

实验例6

对质粒导入突变的实验例

使用互补引物，通过突变导入法，在约5 kb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	25 μl
10pmol/μl primer F	1.5 μl
10pmol/μl primer R	1.5 μl
50ng/μl 质粒	1 μl
Total Volume	50 μl

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

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

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' -ATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'

需要导入的突变
碱基置换 ATG→TGC 5' -ATGCATGCATGCATGCATGCATGC**TGC**CATGCATGCATGCATGCATGC-3'
碱基缺失 ATG删除 5' -ATGCATGCATGCATGCATGCATGC**.....**CATGCATGCATGCATGCATGC-3'
碱基插入 ATG的间位 AAA 5' -ATGCATGCATGCATGCATGCATGC**AAA**ATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'

② 正向引物设计

以突变部位为中心，分别在5'端、3'端加上12~20bp与质粒能退火序列。

质粒序列
5' -ATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGCATGC-3'

替换用Fwd Primer
5' -TGCATGCATGCATGC**TGC**CATGCATGCATGCATGC-3'

缺失用Fwd Primer
5' -TGCATGCATGCATGC**.....**CATGCATGCATGCATGC-3'

插入用Fwd Primer
5' -TGCATGCATGCATGC**AAA**ATGCATGCATGCATGC-3'

③ 反向引物设计

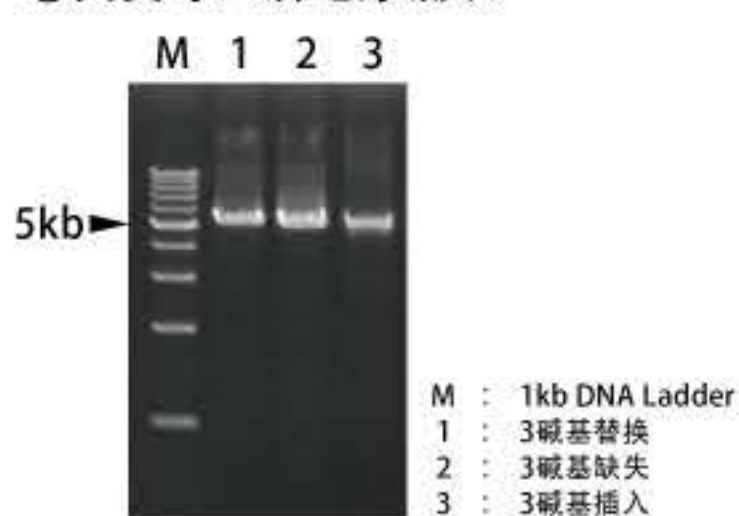
设计与上述Fwd引物逆向互补的引物。

5' -TGCATGCATGCATGC**TGC**CATGCATGCATGCAT-3'
3' -ACGTACGTACGTACG**ACG**TACGTACGTACGTA-5' → 替换用Rev Primer

5' -TGCATGCATGCATGC**.....**CATGCATGCATGCAT-3'
3' -ACGTACGTACGTACG**.....**GTCGTACGTACGTA-5' → 缺失用Rev Primer

5' -TGCATGCATGCATGC**AAA**ATGCATGCATGCATGC-3'
3' -ACGTACGTACGTACG**TTT**TACGTACGTACGTA-5' → 插入用Rev Primer

○ 突变导入后电泳确认



○ 每组8个克隆的目标突变数和目标外图变数的统计

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

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

电话: 021-5879-4900

传真: 021-5879-4901

邮编: 200122



KOD One™ PCR Master Mix

