-pro*AB),Δ (*srl-rec*A)306:: Tn10, *sup*E, *thi-*, [F', *lacI*^{q}*lac*ZΔM15, *pro*AB, *tra*D36]
MV1304	Δ (*lac-pro*AB),Δ (*srl-rec*A)306:: Tn10, *end*A, *hsd*R5, *rps*L, *sbc*B15, *thi*,[F', *lacI* ^{q}*lac*Z Δ M15, *pro*AB, *tra*D36]
NM538	F^-,*hsd*R(r_K^-, m_K^+), *lac*Y,ϕ80r, *sup*E, *sup*F, *trp*R
NM539	*hsd*R(P2 COZ),*sup*F
NM522	Δ*hsd*5(r_K^- m_K^+),*sup*E,*thi*-1,Δ(*lac-pro*AB), F' [*pro*AB, *lac* I^q ZΔ M15]
NM554	*rec*A13, *ara*D139, Δ(*ara-leu*)7696, Δ (*lac*) 17A, *gal*U, *gal*K, *hsd*R, *rps*L(Str^r), *mcr*A, *mcr*B
P2392	*hsd*R514(r_K^- m_K^+), *sup*E44, *sup*F58, *lacY*, *gal*K2, *gal*T22, *met*B1, *trp*55, *mcr*A(P2)
P2PLK-17	PLK-17(P2 lysogen)



TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

Strain	Genotype
PLK-17	e14- (*Mcr*A-), *mcrB1, lac, hsd*R2(r_K-m_{K+}), *sup*E44, *gal*K2, *gal*T22, *met*B1
PLK-F'	e14- (*Mcr*A-), *mcrB1, rec*A, *lac, hsd*R2(r_K-m_{K+}), *sup*E44, *gal*K2, *gal*T22, *met*B1,[F', *pro*AB, *lacI*^{q}Z Δ M15, Tn10(Tet^r)]
Q358	*hsd*R_K^-, *hsd*M_K^+, *sup*E,ϕ80
Q359	*hsd*R_K^-, *hsd*M_K^-, *sup*E,ϕ80,P2
RR1	Δ(*gpt-pro*A)*62, leu*B6, *thi*-1, *lac*Y1, *hsd*S_B20, *rps*L20(Str^r), *ara*-14, *gal*K2,*xyl*-5, *mtl*-1, *sup*E44, *mcr*B_B
SCSI	*end*A1, F-, *gyr*A96,*hsd*R17(rk-,mk+), λ-, *rec*A1, *rel*A1, *sup*E44, *thi*-1
SOLR™	e14- (*Mcr*A-), Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)171, *sbc*C, *rec*B, *recJ*, *uvr*C, *umu*C,::Tn5(Kan^r), *lac*, *gyr*A96,*rel*A1, *thi*-1, *end*A1, λ^r,[F', *pro*AB, *lacI*^{q}Z ΔM15]^c Su- (nonsuppressing)
SoloPack® Gold	Tet^r, Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173,*end*A1,*sup*E44, *thi*-1, *rec*A1,*gyr*A96,*rel*A1, *lac*, Hte, [F', *pro*AB, *lacI*^{q}Z ΔM15, Tn10(Tet^r), Amy, Cam^r]
SRB	e14- (*Mcr*A-), Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)171, *sbc*C, *recJ*, *uvr*C, *umu*C,::Tn5(Kan^r),*sup*E44, *lac,gyr*A96,*rel*A1, *thi*-1, *end*A1,[F', *pro*AB,*lacI*^{q}Z Δ M15]
SRB(P2)	SRB(P2 lysogen)
SURE®	e14- (*Mcr*A-),Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)171, *end*A1, *sup*E44 *thi*-1, *gyr*A96, *rel*A1, *lac*, *rec*B *recJ*, *sbc*C, *umu*C,::Tn5(Kan^r),*uvr*C,[F',*pro*AB,*lacI*^{q}Z ΔM15, Tn10(Tet^r)]
SURE® 2	e14- (*Mcr*A-), Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)171,*end*A1, *sup*E44, *thi*-1, *gyr*A96, *rel*A1, *lac*, *rec*B *recJ*, *sbc*C, *umu*C,::Tn5(Kan^r), *uvr*C[F', *pro*AB, *lacI*^{q} Z ΔM15, Tn10(Tet^r), Amy, Cam^r]
TKX1	Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-mrr)173, *end*A1, *sup*E44, *thi*-1, *rec*A1, *gyr*A96, *rel*A1, *lac* [F' *pro*AB,*lacI*^{q}Z ΔM15, Tn5(Kan^r)] [pTK Tet^r]
TKB1	F-, *dcm*-,*omp*T, *hsd*S(r_B-m_B-), *gal*, λ(DE3)[pTK Tet^r]
XL1-Blue	recA1,*end*A1,*gyr*A96, *thi*-1, *hsd*R17,*sup*E44, *rec*A1,*lac*[F', *pro*AB,*lacI*^{q}Z ΔM15, Tn10,(Tet^r)]
XL1-Blue MR	Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-mrr)173, *end*A1,*sup*E44, *thi*-1, *rec*A1, *gyr*A96, *rel*A1, *lac*
XL1-Blue MRA	Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173, *end*A1,*sup*E44, *thi*-1, *rec*A96, *gyr*A1, *rel*A1, *lac*
XL1-Blue MRA(P2)	XL1-Blue MRA(P2 lysogen)
XL1-Blue MRF'	Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173,*end*A1,*sup*E44, *thi*-1, *rec*A1, *gyr*A96, *rel*A1, *lac* [F', *pro*AB, *lacI*^{q} Z ΔM15,Tn10 (Tet^r)]
XL1-Blue MRF' Kan	Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173, *end*A1, *sup*E44, *thi*-1, *rec*A1, *gyr*A96, *rel*A1, *lac* [F', *pro*AB, *lacI*^{q} Z ΔM15, Tn5 (Kan^r)]
XL1-Red	*end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *hsd*R17, *sup*E44, *rel*A1, *lac*, *mut*D5,*mut*S, *mut*T, Tn10(Tet^r)
XL2-Blue	*rec*A1,*end*A1,*gyr*A96, *thi*-1, *hsd*R17,*sup*E44,*rel*A1, *lac*[F',*pro*AB, *lacI*^{q}ZΔ M15, Tn10 (Tet^r), Amy, Cam^r]
XL2-Blue MRF'	Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173,*end*A1,*sup*E44, *thi*-1, *rec*A1, *gyr*A96, *rel*A1, *lac* [F', *pro*AB, *lacI*^{q} Z ΔM15, Tn10 (Tet^r), Amy,Cam^r]
XL10-Gold®	Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173,*end*A1,*sup*E44,*thi*-1, *rec*A1, *gyr*A96,*rel*A1, *lac,*Tet^r. Hte, [F', *pro*AB, *lacI*^{q}Z ΔM15, Tn10(Tet^r), Amy
XL10-Gold Kan^r	Tet^r, Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173,*end*A1,*sup*E44, *thi*-1, *rec*A1, *gyr*A96,*rel*A1, *lac,*Hte, [F', *pro*AB, *lacI*^{q} Z ΔM15, Tn10(Tet^r),Tn5(Kan^r), Amy]
XL*mut*S Kan^s	Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173, *end*A1, *sup*E44, *thi*-1, *gyr*A96, *rel*A1, *lac, must*S:: Tn10(Tet^r) [F', *pro*AB,*lacI*^{q}Z ΔM15, Tn5]
XL*mut*S Kan^r	Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173,*end*A1,*sup*E44,*thi*-1, *gyr*A96, *rel*A1, *lac, must*S:: Tn10 (Tet^r) [F', *pro*AB,*lacI*^{q}ZΔ M15, Tn5(Kan^r)]
Y1088	e14- (*McrA*-), Δ(lac)U169, *sup*E, *sup*F, *hsd*R, *met*B, *trp*R, *ton*A21, *pro*C,:: Tn5(Kan^r) [pMC9, Amp^r, Tet^r] (Note:pMC9 is pBR322 with *lacI*^{q} inserted.)
Y1089	Δ(*lac*)U169, Δ(*lon*),*ara*D139, *str*A. *hfl*A150,::Tn10(Tet^r) [pMC9, Amp^r, Tet^r] (Note:pMC9 is pBR322 with *lacI*^{q} inserted.)
Y1089r-	Y1089, *mcr*B
Y1090	Δ(*lac*)U169, Δ(*lon*),*ara*D139, *str*A. *sup*F, *mcr*A, *trp*C22,::Tn10(Tet^r) [pMC9, Amp^r,Tet^r] (Note:pMC9 is pBR322 with *lacI*^{q} inserted.)
Y1090r-	Y1090, *mcr*B, *hsd*R
XLOLR	Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173, *end*A1, *thi*-1, *rec*A1, *gyr*A96, *rel*A1, *lac* [F', *pro*AB, *lacI*^{q}ZΔM15, Tn10(Tet^r)], Su- (nonsuppressing), λ^r
XPORT	Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173,*end*A1,*sup*E44,*thi*-1, *rec*A1, *gyr*A96, *rel*A1, *lac* [F', *pro*AB, *lacI*^{q}ZΔM15]



