

Code No. R060A

研究用

TaKaRa

Tks Gflex™
DNA Polymerase

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 操作流程	1
● 关于模板	2
● 参数优化	3
● 扩增产物的 Agarose Gel 电泳、克隆	4
● Troubleshooting	4
● Tks Gflex DNA Polymerase 的特点和实验例	4
● 关联产品	9

● 制品说明

本制品是源于 *Thermococcus sp.* 高保真聚合酶的改良型PCR酶。具有 α 型DNA聚合酶特有的高保真性和优良的扩增性，可以有效抑制非特异性扩增。制品中添加了Takara特别开发的延伸因子和新开发的特异性促进因子，可以对宽广的模板量进行快速、高特异性扩增。对于常规DNA聚合酶难以扩增的高GC含量或高AT含量序列，也可以进行有效扩增。此外，反应缓冲液中含有PCR反应的阻害物吸收成分和扩增增强因子，对粗提样品也可以进行高效的PCR扩增。

本制品添加了常温下能抑制 DNA 聚合酶活性和 3' → 5' 核酸外切酶活性的单克隆抗体，适用于 Hot Start PCR。

● 制品内容 (50 μ l 反应 × 200 次量)

Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 U/ μ l) *1	250 U (200 μ l)
2 × Gflex PCR Buffer (Mg^{2+} , dNTP plus) *2	1 ml × 5

* 1: 酶贮存溶液

50 mM	Tris-HCl (pH8.2, 4°C)
50 mM	NaCl
0.1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0.1%	Tween 20
0.1%	Nonidet P-40
50%	Glycerol

活性定义

用活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物，在 74°C，30 分钟内，摄入 10 nmol 的全核苷酸为酸性不溶物的活性定义为 1 个活性单位 (U)。

* 2: Mg^{2+} 浓度为 2 mM，dNTP 浓度各 400 μ M。

● 保 存

-20°C

● 操作流程

按照下列组分配制PCR反应液

试剂	使用量	终浓度
2 × Gflex PCR Buffer (Mg^{2+} , dNTP plus)	25 μ l	1 × *1
primer 1	10-15 pmol	0.2 - 0.3 μ M *2
primer 2	10-15 pmol	0.2 - 0.3 μ M *2
Template	<500 ng	
Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 units/ μ l)	1 μ l	1.25 U/50 μ l
灭菌水	up to 50 μ l	

注： 酶等各种试剂在配制前请于冰上放置。

* 1: Mg^{2+} 1 mM，dNTP 各 200 μ M

* 2: 扩增 10 kb 以上的长片段时，以终浓度 0.2 μ M 进行反应。

PCR 反应条件

[3 step PCR]

94°C	1 min. *1	
↓		
98°C	10 sec.	} 30 cycles
55 or 60°C *2	15 sec.	
68°C *3	30 sec./kb *4	

或

[2 step PCR]

94°C	1 min. *1	
↓		
98°C	10 sec.	} 30 cycles
68°C	30 sec./kb *4	

*1: 扩增富含GC序列或长片段时, 推荐进行94°C 1 min.预变性反应。

*2: 引物的T_m值 (按照下面公式※计算) 为55°C以上时→退火温度设定为60°C;
T_m值为55°C以下时→退火温度设定为55°C。

※T_m值的计算方法: $T_m \text{值} (^{\circ}\text{C}) = [(nA+nT) \times 2] + [(nC+nG) \times 4] - 5$

*3: 进行3 step PCR反应时, 也将延伸温度设定为68°C。

*4: 对粗提样品进行扩增时, 延伸时间设定为1 min./kb。

◆ PCR反应条件的选择

- 扩增10 kb以下DNA片段时, 请先尝试3 step PCR。
- 对富含 GC 序列模板或扩增 10 kb 以上 DNA 片段时, 推荐使用 2 step PCR。
- 无扩增产物或出现 Smear、非特异性扩增产物时, 请参考 Troubleshooting 内容进行调整。