新发售

KOD One™ PCR Master Mix -Blue-

高速

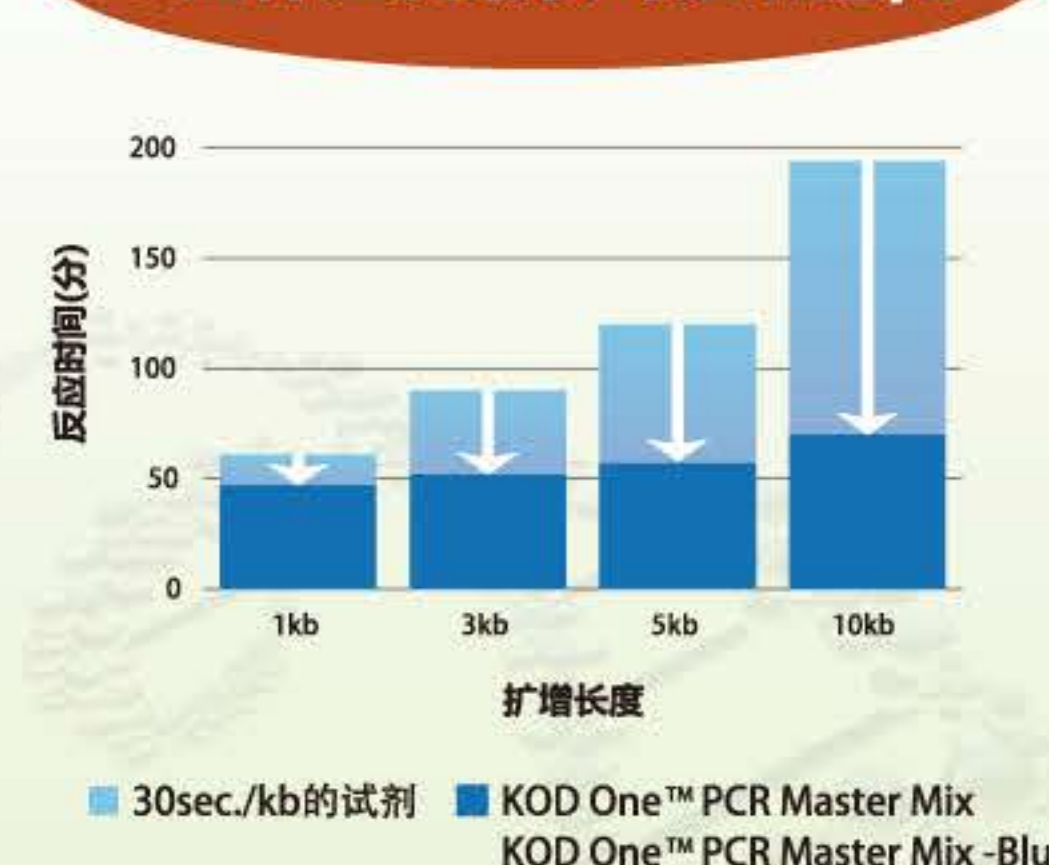
高保真

粗样品
耐性

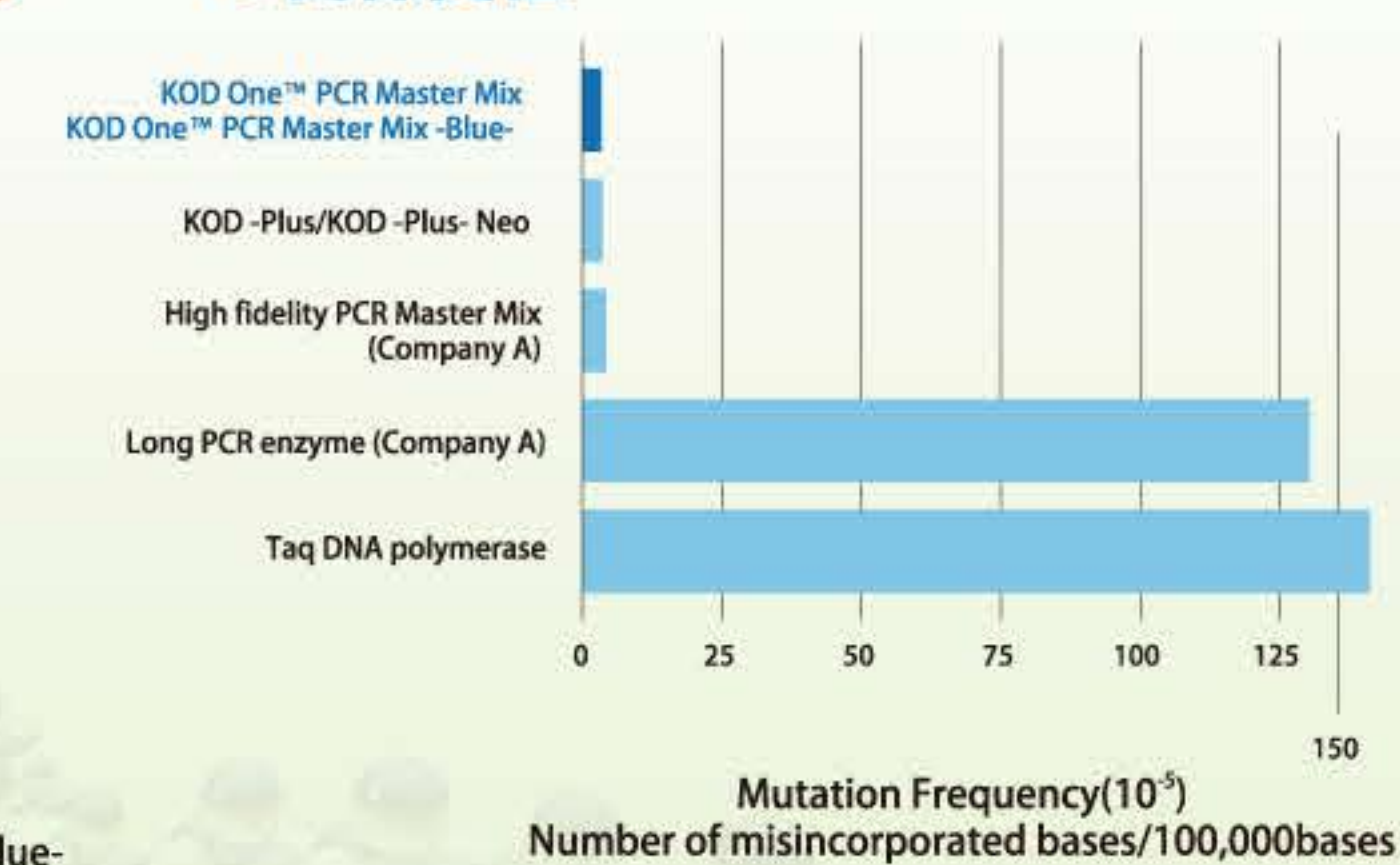
Master
Mix

实现各种高速PCR

● 延伸速度最快可达1kb/s



● 高保真性



※使用Applied Biosystems 9700

扩增长度	推荐延伸时间
< 1kb	1sec.
1~10kb	5sec./kb
>10kb	10sec./kb

● 粗样品直扩



● 适用于含有dI和dU的引物及模板

活动时间: 2018年11月1日~2019年2月28日

品名	包装	保存温度	Code No.	特价促销
(Dye-free 2 × PCR Master Mix) KOD One™ PCR Master Mix	1ml × 5支*	-20°C	KMM-101	¥ 980
(Dye-containing 2 × PCR Master Mix) KOD One™ PCR Master Mix -Blue-	1ml × 5支*	-20°C	KMM-201	¥ 980

*50 μl的体系可以反应200次。

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
电话: 021-5879-4900
传真: 021-5879-4901
邮编: 200122



产品概要

通过向高保真高扩增效率的改良型UKOD中添加改良型延伸增强剂，在保持高保真性的同时，实现了高速PCR。本品是2X的MasterMix的形式，只要与模板、引物混合即可使用。另外，还备有添加了laoding dye的产品。与以前的PCR产品相比，更加方便，所需时间更短。