遗传 Marker

基因型	特　　性
Amp^r	对Ampicillin表现耐性。
ara	arabinose分解能力的缺失。
*ara*C	arabinose;reguratoty gene表达的activator和repressor protein缺失。
*ara*D	Arabinose, L-Ribulosephosphate 4-epimerase的缺失。
*arg*F	arginine;ornithine carbamoyltransferase的缺失。
asd	Aspartate semialdehyde dehydrogenase的缺失。
*bio*H	=bioB, Biotin synthetase的缺失。
Cam^r	对Chloramphenicol表现耐性。
*cyc*A	对D-Cycloserine及D-Serine有抗性。对D-Alanine, D-Serine和Glycine输送能力的缺失。
dam	GATC序列中针对Adenine位点的DNA adenine methylase的缺失型受到此缺失影响的DNA只有在转化成dam$^-$株后才能再次被限制酶酶切。（如*Bcl* Ⅰ等）
*dap*D	Diaminopimelate, Tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase的缺失。
dcm	CCWGG序列中针对Cytosine(C)位点的DNA cytosine methylase的缺失。此序列的甲基化通常导致限制酶(*Ava* Ⅱ等)的作用丧失，欲使其再次恢复受这类限制酶的酶切，需先将转化成dam$^-$株，再进行DNA制备。
*deo*R	Deoxyribose, deo operon制御基因的缺失。
e14	K12株特有的溶原化噬菌体。由于有mcrA基因，故e14$^-$株同时也表现为*Mcr*A$^-$。
*end*A	非特异性内切酶Ⅰ的缺失。通常认为带有此缺失特性的大肠杆菌所复制的DNA受到损伤较少。
F	低拷贝的性因子质粒。
*fhu*A	Ferric hydroxamate uptake, Fe-Cr, Colicin等外膜受体的缺失。
*gal*K	galactose;galactokinase的缺失。
*gal*T	galB Galactose, galactose-1-phosphate uridylytransferase的缺失。
*gal*U	galactose;glucose-1-phosphate uridylytransferase的缺失。
gpt	Guanine-hypoxathine phosphoribosyltransferase的缺失。
*gyr*A	DNA gyrase(subunit A)的缺失。对nalA, nalidixic acid具有感受性。
Hee	High Electroporation Efficiency。
hfl	λ phage溶原化频度的上升；特定的protease的缺失。
hsd	大肠杆菌与酶切特性有关的基因型hostspecificity defective的省略表示。Ecok(或EcoB)株对由这2个对应基因的任何1个导致的未被甲基化的DNA(hsds)将视为外敌而予以酶切破坏。hsdR变异失去了酶切特性但仍保持受保护的甲基化特性（rm$^+$）。另一方面，hsds 变异却是两者都发生了缺失（rm^t）。
*hsd*M	宿主特异性的缺失。DNA Methylase的缺失。
Hte	High Transformation Efficiency.
Kan^r	对Kanamycine 表现耐性。
lacI^q	Lactose,Lactose Repressor过度表达株。更彻底地抑制了Lactose Promotor引发的表达。
lacI	lactose;reguratory gene表达的lac operon及repressor protein的缺失。
lacY	Lactose,Lactose Permease的缺失。
lacZ	Lactose, β-Galactosidaze的缺失。
*lacZ*ΔM15	β - galactosidase部分的缺失导致的 β-galactosidase的α-conplementation。
*leu*B	Leucine, β -isopropylmalate dehydrogenase的缺失。
lon	Long form, 破坏异型蛋白的分解酶的缺失型。此缺失型株内的某些真核生物蛋白质可在一定程度上受到保护而免于被分解，可以更稳定地进行扩增。
mcr	methyl cytosine restriction,某些特定的碱基序列被甲基化时，可仍被*Mcr*$^+$酶切攻击。⊿（mcrC-mrr）则表示以下6个连续基因的缺失：mcrC-mcrB-hsdB-hsdM-hsdR-mrr 。
*met*B	Methionine, cystathionine γ- synthase的缺失。
*min*B	Minicell, 可观察到不含DNA的小细胞的形成。
mrr	大肠杆菌与酶切特性有关的基因型methylation requiring restriction的省略表示。仅对Cytosine或adenine位点受到甲基化的DNA进行酶切破坏。未发现有共通的含甲基化位点碱基序列。
mtl	mannitol分解能力的缺失。
*mtl*D	Mannitol, Mannitol-1- phosphate dehydrogenase的缺失。
*pro*A	Proline, γ- glutamyl phosphate reductase的缺失。



TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

基因型	特　　性
proAB	proline要求性的缺失。
rec	Recombination：相同重组限制酶切特性有关的大肠杆菌基因型统称，主要有以下类型。 *r e c A*：相同重组系(*lex*B, *rec*H, *rnm*B, *tif, umu*B, *zab*)的缺失，对处理50bp以上的反复序列DNA片断时有用。 *rec*BC：外切酶V重组活性的缺失，在recB-中，相同重组不易发生，故反向重复序列可稳定存在，但质粒体的复制有时会发生些问题。 *r e c* D: *ExoV*（2 subunit）的外切酶活性的缺失，但重组活性正常，λ噬菌体的反向重复序列可正常进行扩增。
*rel*A	Relaxed, RNA体内合成的抑制。ATP: GTP 3' -pyrophosphotransferase的缺失。
rfa	Rough, ribopolysaccharide合成路线的缺失。
*rfb*D	Rough, 一群*rfa*,*rfb*基因中，TDP-rhamnose synthetase的缺失。
*rps*L	Ribosomal protein,small:*str*A（Streptomycin耐性），30S ribosomal subunit protein S12的缺失。
Str^r	对Streptomycin有耐性。
*sup*E	Suppressor,ochre(UAG)变异的supressor变异。
*sup*F	Suppressor,amber(UAG)变异的supressor变异。
Tet^r	对Tetracycline有耐性。
thi-1	thiamine thiazole要求性的缺失。
thiB	Thiamin, Thiaminphosphate pyrophosphorylase的缺失。
thr	threonine要求性的缺失。
*thr*C	Threonine,Threonine synthase的缺失。
*thy*A	Thymine, Thymidilate synthetase的缺失。
Tn10	Transposon 10. transposon。
*ton*A	用来对付ferrichrome, colicin M. phage T1·T5· ϕ 80的outer membrane protein的缺失。
*ton*B	对colicin, phage T1·ϕ 80耐性的缺失。
*tra*D	Transmissibility, F因子自我输送能力的显著降低。
*trp*R	Tryptophan, trp operon及*aro*H(aromatic:tryptophan repressible DAHP synthtase)制御的缺失。
tsx	对phage T6及colicinK有耐性。
*xyl*A	Xylose. D- Xylose isomerase的缺失。
Δ	基因的缺失。
Δlon	fusion protein的稳定化;lon protease的缺失。
参考文献：绪方宣邦、野岛博，《基因工学》，羊土社（1996）	



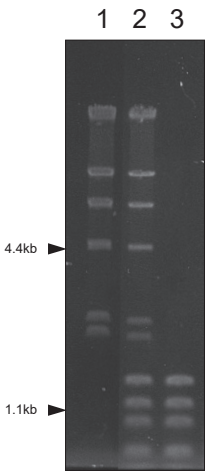
DNA 片段的泳动

➔ 凝胶电泳（使用 1 × TBE Buffer）

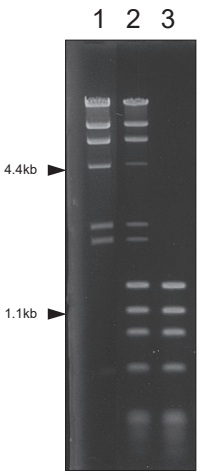
❶参照以下图片

Lane 1；Loading Quick λ / *Hin*d III
Lane 2；Loading Quick λ / *Hin*d III - ϕ X174 / *Hae* III
Lane 3；Loading Quick ϕ X174 / *Hae* III

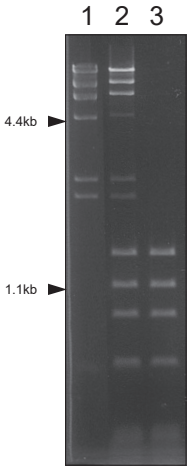
① 0.5%



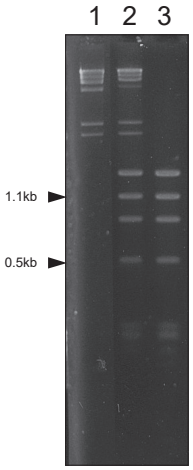
② 1.0%



③ 1.5%



④ 2.0%



❷ 不同的凝胶浓度所对应的适合分析的 DNA 片段长度。

凝胶浓度	DNA 片段长度范围
0.3%	60~5 kb
0.6	20~1
0.7	10~0.8
0.9	7~0.5
1.2	6~0.4
1.5	4~0.2
2.0	3~0.1

❸ 在凝胶电泳中与色素 marker 具有同样迁移率的 DNA 片段长度（碱基对）凝胶浓度：0.5~1.4%

Orange G	BPB	XC
约 50bp	~300bp	~4,000bp

参考文献

1.R. T. Maniatis, E. F. Fritsh and J. Sambrook. *Molecular Cloning*——A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. (1982)



Appendix

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

➔ 丙烯酰胺凝胶电泳

❶ 不同的聚丙烯酰胺凝胶浓度所对应的适合分析的 DNA 片段长度。

聚丙烯酰胺凝胶电泳	DNA 片段长度范围
3.5%	100~1000bp
5.0	80~500
8.0	60~400
12.0	40~200
20.0	10~100

❷ 在聚丙烯酰胺电泳中与色素 marker 具有同样迁移率的片段长度（碱基对）

聚丙烯酰胺凝胶	BPB	XC
3.5%	100 bp	400 bp
5.0	65	200
8.0	45	160
12.0	20	70
20.0	12	45

❸ 在变性聚丙烯酰胺电泳中与色素 marker 具有同样迁移率的 DNA 片段长度（碱基对）

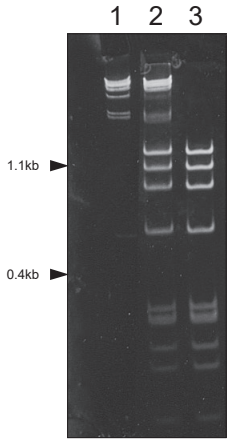
聚丙烯酰胺凝胶	BPB	XC
5.0%	35 bp	130 bp
6.0	20	100
8.0	19	70~80
10.0	12	55
20.0	8	28

参考文献

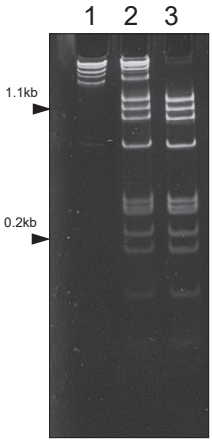
1.R. T. Maniatis, E. F. Fritsh and J. Sambrook. *Molecular Cloning*——A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.（1982）

❹ 以下电泳图片各泳道的样品同前页（7-6 页）。

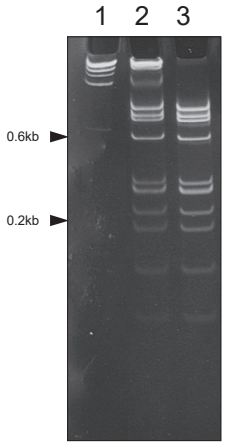
① 4.0%



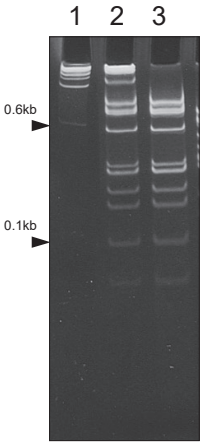
② 6.0%



③ 8.5%



④ 10.0%



Appendix



遗传密码 • 氨基酸省略符号表

➔ 遗传密码

	U	C	A	G
U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA Ochre UAG Amber	UGU Cys UGC Cys UGA Opal UGG Trp
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly

➔ 氨基酸省略符号

氨基酸	3 个字母	1 个字母
Glycine Alanine	Gly Ala	G A
Valine Leucine Isoleucine	Val Leu Ile	V L I
Serine Threonine	Ser Thr	S T
Aspartic Acid Glutamic Acid	Asp Glu	D E
Asparagine Glutamine	Asn Gln	N Q
Lysine Arginine	Lys Arg	K R
Cysteine Methionine	Cys Met	C M
Phenylalanine Tyrosine	Phe Tyr	F Y
Tryptophan Histidine	Trp His	W H
Proline	Pro	P

计算式 • 换算式

➔ 寡聚核苷酸 Tm 值的计算公式

寡聚核苷酸 Tm 值的计算：

①寡聚核苷酸长度小于 18bp 时

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

②寡聚核苷酸长度大于 18bp 时

$Tm = 81.5 + 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\%\ G + C) - (600 / N)$

※ A ：寡核苷酸中 A 的数目
C ：寡核苷酸中 C 的数目
G ：寡核苷酸中 G 的数目
T ：寡核苷酸中 T 的数目
% G + C ：寡核苷酸中 G + C 的%
N ：寡核苷酸的长度（mer）
$[Na^+]$ ：溶液中 Na^+ 浓度（M）

➔ 寡聚核苷酸摩尔数的计算公式

利用脱氧核苷酸的吸光系数来计算

$$\text{mole}\ [\text{pmol}/\mu\text{l}] = \frac{E_{260} \times 100}{A \times 1.54 + C \times 0.75 + G \times 1.17 + T \times 0.92}$$

※A：寡核苷酸中 A 的数目
C：寡核苷酸中 C 的数目
G：寡核苷酸中 G 的数目
T：寡核苷酸中 T 的数目

➔ 各种换算式

$1\mu g = 1\gamma = 10^{-6}g$
$1ng = 10^{-9}g$
$1pg = 10^{-12}g$
1kb double stranded DNA $(Na^+) = 6.6 \times 10^5$ daltons
1kb single stranded DNA $(Na^+) = 3.3 \times 10^5$ daltons
1kb single stranded RNA $(Na^+) = 3.4 \times 10^5$ daltons
1kb DNA = 333 - amino acid coding capacity
average mass of amino acid = 126.7 daltons
10,000dalton protein = 270bp DNA
$1\mu g$/ml of nucleic acid = 3.0 μM phosphate
$1\mu g$/ml of a 1kb nucleic acid = 3.08nM end concentration
1pmol of a 1kb DNA = 0.66 μg
1mole of linear pBR322 DNA = 2.8×10^6g
1pmole of linear pBR322 DNA = 2.8 μg
1 O. D. double stranded DNA = A_{260} of 1.0 = 50 μg/ml
1 O. D. single stranded DNA = A_{260} of 1.0 = 37 μg/ml
1 O. D. single stranded RNA = A_{260} of 1.0 = 40 μg/ml

oligonucleotide
15mer 50ng = 10pmoles
17mer 56ng = 10pmoles
20mer 66ng = 10pmoles
24mer 80ng = 10pmoles



TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

基因工程中常用的培养基和试剂组成

〈培养基〉

★LB培养基

polypeptone	10 g
yeast extract	5 g
NaCl	10 g
(agar	15 g)(pH7.4)
	1 L autoclave

★2×YT培养基

polypeptone	16 g
yeast extract	10 g
NaCl	5 g
(agar	15 g)(pH7.2)
	1 L autoclave

★蓝白菌落选择培养基

polypeptone	10 g
yeast extract	5 g
NaCl	5 g
(agar	15 g)(pH7.4)
	1 L autoclave
100mM IPTG	1 ml } 冷却后混合。
25mg/ml Amp.	1 ml
2%×- gal	2 ml

★MMI 培养基

bacto tryptone	12.5 g
bacto yeast extract	25 g
NaCl	8.5 g
1M Tris-HCl(pH7.2)	20 ml
glycerol	4 ml(pH7.2)
	1 L autoclave

★Super broth培养基

tryptone	32 g
yeast extract	20 g
NaCl	5 g
1N NaOH	5 ml
	1 L autoclave

★M9培养基

Na_2HPO_4	6 g
KH_2PO_4	8 g
NaCl	0.5 g
NH_4Cl	1 g
(agar	15 g)
	500 ml autoclave
1M $MgSO_4$	1 ml } 分别灭菌(Thiamine
2M Glucose	5.6 ml 进行过滤灭菌),
1% VitaminB_1(Thiamine)	1 ml 经过冷却再混合。
1M $CaCl_2$	0.1 ml

★SOC培养基

bacto tryptone	20 g
bacto yeast extract	5 g
1M NaCl	10 ml
1M KCl	2.5 ml(pH 7.4)
	1 L autoclave
1M $MgSO_4$	10 ml } 分别灭菌,
1M $MgCl_2$	10 ml 冷却后混合。
2M Glucose	10 ml

★NZY培养基

NaCl	5 g
$MgSO_4.7H_2O$	2 g
yeast extract	5 g
NZ amine(casein hydrolysate)	10 g
(agar	15 g)(pH 7.5)
	1 L autoclave

★YPD培养基

Difco peptone	20 g
yeast extract	10 g
(agar	15 g)(pH 5.8)
	1 L autoclave
40% dextrose	50 g 分别灭菌，冷却（55～56℃)后混合。

〈RNA抽提 AGPC法〉

★Solution D

Guanidium thiocyanate	25 g /50ml
0.75M-Sodium Citrate(pH7.0)	0.76ml/
10%(W/V)Sodium N-Lauroyl Sarcosinate	2.64ml/
0.1M 2-mercaptoethanol	0.36ml/

〈质粒抽提〉

★Solution Ⅰ

1M Tris-HCl(pH8.0)	25ml
250mM EDTA	40ml
Glucose	9 g
	1 L autoclave

★Solution Ⅱ

2N NaOH	10ml/100ml
10% SDS	10ml/

★Solution Ⅲ

CH_3COOK	29.4 g
CH_3 COOH	11.5ml/
	100ml autoclave

★TE

1M Tris-HCl(pH8.0)	10ml
250mM EDTA	4ml
	1 L autoclave

★RNase A

RNase	10mg/ml
1M NaOAc	10 μl/
(100℃ 10min.)	

〈噬菌体稀释〉

★SM buffer

1M Tris-HCl(pH7.5)	50ml
NaCl	5.8 g
$MgSO_4$	2 g
2% Gelatin	5ml
	1 L autoclave

★TM buffer

1M Tris-HCl(pH7.5)	50ml/l
1M $MgSO_4$	10ml/

〈DNA电泳〉

★10×TBE buffer

Tris	108 g /L
Boric acid	55 g/
EDTA	7.5 g/

★25×TAE buffer

Tris	121 g/L
CH_3COONa	10.3 g/
EDTA	9.3 g/

★BPB · XC solution

BPB	10 mg /10ml
XC	10 mg /
Sucrose	5 g /
250mM EDTA	0.04ml/

★EtBr solution

EtBr	10mg/ml 暗处存放

★30%丙烯酰胺

Acrylamide	29 g/100ml
BIS	1 g/

PAGE组成表(ml)

凝胶浓度(%)	3.5	5.0	8.0	12.0	20.0
30%	11.6	16.6	26.6	40.0	66.6
10×TBE buffer	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
H_2O	67.7	62.7	52.7	39.3	12.7
10%APS	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
TEMED	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035



Appendix

〈蛋白质电泳〉

★分离胶 buffer

Tris-HCl	181 g/liter(pH8.8)

★浓缩胶 buffer

Tris-HCl	60 g/liter(pH6.8)

★分离胶丙烯酰胺

Acrylamide	300 g/liter
BIS	8 g/

★浓缩胶丙烯酰胺

Acrylamide	100 g/liter
BIS	2.5 g/

★10×running buffer

Tris	30 g/liter
Glycine	144 g/
SDS	10 g/

★4×Sample buffer

1M Tris-HCl(pH6.8)	2.1 ml/10ml
SDS	860 mg/
2-ME	2 ml/
Glycerol	2.8 ml/
BPB	1 mg/

★染色液

CH_3OH	225 ml/500ml
CH_3COOH	45 ml/
CBB	1.25 g/

★脱色液

CH_3OH	50 ml/500ml
CH_3COOH	35 ml/

★固定液

CH_3COOH	35 ml/500ml

浓缩胶组成表(ml)

浓缩胶丙烯酰胺	3.0
浓缩胶buffer	3.0
10%SDS	0.12
1.5%APS	0.3
H_2O	0.57
TEMED	0.012

分离胶组成表(ml)

凝胶浓度(%)	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0
分离胶丙烯酰胺	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0
分离胶buffer	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
10%SDS	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
1.5%APS	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
H_2O	16.2	13.7	11.2	8.7	6.2
TEMED	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015

〈Western 杂交〉

★Blotting buffer

Tris	6.06 g/liter
Glycine	28.8 g/

★Skim milk soln.

Skim milk	50 g/liter PBS(-)
NaN_3	100 mg/

★PBS(-)

NaCl	80 g/liter
KCl	0.2 g/
Na_2HPO_4	1.15 g/
KH_2PO_4	0.2 g/

★PBST

Tween-20	0.5 ml/liter PBS(-)

★TBS

NaCl	8.0 g/liter
KCl	0.2 g/
Tris	3 g/ (pH7.4)

〈Southern 杂交〉

★20×SSC

NaCl	175.3 g/liter
Sodium citrate	88.2 g/ (pH7.0)
	autoclave

★20×SSPE

NaCl	175.3 g /liter
NaH_2PO_4	27.6 g /
EDTA	7.4 g / (pH7.4)
	autoclave

★100×Denhardt'S

Ficoll 400	20 g /liter
Polyvinylpyrrolidone	20 g /
BSA	20 g /

〈Hanahan法转化〉

★DnD

DTT	1.53 g / 10ml
DMSO	9 ml /
1M CH_3COOK(pH7.5)	100 µl /

★TFB

KCl	7.4 g /liter
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	8.9 g /
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.5 g /
Hexamminecobalt chloride	0.8 g /
0.5M K-MES(pH6.3)	20 ml /
	autoclave

〈酵母转化〉

★PEG/LiAc Solution(用时制备)

50% Polyethylene glycol	8 ml/10ml
10×TE buffer (pH7.5)*	1 ml/
1M Lithium acetate (pH7.5)	1 ml/

分别灭菌后加以混合。

※10×TE buffer(pH7.5)

1M Tris-HCl(pH7.5)	10 ml/100ml
250mM EDTA	4 ml/
	autoclave



Appendix

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

TOYOBO 产品常见问题 Q&A

Q1 KOD FX Neo 与 KOD FX 的区别?