● 关于模板

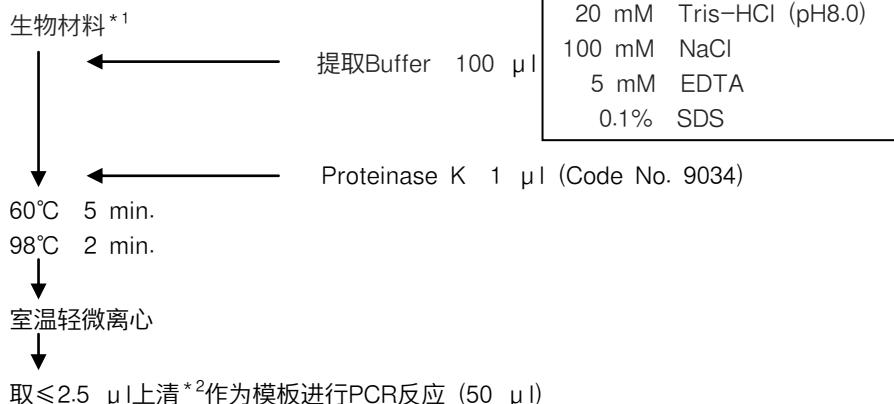
(1) 推荐使用的模板量如下。

	(长链扩增时)
人基因组DNA	5~500 ng (100~500 ng)
大肠杆菌基因组DNA	100 pg~200 ng (10~200 ng)
质粒DNA	10 pg~10 ng (1~10 ng)
cDNA	25~750 ng (250~750 ng)

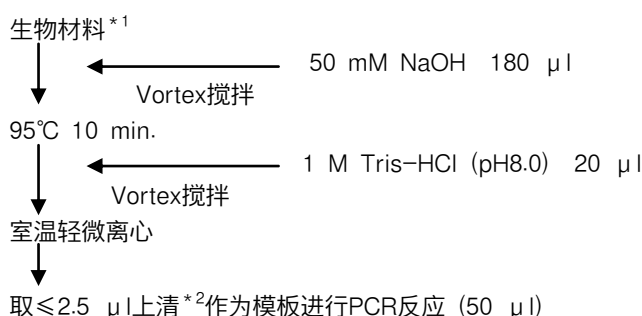
亚硫酸氢盐处理后的含有尿嘧啶的 DNA 为模板时不能使用本制品。

(2) 使用生物材料等提取液进行 PCR 时，按照以下方法配制提取液。

【Proteinase K提取方法】



【alkali热提取方法】



* 1：加入生物材料的标准量

- 小鼠尾 $\leq$ 2 mm
- 小鼠耳 $\leq$ 5 mm²
- 小鼠脏器 $\leq$ 30 mm³
- 植物叶 $\leq$ 5 mm²

* 2：需要保存时，请将上清转移到新Tube中，于-20°C保存。用于PCR反应前，室温下充分融解，确认没有沉淀再作为模板使用。

● 参数优化

为了发挥Tks Gflex DNA Polymerase的最大性能、获得良好的PCR扩增结果，有必要设定适宜参数。

(1) 引物设计

引物最好利用专业引物设计软件（OLIGO Primer Analysis Software等）进行设计，选择适宜引物序列。

【扩增片段 $\leq$ 10 kb时】

一般引物长度为20~25 mer即可获得良好的扩增，当引物Tm值在55°C以上，或引物长度在25 mer以上，可进一步提高PCR反应的成功率。

【扩增片段 $>$ 10 kb时】

建议引物Tm值在65°C以上，引物长度为25~35 mer，设计引物时3'端的GC含量不要过高。

【目的基因富含GC序列时】

建议引物的Tm值在60°C以上。

使用Tks Gflex DNA Polymerase时，避免使用含次黄嘌呤核苷碱基（Inosine）的引物。

(2) dNTP与Mg²⁺

2 × Gflex PCR Buffer含有反应适宜的Mg²⁺和dNTP，使反应液的配制更简单。由于dNTP具有螯合作用，dNTP浓度过高就会使实际参与反应的Mg²⁺浓度下降。另外，使用Tks Gflex DNA Polymerase时，不能用dUTP代替dTTP。