Dye-free 2x PCR Master Mix
KOD One™ PCR Master Mix

Dye-containing 2x PCR Master Mix
KOD One™ PCR Master Mix-Blue

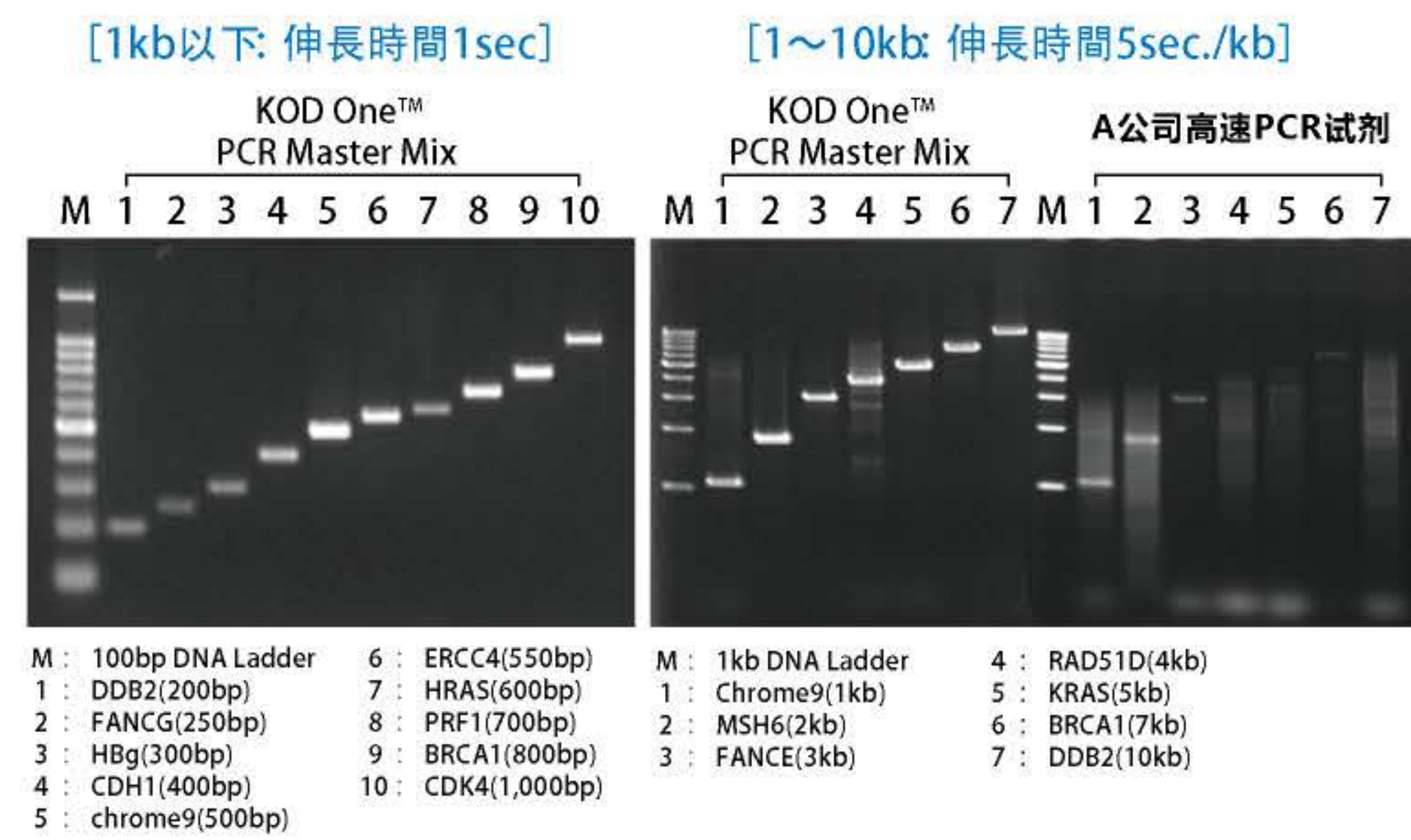


实验例1

各种长度片段的高速扩增

使用KOD One™ PCR Master Mix及KOD One™ PCR Master Mix -Blue-以人基因组DNA为模板，可进行超快速PCR扩增。结果显示，KOD One™ PCR Master Mix及KOD One™ PCR Master Mix -Blue-扩增1 kb以下的目的片段时延伸时间设为1 sec.，1 ~10 kb的目的片段时按5 sec./ kb设定可以得到清晰的扩增条带。