A1 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。以基因组 DNA 为模板最大可扩增 40kb 的片段，实现了 30 sec/kb 的高速循环（粗样品推荐 1min/kb）。

Q2 KOD -Plus- Neo 与 KOD -Plus- 的区别?

A2 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。延伸时间缩短到 30 sec/kb。是高保真、高效率、高速的 PCR 酶。

Q3 FSK-101 与 FSQ-101 的区别?

A3 FSK-101 是用于 RT-PCR 的高效率 cDNA 合成试剂盒，适用于长链 cDNA（10kb 以上）的合成。FSQ-101 是用于 RT-qPCR 的高效率 cDNA 合成试剂盒，通过改良，使得带入到 Realtime PCR 反应体系中的逆转录反应液的影响降到最小，即使在 PCR 反应体系中添加了多至 20%体积的逆转录反应液，也能表现出良好的反应曲线，因此，最适合用于表达量较少的 mRNA 的高灵敏度检测。由于精简了试剂盒的构成，可非常简便地进行操作，仅需约 15 分钟的逆转录反应，即可得到充分的 cDNA。

Q4 Blend Taq 与 Blend Taq -Plus- 的区别?

A4 Blend Taq -Plus- 是在「Blend Taq」的酶溶液中预混了抗 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。

Q5 THUNDERBIRD qPCR Mix 与 Realtime PCR Master Mix 的区别?

A5 THUNDERBIRD qPCR Mix 对 Realtime PCR Master Mix 的组分进一步优化，使得反应特异性和 PCR 效率有了提升。THUNDERBIRD Next 系列则在此基础上进一步提高了产品性能以及操作便捷性。

Q6 Ligation high Ver.2 产生冻结或白色沉淀是否影响连接效率?

A6 在 -30℃以下长期保存，或在冷冻柜的冷气出风口处保存时，可能会产生冻结或白色沉淀，但经实验证明，将其融解后使用不影响活性。可用手指捏着离心管使其融解，但注意不要使其升温。

Q7 Ligation high 融解后有白色沉淀，是否影响使用?

A7 作为稳定剂使用的 BSA 可能会形成沉淀，但对反应没有影响，无需将沉淀融解直接使用，不会影响连接效率。

Q8 为什么 FSK-101/FSQ-101 中的 5×RT Buffer 融解后有白色沉淀?

A8 低温长期保存后可能在短时间融解后 buffer 中会有白色沉淀，请务必将其融解后使用，融解后不会对反应有影响。

Q9 QPK/QPX 系列产品中是否添附 ROX？ ROX 的浓度是多少?

A9 Realtime PCR Master Mix 中添附了 1× 浓度的 ROX。THUNDERBIRD Next qPCR Mix 中含有 passive reference dye，可代替 ROX 起到校正作用。

Q10 使用 ReverTra Ace -α- 合成 cDNA 时 RNA 热变性的作用?

A10 热变性可消除 RNA 大多数二级结构，从而使引物可以结合。因此，对于容易形成高级结构的 RNA 可以提高逆转录的效率。



Q11 使用 Target Clone -Plus- 时，为什么纯化后的 PCR 产物在添加 10×A-attachment Mix 之前需要添加 PCR buffer、$MgCl_2$ 和 dNTPs?

A11 由于纯化后 PCR 反应液中的 PCR buffer、$MgCl_2$ 和 dNTP 都被去除了，因此要重新加入 PCR buffer、$MgCl_2$ 和 dNTP，形成 1×PCR 反应体系，以便 3’ 端 dA 的附加。

Q12 使用 ReverTra Ace qPCR RT Kit 制备的 cDNA 做 Realtime PCR，制备的 cDNA 需不需要稀释 10 倍以上使用?

A12 可以不稀释 10 倍以上使用，但将其添加到 RealtimePCR 反应液时请不要超过 20% 的量。因为添加过量会降低 PCR 的反应效率。

Q13 *SuperPrep* II Cell Lysis & RT Kit for qPCR 可以处理的细胞数量范围是多少?

A13 使用 96 孔板时，每个孔可处理的细胞数建议控制在 $1x10^1$~$7x10^4$ 个之间。该上限因细胞种类而异，可在 10^4 数量级范围通过预实验来验证。

Q14 MagExtractor -RNA- 能否用于抽提植物组织 Total RNA?

A14 NPK-201F 能从培养细胞、动物组织、酵母中抽提出 Total RNA，不能用于抽提植物组织 Total RNA。

Q15 使用 KOD FX 时循环条件的设定三步法循环和两步法循环的区别 ?

A15 当引物 Tm 值未满 73°C时 , 请用三步法。使用粗样品时，相比两步法，用三步法能得到更为稳定的结果。

Q16 使用 KOD -Plus- / KOD -Plus- Ver.2 时对引物设计的要求?

A16 引物的 GC 含量不可太高，长度应保持在 22～34mer 的范围之内（Tm 值 >60°C）。
另外，设计引物时要注意不要使其形成分子内二级结构、引物二聚体等情况。对长链目的片段进行扩增时，请使用 Tm 值 65°C以上的引物。

Q17 KOD One 的 PCR 反应条件没有预变性步骤，是否支持热启动?

A17 支持。在以复杂样本为模板扩增时，增加预变性步骤可能提高 PCR 效果。

Q18 QRT-101 可否加入 Mn^{2+} 后长期保存?

A18 不可以，加入 Mn^{2+} 后在 4°C保存三周后经检测会相差 1～2 个 Ct 值。

Q19 是否可以使用 KOD -Plus- 的 10×PCR buffer 代替 SMK-101 中的 iPCR buffer?

A19 可以使用 10×PCR buffer 加 $MgSO_4$ 代替 iPCR buffer, 但突变效率会降低。

Q20 FSQ-201 中的 5×RT Master Mix 与 FSQ-301 中的 5×RT Master Mix II 是否可以混用?

A20 不可以。FSQ-201 中的 5×RT Master Mix 与 FSQ-301 中的 5×RT Master Mix II 组分不同，请勿混用。另外 FSQ-301 中的 5×RT Master Mix II 要同试剂盒中的 4×DN Master Mix 组合使用进行逆转录反应。



TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

「Price List」

第 8 章　目录　8-1

➔ 按 Code No. 的字母顺序排列　8-2

➔ 按品名的字母顺序排列　8-5

INDEX

按 Code No. 的字母顺序排列（数字，A~Z）

Code No.	品名	包装	价格	页码
BTQ-101	Blend Taq（带 dNTPs）	250U × 1 支	¥300	2-29
BTQ-201	Blend Taq -Plus-（带 dNTPs）	250U × 1 支	¥500	2-29
DTM-101	Quick Taq HS DyeMix	1.25ml× 2 支 [100 次份]	¥375	2-31
FSK-101	ReverTra Ace -α-	100 次份 × 1	¥1950	3-12
FSK-201	oligo(dT)$_{20}$	1nmole × 1 支	¥200	3-13
FSK-301	Random Primer(9mer)	2.5nmoles × 1 支	¥200	3-13
FSQ-101	ReverTra Ace qPCR RT Kit	200 次份 × 1	¥1500	3-10
FSQ-201	ReverTra Ace qPCR RT Master Mix	200 次份 × 1	¥2000	3-8
FSQ-301	ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA remover	200 次份 × 1	¥2800	3-8
HMX-301	Handy Pestle	100 支	¥700	5-12
HSTTX-101	Hot Start TTx (DNA) Kit	250 次份 /20μL 反应体系	¥1000	2-35
HSTTX-111	Hot Start TTx (RNA) Kit	250 次份 /20μL 反应体系	¥1200	2-35
KFX-101	KOD FX	200U×1 支	¥1200	2-24
KFX-1B	KOD FX 用 2×PCR Buffer	1.7ml×1 支	¥100	2-39
KFX-201	KOD FX Neo	200U×1 支	¥2400	2-22
KFX-2B	KOD FX Neo 用 2×PCR Buffer	1.7ml×1 支	¥100	2-39
KME-101	KOD -Multi & Epi-	200U×1 支	¥2000	2-26
KMM-101	KOD One PCR Master Mix	1ml×5 支	¥2000	2-14
KMM-101S	KOD One PCR Master Mix	250μl×1 支	¥100	2-14
KMM-201	KOD One PCR Master Mix -Blue-	1ml×5 支	¥2000	2-14
KMM-201S	KOD One PCR Master Mix -Blue-	250μl×1 支	¥100	2-14
KOD-201	KOD -Plus-	200U × 1 支	¥800	2-20
KOD-211	KOD -Plus- Ver.2	200U × 1 支	¥1000	2-20
KOD-2B	KOD -Plus- 用 Buffer	1ml×1 支	¥50	2-39
KOD-2S	KOD -Plus- 用 25mM Mg_2SO_4	1ml×1 支	¥50	2-39
KOD-3B	KOD -Plus- Ver.2 用 Buffer	1ml×1 支	¥100	2-39
KOD-401	KOD -Plus- Neo	200U × 1 支	¥1000	2-18
KOD-4B	KOD -Plus- Neo 用 Buffer	1ml×1 支	¥100	2-39
LDP-101	KOD Dash	250U × 1 支	¥350	2-30
LGK-101	Ligation high	375μl × 2 支	¥550	4-10
LGK-201	Ligation high Ver.2	750μl × 1 支	¥750	4-11
LPK-101	GenNext NGS Library Prep Kit	24 次	¥4100	1-24
LPK-101L	GenNext NGS Library Prep Kit	96 次	¥12600	1-24
LPK-101T	GenNext NGS Library Prep Kit	8 次	¥2100	1-24
MGS-101	Magical Trapper	1 个	¥1000	5-11
NKB-101	Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution	各 250ml×1 瓶	¥700	6-6
NKB-101T	Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution	各 50ml×1 瓶	¥200	6-6
NKB-201	Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1	250ml × 1 瓶	¥380	6-6
NKB-301	Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2	250ml × 1 瓶	¥380	6-6
NKB-401	Can Get Signal Immunostain Enhancer Solution Start Set	各 5ml×1 瓶	¥400	6-8
NKB-501	Can Get Signal Immunostain Enhancer Solution A	20ml × 1 瓶	¥1000	6-8
NKB-601	Can Get Signal Immunostain Enhancer Solution B	20ml × 1 瓶	¥1000	6-8
NLQ-101	GenNext NGS Library Quantification Kit	20 μl 反应体系 ×500 次	¥5450	1-22
NLQ-101S	GenNext NGS Library Quantification Kit	20 μl 反应体系 ×50 次	¥1100	1-22