● 扩增产物的 Agarose Gel 电泳、克隆

(1) 扩增产物的 Agarose Gel 电泳

使用 Tks Gflex DNA Polymerase 的 PCR 扩增产物进行电泳时，建议使用 TAE Buffer。使用 TBE Buffer 会导致电泳带扩散，不能获得清晰的、良好的电泳结果。

(2) 扩增产物的克隆

使用 Tks Gflex DNA Polymerase 获得的 PCR 扩增产物几乎都为平滑末端，因此可（必要时进行磷酸化反应）克隆于平滑末端载体中。将 PCR 产物克隆于平滑末端载体时请使用 Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)。将 PCR 产物克隆于 T-vector 时，需要先在 PCR 产物 3' 末端添加“A”碱基，进行 TA 克隆时请使用 Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (Code No. 6019)。

(3) 限制酶处理时

对扩增产物进行限制酶处理时，需要进行苯酚/氯仿抽提或使用NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Code No. 740609.50/.250)等除去蛋白质。特别是使用3' -末端突出的限制酶时（例如*Pst* I等），如果 Tks Gflex DNA Polymerase残留3' → 5' 外切酶活性，在限制酶处理中会将3' -突出末端切掉。

● Troubleshooting

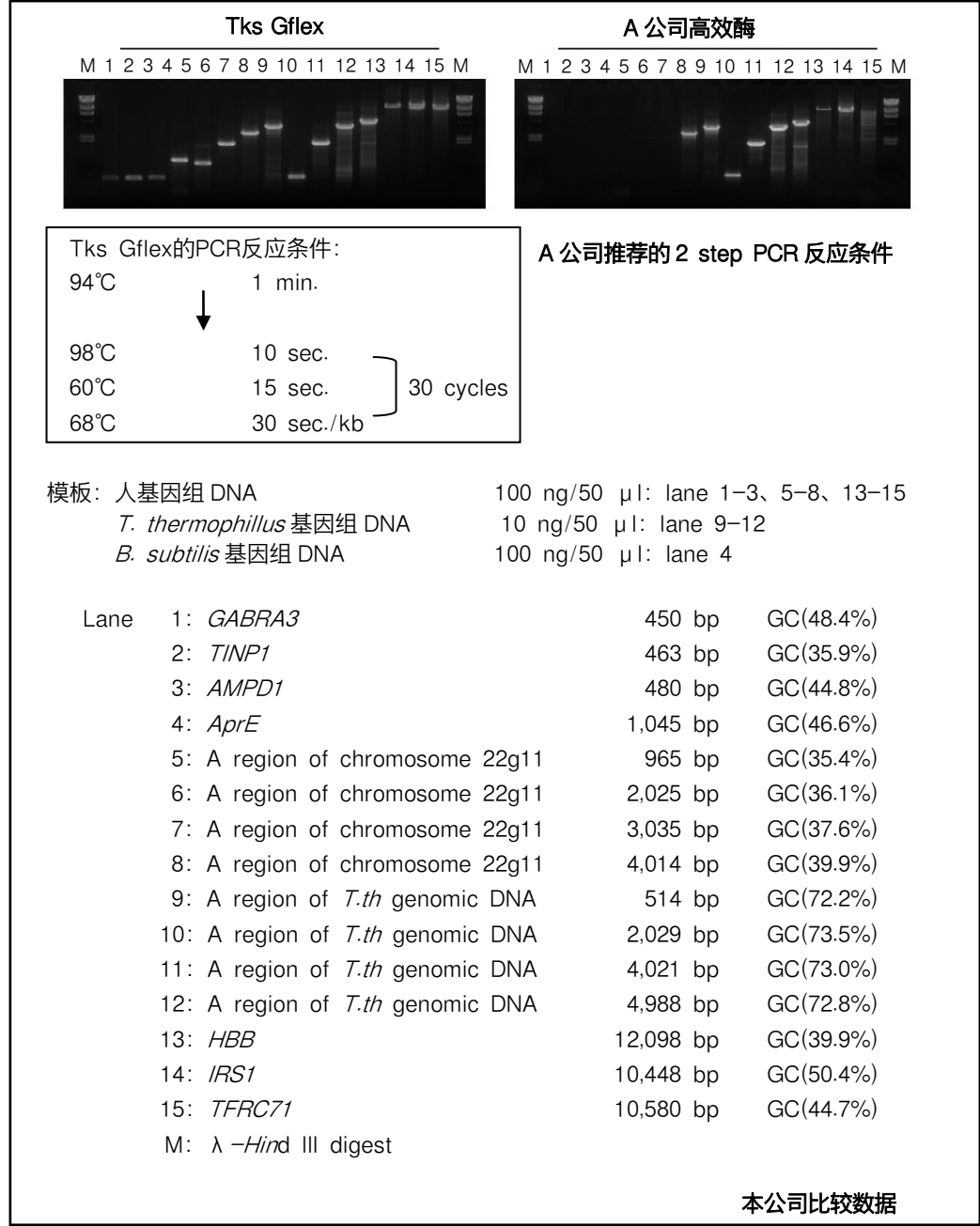
现象	问题点	对策
无扩增产物 扩增效率低	引物 Tm 值	参考：参数优化 (1) 引物设计
	退火温度	每间隔 2℃降低温度
	引物浓度	以终浓度 0.3 μM 进行 PCR 反应
	延伸时间	以 1 min./kb 延伸
	循环圈数	设定为 35~40 cycles
	模板纯度和量	使用适量的模板 DNA； 减少粗提样品的使用量； 提高 DNA 的纯度。
出现杂带或 Smear	PCR反应条件	3 step PCR反应时，可尝试2 step PCR
	引物 Tm 值	参考：参数优化 (1) 引物设计
	退火温度	每间隔 2℃上升温度至 63℃； 引物 Tm 值在 50℃以下时，尝试使用 50℃~55℃。
	酶量	将酶的加入量减少为标准使用量的一半
	引物浓度	以终浓度 0.2 μM 进行 PCR 反应
	循环圈数	设定为 25~30 cycles
	模板纯度	提高 DNA 的纯度