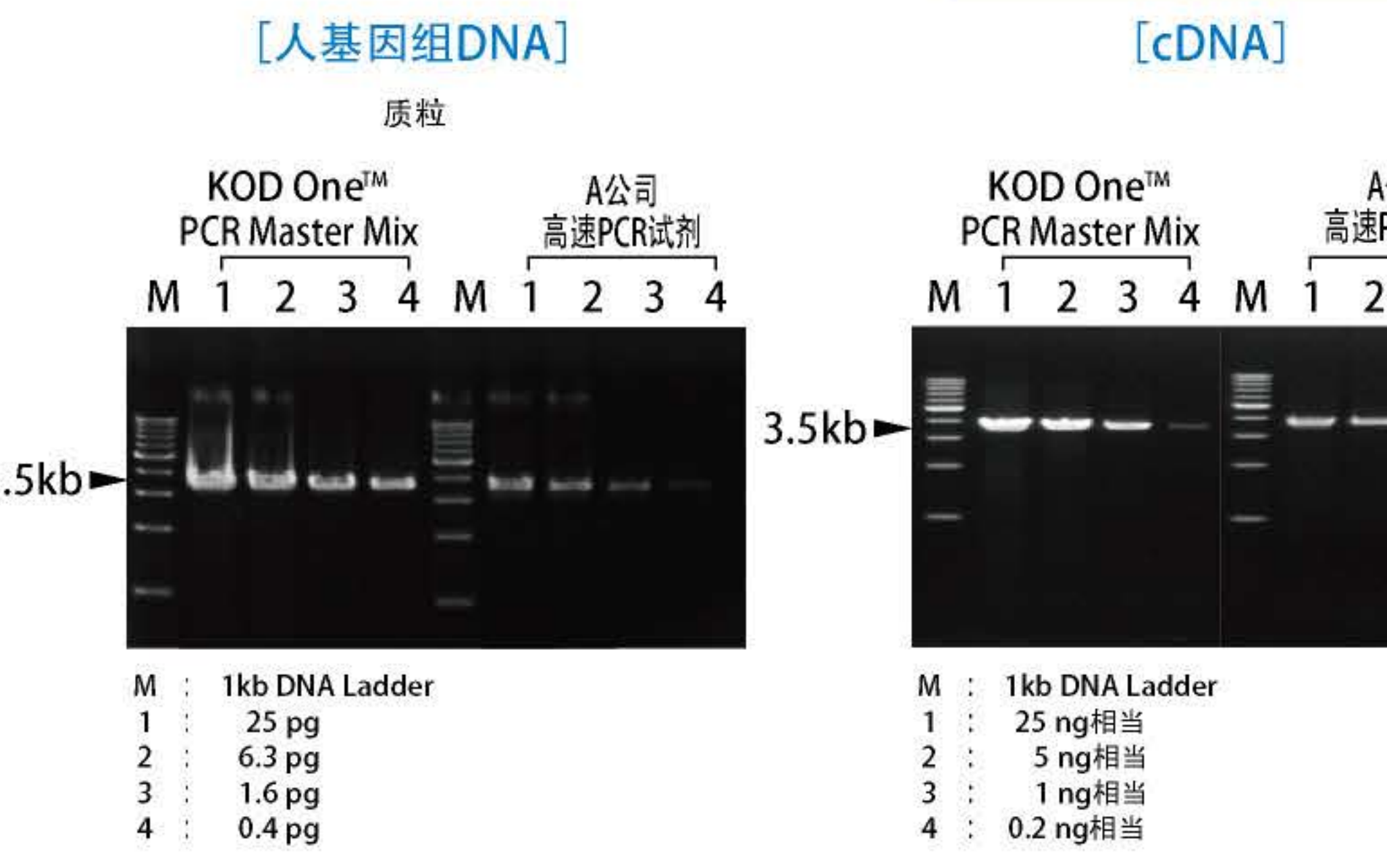
<反应液>		<PCR循环>	
灭菌水	21 μl	1kb以下的目的片段	1~10kb的目的片段
KOD One™ PCR Master Mix	25 μl	98°C 10sec.	98°C 10sec.
10pmol/μl primer F	1.5 μl	60°C 5sec.	60°C 5sec.
10pmol/μl primer R	1.5 μl	68°C 1sec.	68°C 5sec./kb
10ng/μl人类基因组 DNA	1 μl		
Total Volume	50 μl	Template: 人类基因组 DNA	