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

按 Code No. 的字母顺序排列（数字，A~Z）

Code No.	品名	包装	价格	页码
NPK-101	MagExtractor -Genome-	100 次份	¥1200	5-4
NPK-201F	MagExtractor -RNA-	100 次份	¥2600	5-6
NPK-301	MagExtractor -Plasmid-	500 次份	¥2200	5-9
NPK-401F	MagExtractor -Viral RNA-	100 次份	¥1600	5-8
NPK-501	MagExtractor -Plant Genome-	100 次份	¥1600	5-5
NPK-601	MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	200 次份	¥1200	5-10
NSR-101	NSR Primer Set for human	96 次份	¥3000	1-26
NSR-102	NSR Primer Set for mouse	96 次份	¥3000	1-26
NTP-101	dNTPs (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	100mM, 各 0.5ml	¥1200	2-39
NTP-201	dNTPs Mixture	各 2umoles/1.0ml × 1 支	¥65	2-39
NTP-301	dNTPs Mixture	各 2umoles/0.2ml × 1 支	¥200	2-39
NTP-501	dNTPs Mixture (dATP,dCTP,dGTP,dUTP)	1ml (2mM)	¥200	2-39
PCR-311F	RT-PCR Quick Master Mix	50 次份	¥1800	2-36
QKD-201	KOD SYBR® qPCR Mix	1.67ml× 3 支	¥2450	1-13
QKD-201T	KOD SYBR® qPCR Mix	1ml× 1 支	¥500	1-13
QPK-101	Realtime PCR Master Mix	1ml× 5 支	¥1500	1-21
QPK-201	SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	1ml× 5 支	¥1500	1-21
QPK-212	SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-	1ml× 5 支	¥1600	1-21
QPS-101	THUNDERBIRD Probe qPCR Mix	1.67ml× 3 支	¥1500	1-19
QPS-201	THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix	1.67ml× 3 支	¥1500	1-19
QPX-101	THUNDERBIRD Next Probe qPCR Mix	1.67ml× 3 支	¥1500	1-17
QPX-101T	THUNDERBIRD Next Probe qPCR Mix	1ml× 1 支	¥325	1-17
QPX-201	THUNDERBIRD Next SYBR® qPCR Mix	1.67ml× 3 支	¥1500	1-17
QPX-201T	THUNDERBIRD Next SYBR® qPCR Mix	1ml× 1 支	¥325	1-17
QRT-101	RNA-direct Realtime PCR Master Mix	0.5ml× 5 支	¥2000	1-12
QRT-201	RNA-direct SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	0.5ml× 5 支	¥2000	1-12
QRZ-101	THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR Kit	100 次份	¥2400	1-8
QRZ-101S	THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR Kit	20 次份	¥500	1-8
RMD-101	GenNext RamDA-seq Single Cell Kit	96 次份	¥53000	1-26
RMD-101T	GenNext RamDA-seq Single Cell Kit	24 次份	¥15000	1-26
RMD-201	RT-RamDA cDNA Synthesis Kit	96 次份	¥26500	1-26
RMD-201T	RT-RamDA cDNA Synthesis Kit	24 次份	¥7500	1-26
RMD-301	RamDA Cell Lysis Kit	1152 次份	¥2000	1-26
ROX-101	50×ROX reference dye	5ml	¥900	1-19
SCQ-401	SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR	40 µl 反应体系 ×100 次	¥4800	3-5
SCQ-401S	SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR	40 µl 反应体系 ×20 次	¥1000	3-5
SCQ-501	SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR	40 µl 反应体系 ×100 次	¥2400	3-5
SIN-201	RNase Inhibitor(Recombinant type)	2500U × 1 支	¥300	3-16
SMK-101	KOD -Plus- Mutagenesis Kit	20 次份	¥1800	4-8
TAK-101	TArget Clone	10 次份 × 1 支	¥300	4-6
TAK-201	TArget Clone -Plus-	10 次份 × 1 支	¥380	4-6
TAP-201	rTaq DNA Polymerase(Mg^{2+} 另外添付 , 带 dNTP)	250U × 1 支	¥150	2-33
TAP-211	rTaq DNA Polymerase(Mg^{2+} 含于溶液 , 带 dNTP)	250U × 1 支	¥150	2-33
TCP-101	anti-Taq high	100ul × 1 支	¥500	2-37

按 Code No. 的字母顺序排列（数字，A~Z）

Code No.	品名	包装	价格	页码
TRL-201	Thermo T7 RNA Polymerase <<TT7>>	7500U × 1 支	¥500	4-15
TRT-101	ReverTra Ace	10000U × 1 支	¥800	3-14
TSK-101	ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit	60 次份 ×1	¥1300	4-13
TTH-301	rTth DNA Polymerase	250U × 1 支	¥350	2-34
UNG-101	Uracil-DNA Glycosylase(UNG), heat-labile	200U	¥1000	2-38
UTP-101	dUTP(100mM)	500ul	¥1000	2-39

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

按品名的字母顺序排列（数字，A~Z）

品名	Code No.	包装	价格	页码
50×ROX reference dye	ROX-101	5ml	¥900	1-19
anti-Taq high	TCP-101	100ul × 1 支	¥500	2-37
Blend Taq -Plus-（带 dNTPs）	BTQ-201	250U × 1 支	¥500	2-29
Blend Taq（带 dNTPs）	BTQ-101	250U × 1 支	¥300	2-29
Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution	NKB-101	各 250ml×1 瓶	¥700	6-6
Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution	NKB-101T	各 50ml×1 瓶	¥200	6-6
Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1	NKB-201	250ml × 1 瓶	¥380	6-6
Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2	NKB-301	250ml × 1 瓶	¥380	6-6
Can Get Signal Immunostain Enhancer Solution A	NKB-501	20ml × 1 瓶	¥1000	6-8
Can Get Signal Immunostain Enhancer Solution B	NKB-601	20ml × 1 瓶	¥1000	6-8
Can Get Signal Immunostain Enhancer Solution Start Set	NKB-401	各 5ml×1 瓶	¥400	6-8
dNTPs (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	NTP-101	100mM, 各 0.5ml	¥1200	2-39
dNTPs Mixture	NTP-201	各 2umoles/1.0ml × 1 支	¥65	2-39
dNTPs Mixture	NTP-301	各 2umoles/0.2ml × 1 支	¥200	2-39
dNTPs Mixture（dATP,dCTP,dGTP,dUTP）	NTP-501	1ml (2mM)	¥200	2-39
dUTP (100mM)	UTP-101	500ul	¥1000	2-39
GenNext NGS Library Prep Kit	LPK-101T	8 次	¥2100	1-24
GenNext NGS Library Prep Kit	LPK-101	24 次	¥4100	1-24
GenNext NGS Library Prep Kit	LPK-101L	96 次	¥12600	1-24
GenNext NGS Library Quantification Kit	NLQ-101S	20 µl 反应体系 ×50 次	¥1100	1-22
GenNext NGS Library Quantification Kit	NLQ-101	20 µl 反应体系 ×500 次	¥5450	1-22
GenNext RamDA-seq Single Cell Kit	RMD-101T	24 次份	¥15000	1-26
GenNext RamDA-seq Single Cell Kit	RMD-101	96 次份	¥53000	1-26
Handy Pestle	HMX-301	100 支	¥700	5-12
Hot Start TTx (DNA) Kit	HSTTX-101	250 次份 /20µL 反应体系	¥1000	2-35
Hot Start TTx (RNA) Kit	HSTTX-111	250 次份 /20µL 反应体系	¥1200	2-35
KOD Dash	LDP-101	250U × 1 支	¥350	2-30
KOD FX	KFX-101	200U×1 支	¥1200	2-24
KOD FX Neo	KFX-201	200U×1 支	¥2400	2-22
KOD FX Neo 用 2×PCR Buffer	KFX-2B	1.7ml×1 支	¥100	2-39
KOD FX 用 2×PCR Buffer	KFX-1B	1.7ml×1 支	¥100	2-39
KOD -Multi & Epi-	KME-101	200U×1 支	¥2000	2-26
KOD One PCR Master Mix	KMM-101S	250µl×1 支	¥100	2-14
KOD One PCR Master Mix	KMM-101	1ml×5 支	¥2000	2-14
KOD One PCR Master Mix -Blue-	KMM-201S	250µl×1 支	¥100	2-14
KOD One PCR Master Mix -Blue-	KMM-201	1ml×5 支	¥2000	2-14
KOD -Plus-	KOD-201	200U × 1 支	¥800	2-20
KOD -Plus- Neo	KOD-401	200U × 1 支	¥1000	2-18
KOD -Plus- Neo 用 Buffer	KOD-4B	1ml×1 支	¥100	2-39
KOD -Plus- Ver.2	KOD-211	200U × 1 支	¥1000	2-20
KOD SYBR® qPCR Mix	QKD-201T	1ml× 1 支	¥500	1-13
KOD SYBR® qPCR Mix	QKD-201	1.67ml× 3 支	¥2450	1-13
KOD -Plus- Mutagenesis Kit	SMK-101	20 次份	¥1800	4-8
KOD -Plus- Ver.2 用 Buffer	KOD-3B	1ml×1 支	¥100	2-39