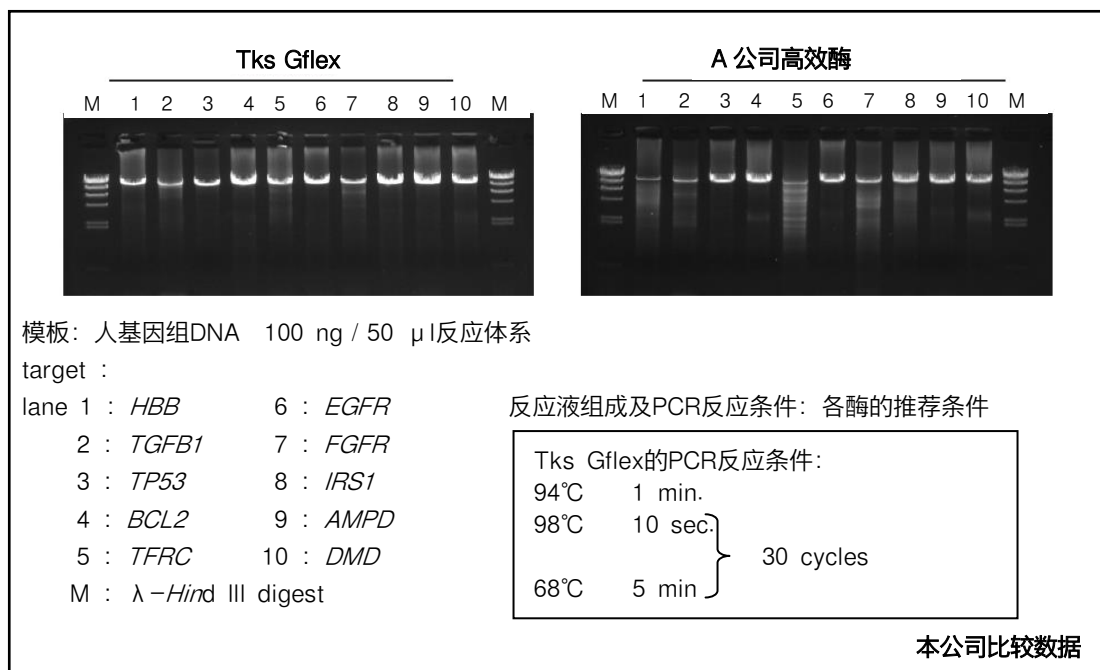
● Tks Gflex DNA Polymerase 的特点和实验例

A. 高反应成功率

Tks Gflex DNA Polymerase含有能提高反应液中酶的特异性促进因子，对于通常难以扩增的AT rich或GC rich的目的片段，也可以获得高成功率的扩增。特别是10 kb以下的目的片段使用20-25 mer的引物，普通的3 step PCR反应条件，就能得到高特异性的PCR扩增结果。另外，GC rich难扩增的序列或超过10 kb的长片段的扩增，使用2 step PCR可提高成功率。

- 1) 使用3 step PCR条件扩增各种大小和GC含量不同的目的片段
 对于2 step PCR中难以扩增的小于1 kb的目的片段，以及使用2 step PCR法不能进行特异性扩增的GC rich片段或长片段，使用推荐的3 step PCR都能得到特异性扩增。



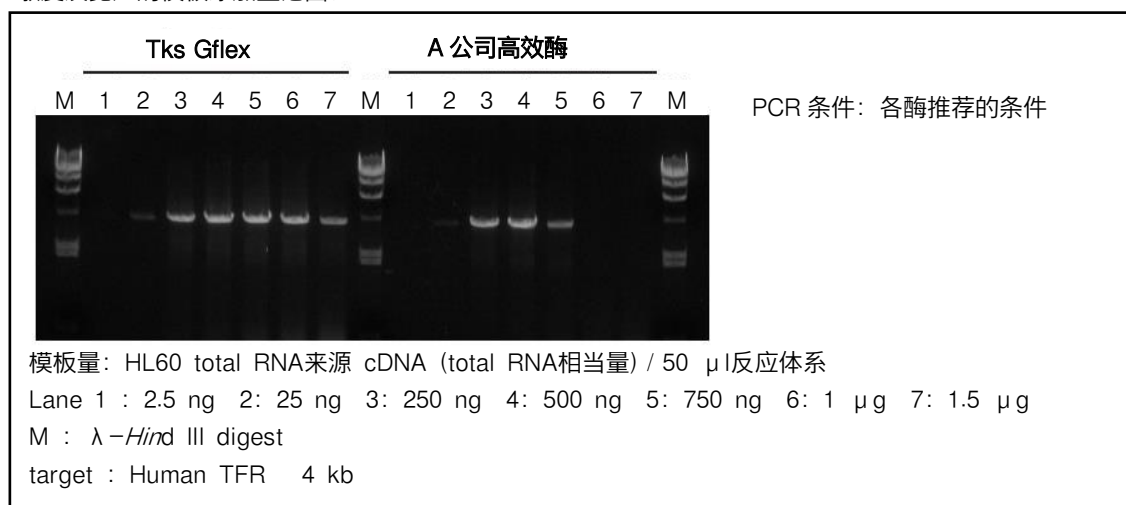


B. 反应灵敏度与模板使用量的适用范围

有校正活性的 α 型PCR酶容易受到反应液中核酸量的影响，因此，以cDNA为模板进行扩增比较困难。但Tks Gflex DNA Polymerase由于酶经过改良并含有特别开发的延伸因子，对模板的使用范围变得更宽，以cDNA为模板也可以进行高效PCR扩增。