实验例2

检测灵敏度

使用人基因组DNA、cDNA、质粒，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。



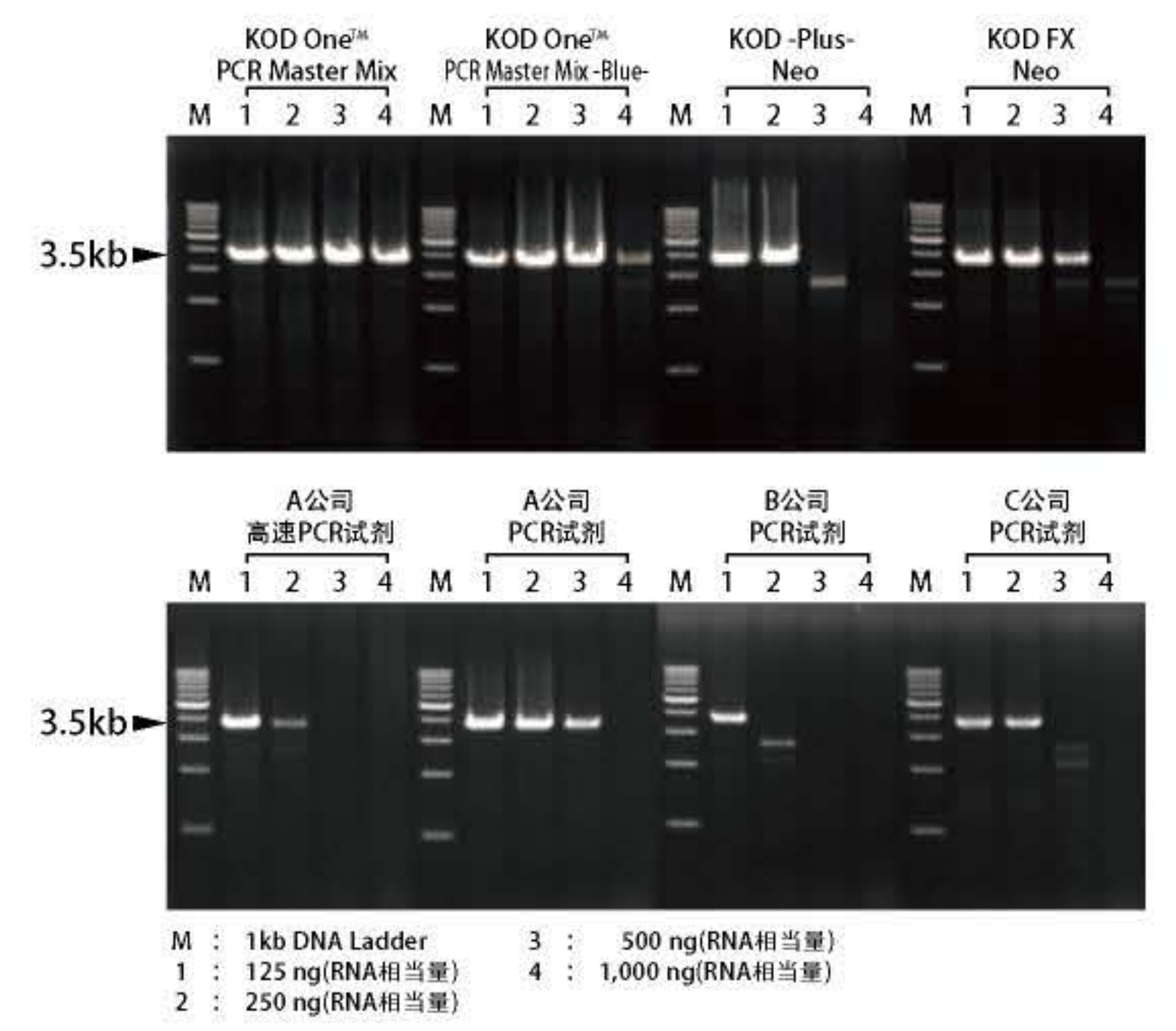
实验例3

逆转录反应液 (cDNA) 的添加量

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

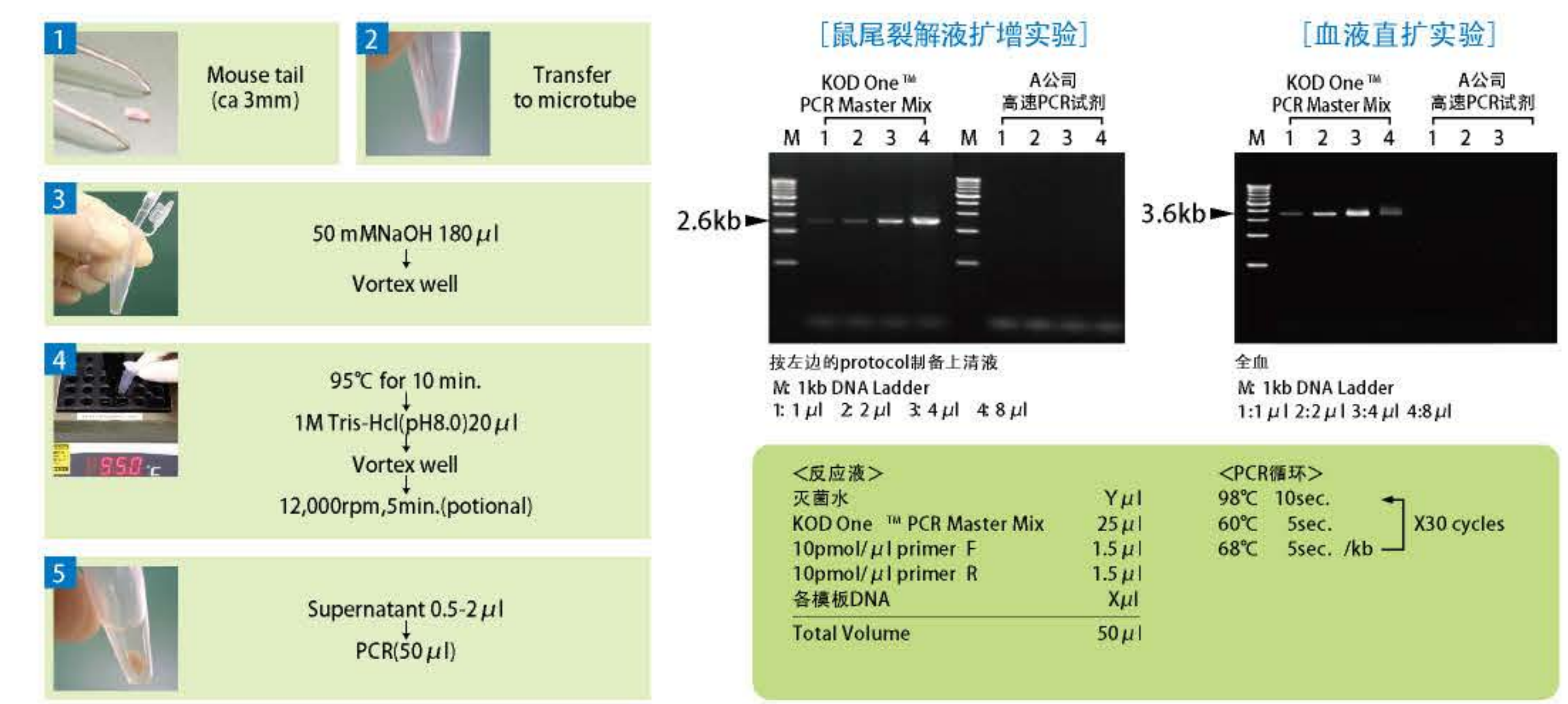
<PCR循环>
98°C 10sec.
60°C 5sec.
68°C 18sec. (5sec./kb) X30 cycles



实验例4

使用粗样品扩增

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。



实验例5

含次黄 (嘌呤核) 苷引物的扩增

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基因。