按品名的字母顺序排列（数字，A~Z）

品名	Code No.	包装	价格	页码
KOD -Plus- 用 25mM Mg_2SO_4	KOD-2S	1ml×1 支	¥50	2-39
KOD -Plus- 用 Buffer	KOD-2B	1ml×1 支	¥50	2-39
Ligation high	LGK-101	375µl × 2 支	¥550	4-10
Ligation high Ver.2	LGK-201	750µl × 1 支	¥750	4-11
MagExtractor -Genome-	NPK-101	100 次份	¥1200	5-4
MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	NPK-601	200 次份	¥1200	5-10
MagExtractor -Plant Genome-	NPK-501	100 次份	¥1600	5-5
MagExtractor -Plasmid-	NPK-301	500 次份	¥2200	5-9
MagExtractor -RNA-	NPK-201F	100 次份	¥2600	5-6
MagExtractor -Viral RNA-	NPK-401F	100 次份	¥1600	5-8
Magical Trapper	MGS-101	1 个	¥1000	5-11
NSR Primer Set for human	NSR-101	96 次份	¥3000	1-26
NSR Primer Set for mouse	NSR-102	96 次份	¥3000	1-26
oligo$(dT)_{20}$	FSK-201	1nmole × 1 支	¥200	3-13
Quick Taq HS DyeMix	DTM-101	1.25ml× 2 支 [100 次份]	¥375	2-31
RamDA Cell Lysis Kit	RMD-301	1152 次份	¥2000	1-26
Random Primer(9mer)	FSK-301	2.5nmoles × 1 支	¥200	3-13
Realtime PCR Master Mix	QPK-101	1ml× 5 支	¥1500	1-21
ReverTra Ace	TRT-101	10000U × 1 支	¥800	3-14
ReverTra Ace qPCR RT Kit	FSQ-101	200 次份 × 1	¥1500	3-10
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix	FSQ-201	200 次份 × 1	¥2000	3-8
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA remover	FSQ-301	200 次份 × 1	¥2800	3-8
ReverTra Ace -α-	FSK-101	100 次份 × 1	¥1950	3-12
RNA-direct Realtime PCR Master Mix	QRT-101	0.5ml× 5 支	¥2000	1-12
RNA-direct SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	QRT-201	0.5ml× 5 支	¥2000	1-12
RNase Inhibitor(Recombinant type)	SIN-201	2500U × 1 支	¥300	3-16
rTaq DNA Polymerase(Mg^{2+} 含于溶液 , 带 dNTP)	TAP-211	250U × 1 支	¥150	2-33
rTaq DNA Polymerase(Mg^{2+} 另外添付 , 带 dNTP)	TAP-201	250U × 1 支	¥150	2-33
RT-PCR Quick Master Mix	PCR-311F	50 次份	¥1800	2-36
RT-RamDA cDNA Synthesis Kit	RMD-201T	24 次份	¥26500	1-26
RT-RamDA cDNA Synthesis Kit	RMD-201	96 次份	¥7500	1-26
rTth DNA Polymerase	TTH-301	250U × 1 支	¥350	2-34
ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit	TSK-101	60 次份 ×1	¥1300	4-13
SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR	SCQ-401S	40 µl 反应体系 ×20 次	¥1000	3-5
SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR	SCQ-401	40 µl 反应体系 ×100 次	¥4800	3-5
SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR	SCQ-501	40 µl 反应体系 ×100 次	¥2400	3-5
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	QPK-201	1ml× 5 支	¥1500	1-21
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-	QPK-212	1ml× 5 支	¥1600	1-21
TArget Clone	TAK-101	10 次份 × 1 支	¥300	4-6
TArget Clone -Plus-	TAK-201	10 次份 × 1 支	¥380	4-6
Thermo T7 RNA Polymerase <<TT7>>	TRL-201	7500U × 1 支	¥500	4-15
THUNDERBIRD Next Probe qPCR Mix	QPX-101T	1ml× 1 支	¥325	1-17
THUNDERBIRD Next Probe qPCR Mix	QPX-101	1.67ml× 3 支	¥1500	1-17
THUNDERBIRD Next SYBR® qPCR Mix	QPX-201T	1ml× 1 支	¥325	1-17

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

按品名的字母顺序排列（数字，A~Z）

品名	Code No.	包装	价格	页码
THUNDERBIRD Next SYBR® qPCR Mix	QPX-201	1.67ml× 3 支	¥1500	1-17
THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR Kit	QRZ-101S	20 次份	¥500	1-8
THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR Kit	QRZ-101	100 次份	¥2400	1-8
THUNDERBIRD Probe qPCR Mix	QPS-101	1.67ml× 3 支	¥1500	1-19
THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix	QPS-201	1.67ml× 3 支	¥1500	1-19
Uracil-DNA Glycosylase(UNG), heat-labile	UNG-101	200U	¥1000	2-38

Note

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

「Index」

第 9 章　目录 9-1

➔ 数字 9-2

➔ 英文字母 9-2

➔ 中文 9-6

INDEX

INDEX

数字

10mM dNTPs Mixture 2-39
100mM dNTPs （dATP,dCTP,dGTP,dTTP) 2-39
2mM dNTPs Mixture 2-39
2mM dNTPs Mixture（dATP,dCTP,dGTP,dUTP) 2-39

50×ROX reference dye 1-19

A

anti-Taq high 2-37

B

Blend Taq -Plus-（带 dNTPs） 2-29
Blend Taq（带 dNTPs） 2-29

Buffer
KOD FX 用 2×PCR Buffer 2-39
KOD FX Neo 用 2×PCR Buffer 2-39
KOD -Plus- 用 buffer 2-39
KOD -Plus- 用 25mM Mg_2SO_4 2-39
KOD -Plus- Neo 用 buffer 2-39
KOD -Plus- Ver.2 用 buffer 2-39

C

Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 6-6
Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 6-6
Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2 6-6
Can Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution A 6-8
Can Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution B 6-8
Can Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution Start Set 6-8

cDNA 合成
ReverTra Ace 3-14
ReverTra Ace qPCR RT Kit 3-10
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix 3-8
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA remover 3-8
ReverTra Ace -α- 3-12
SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR 3-5
SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR 3-5

D

Deoxyribonucleotides
10mM dNTPs Mixture 2-39
100mM dNTPs （dATP,dCTP,dGTP,dTTP) 2-39
100mM dUTP 2-39
2mM dNTPs Mixture 2-39
2mM dNTPs Mixture（dATP,dCTP,dGTP,dUTP) 2-39

DNA Polymerase
Blend Taq 2-29
Blend Taq -Plus- 2-29
KOD Dash 2-30
KOD FX 2-24
KOD FX Neo 2-22
KOD One PCR Master Mix 2-14
KOD One PCR Master Mix -Blue- 2-14
KOD -Multi & Epi- 2-26
KOD -Plus- 2-20
KOD -Plus- Neo 2-18
KOD -Plus-Ver.2 2-20
Quick Taq HS DyeMix 2-31
rTaq DNA Polymerase 2-33
rTth DNA Polymerase 2-34

DNA 纯化试剂盒
MagExtractor -Genome- 5-4
MagExtractor -PCR & Gel Clean up- 5-10
MagExtractor -Plant Genome- 5-5
MagExtractor -Plasmid- 5-9

DNA 聚合酶
Blend Taq 2-29
Blend Taq -Plus- 2-29
KOD Dash 2-30
KOD FX 2-24
KOD FX Neo 2-22
KOD One PCR Master Mix 2-14
KOD One PCR Master Mix -Blue- 2-14
KOD -Multi & Epi- 2-26
KOD -Plus- 2-20
KOD -Plus- Neo 2-18

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

KOD -Plus- Ver.2 2-20
Quick Taq HS DyeMix 2-31
rTaq DNA Polymerase 2-33
rTth DNA Polymerase 2-34

dNTPs
10mM dNTPs Mixture 2-39
100mM dNTPs （dATP,dCTP,dGTP,dTTP) 2-39
100mM dUTP 2-39
2mM dNTPs Mixture 2-39
2mM dNTPs Mixture（dATP,dCTP,dGTP,dUTP) 2-39

G

Gene Sequencing
GenNext NGS Library Prep Kit 1-24
GenNext NGS Library Quantification Kit 1-22
GenNext RamDA-seq Single Cell Kit 1-26
KOD -Multi & Epi- 2-26
KOD SYBR® qPCR Mix 1-13
NSR Primer Set for human 1-26
NSR Primer Set for mouse 1-26
RamDA Cell Lysis Kit 1-26

Genome 纯化系列
MagExtractor -Genome- 5-4
MagExtractor -Plant Genome- 5-5

H

Handy Pestle 5-11

Hot Start TTx (DNA) Kit 2-35
Hot Start TTx (RNA) Kit 2-35

K

KOD Dash 2-30
KOD FX 2-24
KOD FX Neo 2-22
KOD FX Neo 用 2×PCR Buffer 2-39
KOD FX 用 2×PCR Buffer 2-39
KOD One PCR Master Mix 2-14
KOD One PCR Master Mix -Blue- 2-14
KOD -Multi & Epi- 2-26
KOD -Plus- 2-20
KOD -Plus- Mutagenesis Kit 4-8
KOD -Plus- Neo 2-18
KOD -Plus- Neo 用 Buffer 2-39
KOD -Plus- Ver.2 2-20
KOD -Plus- Ver.2 用 Buffer 2-39
KOD -Plus- 用 25mM Mg_2SO_4 2-39
KOD -Plus- 用 Buffer 2-39
KOD SYBR® qPCR Mix 1-13

L

Labeling Kit
ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit 4-13

Ligation Kit
Ligation high 4-10
Ligation high Ver.2 4-11

M

MagExtractor -Genome- 5-4
MagExtractor -PCR & Gel Clean up- 5-10
MagExtractor -Plant Genome- 5-5
MagExtractor -Plasmid- 5-9
MagExtractor -RNA- 5-6
MagExtractor -Viral RNA- 5-8
Magical Trapper 5-11

Magnetic Beeds Kit
MagExtractor -Genome- 5-4
MagExtractor -PCR & Gel Clean up- 5-10
MagExtractor -Plant Genome- 5-5
MagExtractor -Plasmid- 5-9
MagExtractor -RNA- 5-6
MagExtractor -Viral RNA- 5-8
Magical Trapper 5-10

Master Mix
KOD One PCR Master Mix 2-14
KOD One PCR Master Mix -Blue- 2-14
KOD SYBR® qPCR Mix 1-13