使用各种浓度HL60细胞来源total RNA进行反转录反应后获得的cDNA作为模板，使用各酶推荐的反应条件进行transferrin receptor (TFR) 4 kb基因的扩增，比较反应灵敏度和模板量的使用范围。

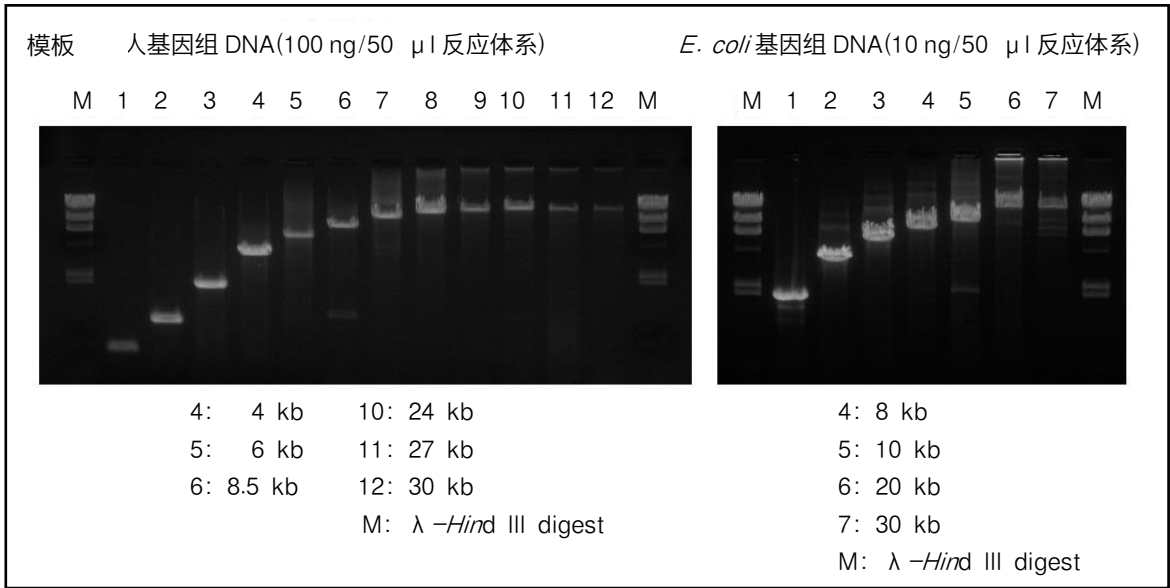
Tks Gflex DNA Polymerase对模板cDNA在宽广的浓度范围内有很好的扩增，说明此酶具有良好的反应灵敏度及宽广的模板添加量范围。



C. 延伸性

Tks Gflex DNA Polymerase通过酶的改良及含有特别开发的延伸因子，有着卓越的延伸能力。已确认以人基因组DNA及大肠杆菌基因组DNA为模板时在0.5~30 kb有很好的扩增（扩增片段长度 $\leq$ 10 kb, 3 step PCR；扩增片段长度 $>$ 10 kb, 2 step PCR）。 λ DNA作为模板时能扩增获得40 kb片段。

本酶使用了特别开发的延伸因子，对长片段扩增可达到 30 sec./kb。

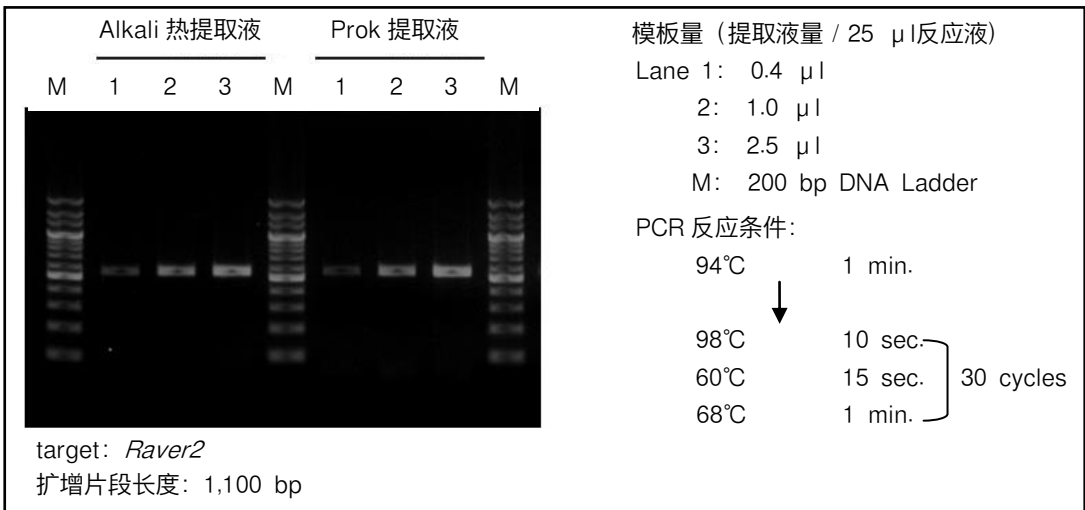


D. 对粗提样品进行扩增

因为Tks Gflex DNA Polymerase反应液中含有吸收阻害物的成分及增强扩增能力的成分，因此对于粗提样品也有很好扩增。

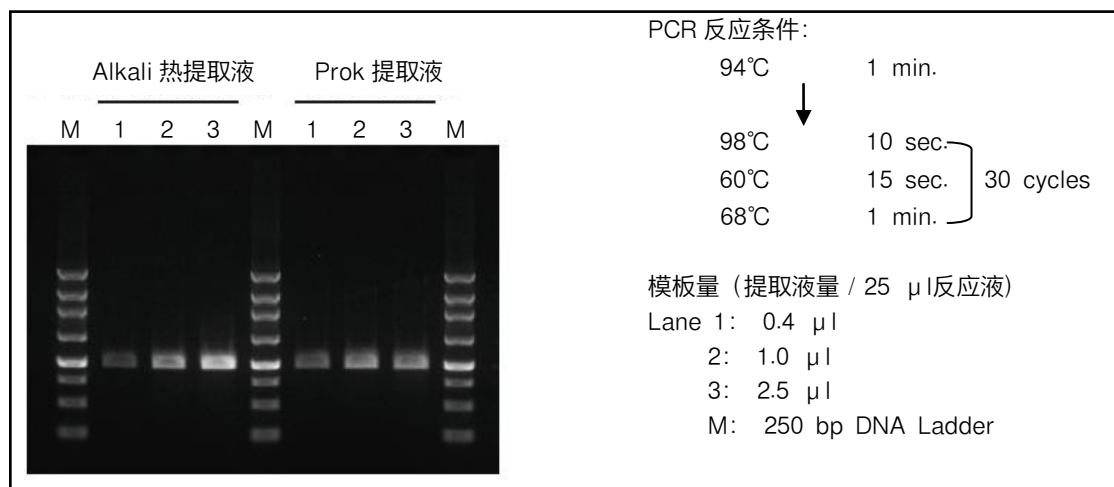
1) 小鼠尾的DNA提取及PCR扩增

用约1 mm小鼠尾的前端，按照alkali热提取法和Proteinase K提取法进行DNA提取。取部分离心后的上清进行25 μl PCR反应。使用粗提样品反应时，按照推荐的1 min./kb的延伸时间进行小鼠*Raver2*基因的PCR扩增（约1 kb），获得了良好的扩增结果。