Realtime PCR Master Mix	1-21
RNA-direct Realtime PCR Master Mix	1-12
RT-PCR Quick Master Mix	2-36
THUNDERBIRD qPCR Mix	1-19
THUNDERBIRD Next qPCR Mix	1-17
THUNDERBIRD Probe One -step qRT-PCR Kit	1-8
Quick Taq HS DyeMix	2-31

mRNA 表达分析

Hot Start TTx (DNA) Kit	2-35
Hot Start TTx (RNA) Kit	2-35
KOD SYBR® qPCR Mix	1-13
ReverTra Ace qPCR RT Kit	3-10
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix	3-8
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA remover	3-8
Realtime PCR Master Mix	1-21
RNA-direct Realtime PCR Master Mix	1-12
RT-RamDA cDNA Synthesis Kit	1-26
SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR	3-5
SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR	3-5
THUNDERBIRD qPCR Mix	1-19
THUNDERBIRD Next qPCR Mix	1-17
THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR Kit	1-8
KOD -Plus- Mutagenesis Kit	4-8
ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit	4-13

Mg^{2+}

KOD -Plus- 用 25mM Mg_2SO_4	2-39

N

NGS

GenNext NGS Library Prep Kit	1-24
GenNext NGS Library Quantification Kit	1-22
GenNext RamDA-seq Single Cell Kit	1-26
KOD -Multi & Epi-	2-26
KOD SYBR® qPCR Mix	1-13
NSR Primer Set for human	1-26
NSR Primer Set for mouse	1-26
RamDA Cell Lysis Kit	1-26

NTP

10mM dNTPs Mixture	2-39
100mM dNTPs (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	2-39
100mM dUTP	2-39
2mM dNTPs Mixture	2-39
2mM dNTPs Mixture (dATP,dCTP,dGTP,dUTP)	2-39

Nucleotides

10mM dNTPs Mixture	2-39
100mM dNTPs (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	2-39
100mM dUTP	2-39
2mM dNTPs Mixture	2-39
2mM dNTPs Mixture (dATP,dCTP,dGTP,dUTP)	2-39

O

$oligo(dT)_{20}$	3-12

P

PCR 定量

Hot Start TTx (DNA) Kit	2-35
Hot Start TTx (RNA) Kit	2-35
KOD SYBR® qPCR Mix	1-13
ReverTra Ace qPCR RT Kit	3-10
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix	3-8
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA remover	3-8
Realtime PCR Master Mix	1-21
RNA-direct Realtime PCR Master Mix	1-12
RT-RamDA cDNA Synthesis Kit	1-26
SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR	3-5
SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR	3-5
THUNDERBIRD qPCR Mix	1-19
THUNDERBIRD Next qPCR Mix	1-17
THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR Kit	1-8

PCR 酶

Blend Taq	2-29
Blend Taq -Plus-	2-29
KOD Dash	2-30
KOD FX	2-24
KOD FX Neo	2-22
KOD One PCR Master Mix	2-14

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

KOD One PCR Master Mix -Blue-	2-14
KOD -Multi & Epi-	2-26
KOD -Plus-	2-20
KOD -Plus- Neo	2-18
KOD -Plus-Ver.2	2-20
Quick Taq HS DyeMix	2-31
rTaq DNA Polymerase	2-33
rTth DNA Polymerase	2-34

PCR 相关试剂

anti-Taq high	2-37
Deoxyribonucleotides	2-39
PCR 用缓冲液	2-39
RNase Inhibitor	3-16

PCR 试剂盒

RT-PCR Quick Master Mix	2-36

PCR 用缓冲液

KOD FX 用 2×PCR Buffer	2-39
KOD FX Neo 用 2×PCR Buffer	2-39
KOD -Plus- 用 buffer	2-39
KOD -Plus- 用 25mM Mg_2SO_4	2-39
KOD -Plus- Neo 用 buffer	2-39
KOD -Plus- Ver.2 用 buffer	2-39

Polymerase

Blend Taq	2-29
Blend Taq -Plus-	2-29
KOD Dash	2-30
KOD FX	2-24
KOD FX Neo	2-22
KOD One PCR Master Mix	2-14
KOD One PCR Master Mix -Blue-	2-14
KOD -Multi & Epi-	2-26
KOD -Plus-	2-20
KOD -Plus- Neo	2-18
KOD -Plus- Ver.2	2-20
Quick Taq HS DyeMix	2-31
rTaq DNA Polymerase	2-33
rTth DNA Polymerase	2-34

Primer

$oligo(dT)_{20}$	3-12
Random Primer(9mer)	3-12

Protein kit

ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit	4-13

Q

Quick Taq HS DyeMix	2-31

qPCR

Hot Start TTx (DNA) Kit	2-35
Hot Start TTx (RNA) Kit	2-35
KOD SYBR® qPCR Mix	1-13
ReverTra Ace qPCR RT Kit	3-10
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix	3-8
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA remover	3-8
Realtime PCR Master Mix	1-21
RNA-direct Realtime PCR Master Mix	1-12
RT-RamDA cDNA Synthesis Kit	1-26
SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR	3-5
SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR	3-5
THUNDERBIRD qPCR Mix	1-19
THUNDERBIRD Next qPCR Mix	1-17
THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR Kit	1-8

R

RamDA Cell Lysis Kit	1-26
Random Primer(9mer)	3-12

Realtime PCR

Hot Start TTx (DNA) Kit	2-35
Hot Start TTx (RNA) Kit	2-35
KOD SYBR® qPCR Mix	1-13
ReverTra Ace qPCR RT Kit	3-10
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix	3-8
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA remover	3-8
Realtime PCR Master Mix	1-21
RNA-direct Realtime PCR Master Mix	1-12
RT-RamDA cDNA Synthesis Kit	1-26
SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR	3-5
SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR	3-5

THUNDERBIRD qPCR Mix	1-19
THUNDERBIRD Next qPCR Mix	1-17
THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR Kit	1-8
Realtime PCR Master Mix	1-21
ReverTra Ace	3-14
ReverTra Ace qPCR RT Kit	3-10
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix	3-8
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA remover	3-8
ReverTra Ace -α-	3-12
RNA-direct Realtime PCR Master Mix	1-12
RNA-direct SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	1-12
RNase Inhibitor(Recombinant type)	3-16
rTaq DNA Polymerase(Mg^{2+} 含于溶液 , 带 dNTP)	2-33
rTaq DNA Polymerase(Mg^{2+} 另外添付 , 带 dNTP)	2-33
RT-PCR Quick Master Mix	2-36
RT-RamDA cDNA Synthesis Kit	1-26
rTth DNA Polymerase	2-34
RNA 纯化试剂盒	
MagExtractor -RNA-	5-6
MagExtractor -Viral RNA-	5-8

S

ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit	4-13
SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR	3-5
SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR	3-5
SYBR®Green Realtime PCR Master Mix	1-21
SYBR®Green Realtime PCR Master Mix -Plus-	1-21

T

T 载体	
TArget Clone	4-6
TArget Clone -Plus-	4-6
Thermo T7 RNA Polymerase <<TT7>>	4-15
THUNDERBIRD 系列	
THUNDERBIRD Next Probe qPCR Mix	1-17
THUNDERBIRD Next SYBR® qPCR Mix	1-17
THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR Kit	1-8
THUNDERBIRD Probe qPCR Mix	1-19
THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix	1-19
Total RNA 纯化试剂盒	5-6

U

Uracil-DNA Glycosylase(UNG), heat-labile	2-38
UTP	
100mM dUTP	2-39

中文

表达分析	
Hot Start TTx (DNA) Kit	2-35
Hot Start TTx (RNA) Kit	2-35
KOD SYBR® qPCR Mix	1-13
ReverTra Ace qPCR RT Kit	3-10
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix	3-8
ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA remover	3-8
Realtime PCR Master Mix	1-21
RNA-direct Realtime PCR Master Mix	1-12
RT-RamDA cDNA Synthesis Kit	1-26
SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR	3-5
SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR	3-5
THUNDERBIRD qPCR Mix	1-19
THUNDERBIRD Next qPCR Mix	1-17
THUNDERBIRD Probe One -step qRT-PCR Kit	1-8
KOD -Plus- Mutagenesis Kit	4-8
ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit	4-13
长片段 PCR 酶	
Blend Taq	2-29
Blend Taq -Plus-	2-29
KOD Dash	2-30
KOD FX	2-24
KOD FX Neo	2-22
KOD One PCR Master Mix	2-14
KOD One PCR Master Mix -Blue-	2-14
KOD -Multi & Epi-	2-26
KOD -Plus- Neo	2-18

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

抽提器械

Magical Trapper 5-11

Handy Pestle 5-12

抽提试剂盒

MagExtractor -Genome- 5-4

MagExtractor -PCR & Gel Clean up- 5-10

MagExtractor -Plant Genome- 5-5

MagExtractor -Plasmid- 5-9

MagExtractor -RNA- 5-6

MagExtractor -Viral RNA- 5-8

蛋白质合成

ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit 4-13

定量 PCR

Hot Start TTx (DNA) Kit 2-35

Hot Start TTx (RNA) Kit 2-35

KOD SYBR® qPCR Mix 1-13

ReverTra Ace qPCR RT Kit 3-10

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix 3-8

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA remover 3-8

Realtime PCR Master Mix 1-21

RNA-direct Realtime PCR Master Mix 1-12

RT-RamDA cDNA Synthesis Kit 1-26

SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR 3-5

SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR 3-5

THUNDERBIRD qPCR Mix 1-19

THUNDERBIRD Next qPCR Mix 1-17

THUNDERBIRD Probe One-step qRT-PCR Kit 1-8

高保真性 PCR 酶

KOD FX 2-24

KOD FX Neo 2-22

KOD One PCR Master Mix 2-14

KOD One PCR Master Mix -Blue- 2-14

KOD -Multi & Epi- 2-26

KOD -Plus- 2-20

KOD -Plus- Neo 2-18

KOD -Plus- Ver.2 2-20

高效率 PCR 酶

KOD FX 2-24

KOD FX Neo 2-22

KOD One PCR Master Mix 2-14

KOD One PCR Master Mix -Blue- 2-14

KOD -Multi & Epi- 2-26

核糖核酸多聚酶

Thermo T7 RNA Polymerase <<TT7>> 4-15

核糖核酸酶抑制剂

RNase Inhibitor 3-16

缓冲液

KOD FX 用 2×PCR Buffer 2-39

KOD FX Neo 用 2×PCR Buffer 2-39

KOD -Plus- 用 buffer 2-39

KOD -Plus- 用 25mM Mg_2SO_4 2-39

KOD -Plus- Neo 用 buffer 2-39

KOD -Plus- Ver.2 用 buffer 2-39

聚合酶

Blend Taq 2-29

Blend Taq -Plus- 2-29

KOD Dash 2-30

KOD FX 2-24

KOD FX Neo 2-22

KOD One PCR Master Mix 2-14

KOD One PCR Master Mix -Blue- 2-14

KOD -Multi & Epi- 2-26

KOD -Plus- 2-20

KOD -Plus- Neo 2-18

KOD -Plus- Ver.2 2-20

Quick Taq HS DyeMix 2-31

rTaq DNA Polymerase 2-33

rTth DNA Polymerase 2-34

克隆

TArget Clone 4-6

TArget Clone -Plus- 4-6

KOD -Plus- Mutagenesis Kit 4-8

Index

Ligation high 4-10
Ligation high Ver.2 4-11

连接酶试剂盒
Ligation high 4-10
Ligation high Ver.2 4-11

免疫反应增强
Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 6-6
Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 6-6
Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2 6-6
Can Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution A 6-8
Can Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution B 6-8
Can Get Signal Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution Start Set 6-8