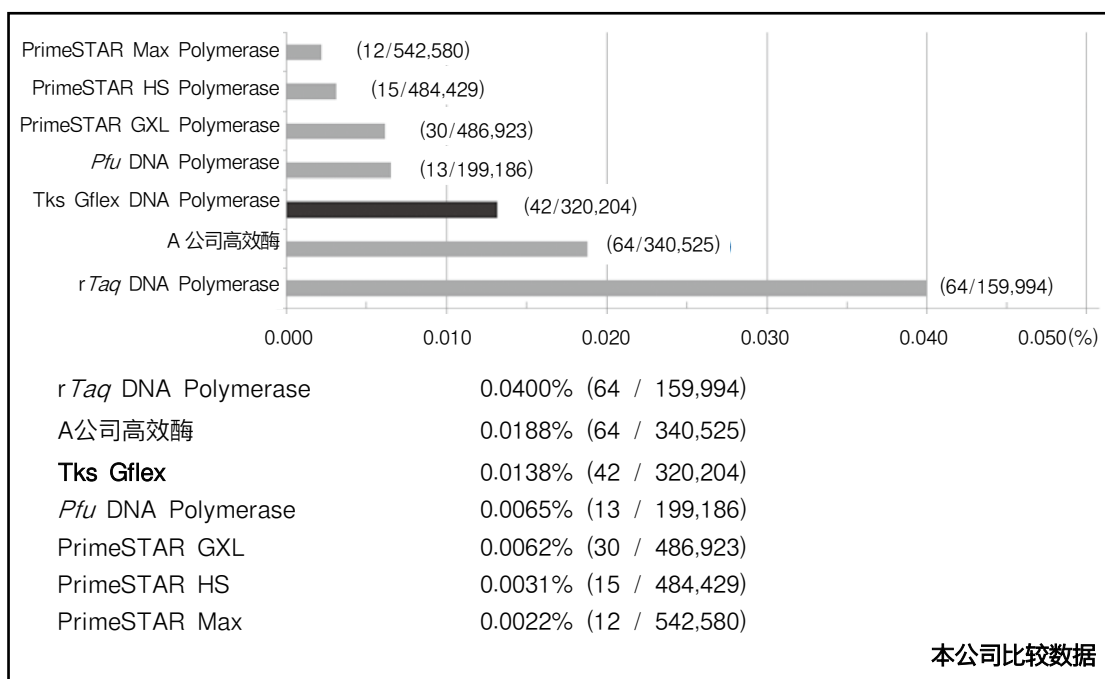
2) 番茄叶的DNA提取及PCR扩增

取直径2 mm的番茄叶，按照Alkali热提取法和Proteinase K提取法进行DNA提取。取部分离心后的上清进行25 μl PCR反应。按照粗提样品推荐的1 min./kb延伸时间进行*cox1*基因的PCR扩增（约1 kb），确认得到良好的扩增结果。



E. 保真性

以富含GC序列并容易发生碱基突变的 *Thermus thermophilus* HB8 genomic DNA为模板, 随机选取10个区域 (扩增片段大小约500 bp) 进行PCR扩增, 克隆转化后, 对每种序列挑取复数克隆并进行测序分析。以错配碱基数对总解析碱基数的比率来测定突变频率 (mutation frequency), Tks Gflex DNA Polymerase 分析的碱基总数是320,204, 错误碱基数42 (0.0138%)。



● 关联产品

PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase (Code No. R050A/B)
PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (Code No. R045A)
PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (Code No. R010A/B)
PrimeSTAR[®] HS (Premix) (Code No. R040A)
MightyAmp[™] DNA Polymerase Ver.2 (Code No. R071A/B)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[™] Gradient (Code No. TP600)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt end) (Code No. 6027)
Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR[®] (Code No. 6019)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.50/.250)

PrimeSTAR is a registered trademarks of TAKARA BIO INC.

Tks Gflex, MightyAmp, and Thermal Cycler Dice are trademarks of TAKARA BIO INC.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 TAKARA BIO INC.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>

v201702Da