逆转录酶
ReverTra Ace 3-14

突变导入
KOD -Plus- Mutagenesis Kit 4-8

脱氧核糖核苷酸
dNTPs Mixture 2-39

转录试剂盒
ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit 4-13

TEL: 021-5879-4900 FAX: 021-5879-4901 E-mail: tech@bio-toyobo.cn URL: http://www.bio-toyobo.cn 营业时间：9:00~17:30（国定节假日除外）

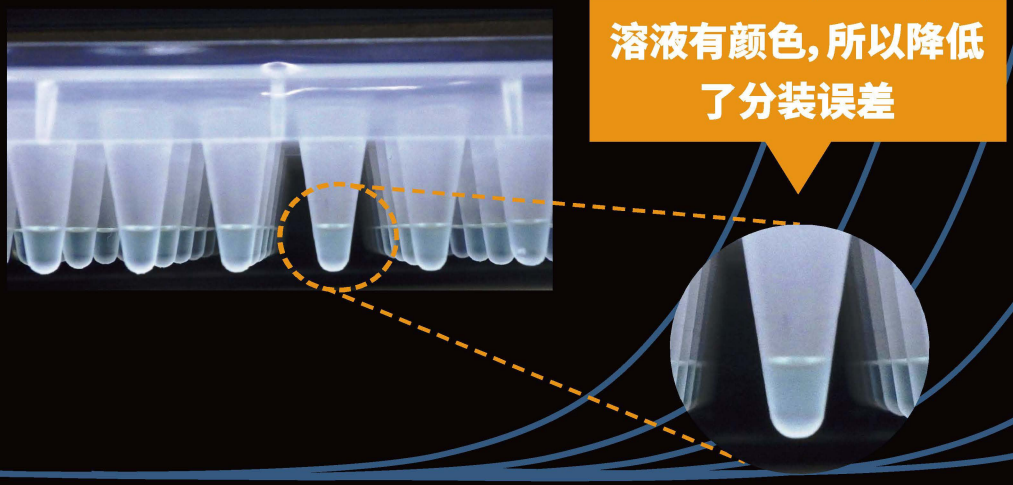
大幅度提高了THUNDERBIRD®性能

高效率Realtime PCR Master Mix

THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix

同等价格可得到效率更高的Realtime PCR!

- 扩增效率提高
- 低拷贝区的检测灵敏度提高
- 特异性进一步增强
- 可对应延伸时间为10秒的高速循环
- 制备的反应液的稳定性提高
- 防止Carryover污染引起的假阳性
  (与另外销售的UNG组合使用时)
- 含有校正染料,无需添加ROX



使用『RamDA-seq™方法』从单细胞或微量RNA开始的cDNA制备试剂盒

NGS分析用的cDNA制备试剂盒

GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit

Realtime PCR分析用cDNA制备试剂盒

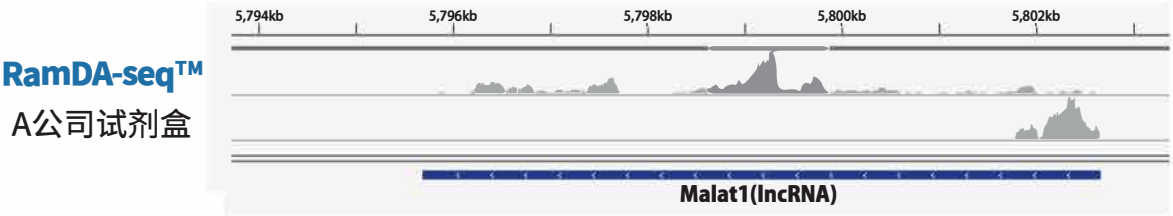
RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit

单细胞及微量RNA为模板

可使用1～100个细胞或 10pg~1ng total RNA 作为input

可制备覆盖全长RNA的cDNA

现有的只使用Oligo-dT引物的方法难以分析10kb以上的RNA，使用本产品可以制备出测序reads覆盖全长RNA的cDNA



除了可检测poly(A) RNA外，还可检测non-poly(A) RNA

除了Oligo-dT primer外，还使用了NSR（Not so random primer），可检测到用现有方法无法检测的non-poly(A) RNA

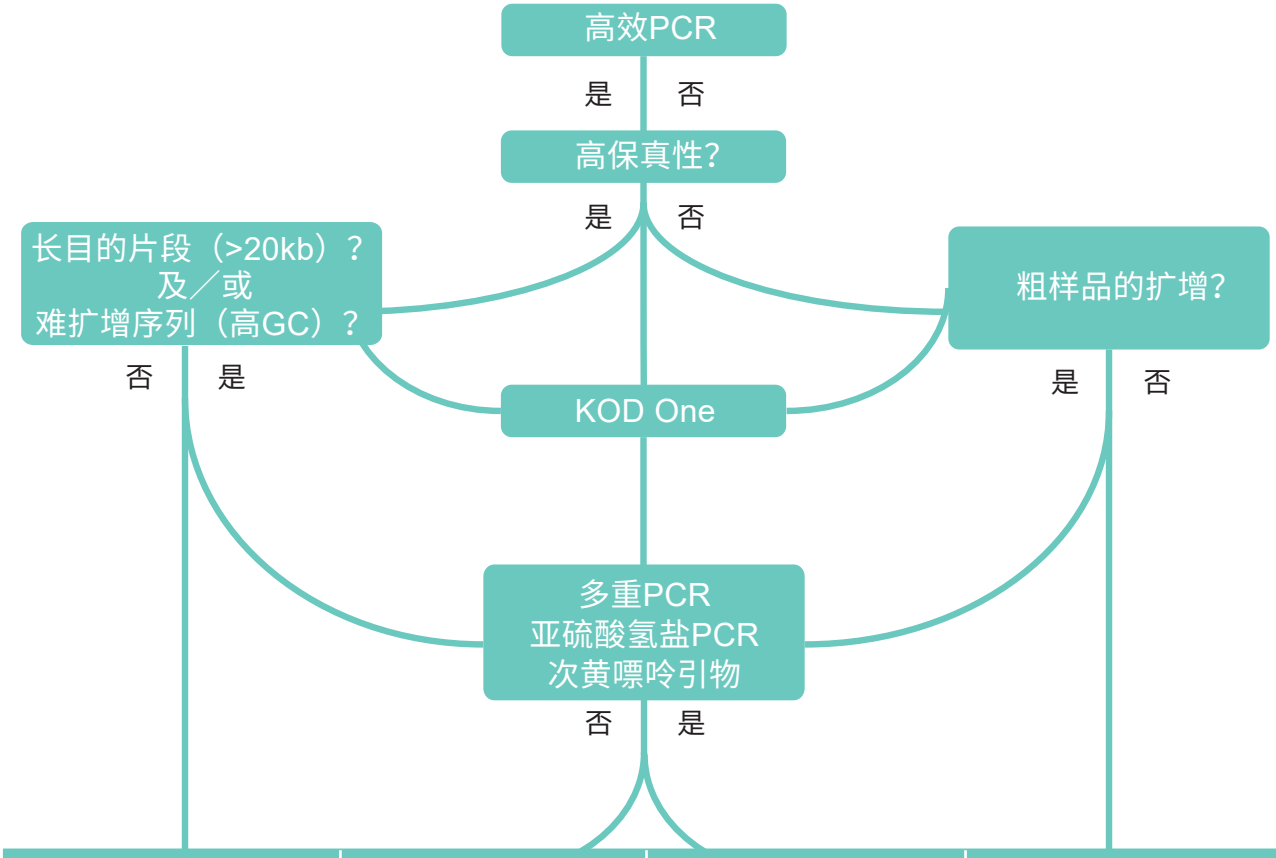
相比原来技术，检测到的基因数大大提高了

可检测组蛋白RNA、lncRNA、pre-mRNA、circRNA等各种类型的RNA

使用从Mouse ES细胞提取的 RNA 10pg，分别用两种试剂盒（N=2）制备cDNA后，进行NGS分析

cDNA Synthesis Method	RamDA-seq™		A公司试剂盒	
Number of transcripts TPM>0.1	18,984	18,465	13,500	13,721

高效PCR快速选择指南



KOD -Plus- 系列	KOD FX 系列	KOD -Multi & Epi-	Blend Taq 系列
与Taq DNA聚合酶保真性的比较（增加倍数）			
80倍	11倍		3倍
-克隆用高保真性PCR -高速PCR（30秒/kb）	-粗样品 （血液、鼠尾、植物等） -含细胞壁的微生物 （酵母、真菌等） -难扩增的目的片段 （长度>20kb, 高GC含量）	-多重PCR（~10kb） -亚硫酸氢盐PCR （~1.5kb） -可使用含I或U的引物	-普通PCR -长PCR（>5kb） -克隆PCR
			Quick Taq HS DyeMix
			1倍
			-普通PCR -克隆PCR -预混型 
P 2-18	P 2-22	P 2-26	P 2-31
推荐TA克隆试剂盒：Target Clone系列 (P 3-6)			
TArget Clone -Plus-	TArget Clone -Plus-	TArget Clone -Plus-	TArget Clone

TOYOBO
Beyond Horizons

TOYOBO LIFE SCIENCE

2021/2022

东洋纺（上海）生物科技有限公司

上海市浦东新区张杨路500号华润时代广场28楼AL单元　邮编：200122

TOYOBO (Shanghai) Biotech Co.,Ltd.

Room AL,Floor 28,TIMES SQUARE,NO.500,
Zhangyang Rd. Pudong,Shanghai, 200122
TEL:021-58794900 FAX:021-58794901

代理商信息：