TaKaRa Code：DRR013A

LA PCR™ Kit Ver.2.1
(50 次量)

说明书

TaKaRa

宝生物工程(大连)有限公司

目　　录

内 容	页 码
●制品说明	1
●制品内容	1
●保存	2
●LA PCR™技术原理	2
●使用注意	3
●基因组 DNA 的纯化方法	3
●实验操作	5
●DNA 电泳时的琼脂糖凝胶选择	8
●Q&A	8
●参考文献	10

●制品说明

PCR（Polymerase Chain Reaction）法是一种体外快速扩增DNA的简单而有效的方法。在现代分子生物学研究中，PCR法广泛应用于DNA的扩增、DNA重组、基因克隆以及DNA测序等多种领域。但是，一般PCR法具有一定的局限性，特别是难以扩增 5 kbp以上的长链DNA，这严重限制了PCR法的推广和应用。我们通过改变PCR用DNA聚合酶、PCR用Buffer、PCR扩增条件等，使 48 kbp的长链DNA的扩增成为可能，这就是LA（Long and Accurate）PCR™技术。LA PCR技术的开拓，为PCR技术的推广提供了有力保障，特别是在基因组DNA研究方面展现了广阔的前景。

本制品可以以基因组 DNA 为模板扩增长链 DNA 片段。此外，本制品中还配备了 GC rich 专用 Buffer（GC Buffer I、GC Buffer II），可以对扩增 GC rich 的 DNA 片段、DNA 重复序列、具有复杂立体结构的 DNA 片段等发挥强大威力。

当然，本制品同样适用于扩增一般的DNA片段，反应性能强。并且在本试剂盒中含有Mg^{2+} Free Buffer，可以通过调整Mg^{2+}的浓度，确定最佳的PCR反应体系。

●制品内容（50 μl 的 PCR 反应体系；50 次量）

1.	*TaKaRa LA Taq*®*1（5 U /μl）	125	U
2.	dNTP Mixture（各 2.5 mM）	400	μl
3.	10×LA PCR™ Buffer II（Mg^{2+} plus；Mg^{2+}浓度 25 mM）	250	μl
4.	10×LA PCR™ Buffer II（Mg^{2+} free）	250	μl
5.	MgCl2（25 mM）	500	μl
6.	Control Template（100 ng/μl）*2	10	μl
7.	Control Primer LA3（10 μM）	10	μl
8.	Control Primer LA4（10 μM）	10	μl
9.	λ-*Hin*d III digested MW Marker（100 ng/μl）*4	20	μl
10.	2×GC Buffer I（Mg^{2+} plus；Mg^{2+}浓度 5 mM）*3	1.25	ml
11.	2×GC Buffer II（Mg^{2+} plus；Mg^{2+}浓度 5 mM）*3	1.25	ml
12.	Control Primer GC1（10 μM）	10	μl
13.	Control Primer GC2（10 μM）	10	μl

*1 *TaKaRa LA Taq*™酶说明

【酶贮存液】

20 mM Tris-HCl(pH8.0)，100 mM KCl，0.1 mM EDTA，1 mM DTT，0.5% Tween20，0.5% Nonidet P40，50%甘油溶液。

【活性定义】

用活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模析/引物，在 74℃、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）。

【纯度】

◇ 10 U 的本酶和 0.6 μg 的λDNA-*Hin*d III 在 74℃下反应 1 小时，DNA 的电泳谱带不发生变化。

◇ 10 U 的本酶和 0.6 μg 的 Supercoiled pBR322 DNA 在 74℃下反应 1 小时，DNA 的电泳谱带不发生变化。

◇ 10 U 的本酶和 0.6 μg 的λDNA 在 74℃下反应 1 小时，DNA 的电泳谱带不发生变化。

【PCR 性能】

◇ 以λDNA 为模板，可以很好地扩增 35 kbp 的 DNA 片段（10×LA PCR Buffer II，2×GC Buffer I）。

◇ 以 Human genome DNA 为模板，可以很好地扩增 17.5 kbp（*β*-globin gene）的 DNA 片段（10×LA PCR Buffer II，2×GC Buffer I）。

◇ 以 Human genome DNA 为模板，可以很好地扩增 *c-jun* proto oncogene 1,255 bp（GC 含量 65%）的 DNA 片段（2×GC Buffer I，II）。

*2 Control Template

Human HL60 来源的基因组 DNA，浓度为 100 ng/μl。

*3 GC Buffer的使用

当扩增 GC rich 或复杂的立体结构 DNA 片段时，请先使用 GC Buffer I，当使用 GC Buffer I 不能扩增时，再试用 GC Buffer II。

*4 λ-*Hin*d III digested DNA Marker

用于 DNA 琼脂糖电泳，各条带的 DNA bp 数如下：

23,130；9,416；6,557；4,361；2,322；2,027；564；125 bp.

【Control Primer 序列】

引物名称	各引物序列
Control Primer LA3*1	5′-ACATGATTAGCAAAAGGGCCTAG CTTGGACTCAGA-3′
Control Primer LA4*1	5′-TGCACCTGCTCTGTGATTATGACT ATCCCACAGTC-3′
Control Primer GC1*2	5′-GGGAGGGGACCGGGGAACAGAG-3′
Control Primer GC2*2	5′-GAACAGTCCGTCACTTCACGTG-3′

*1 Control Primer LA3 和 Control Primer LA4 可以扩增 Control Template 的 17.5 kbp 片段。

*2 Control Primer GC1 和 Control Primer GC2 可以扩增 Control Template 的 1,255 bp 的 GC rich 区域。

●保　　存：-20℃

●LA PCR™技术原理

LA PCR™技术的关键是使用了具有 3′→5′ Exonuclease 活性（Proof reading 活性)的 PCR 用耐热性 DNA 聚合酶。在 PCR 反应过程中当有错误的碱基掺入时，DNA 延伸反应性能将会大幅度下降。*TaKaRa LA Taq* 依靠 3′→5′ Exonuclease 活性可将错配的碱基除去，从而保证了延伸反应的顺利进行，使长链 DNA 的扩增成为可能（详见图 1）。

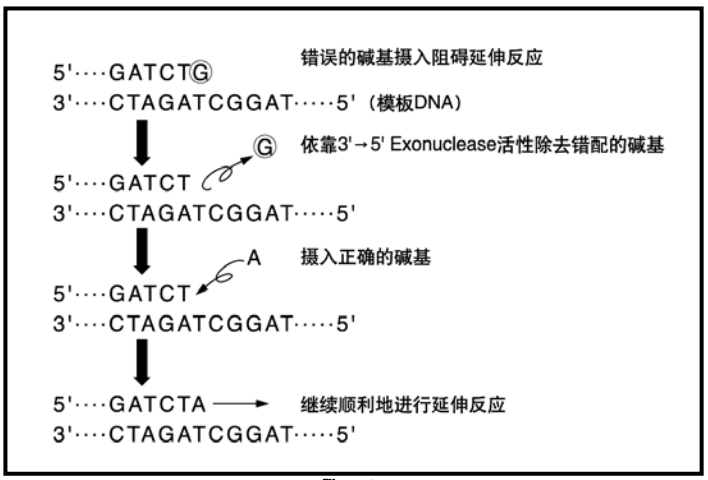


图 1. LA PCR™技术原理图

●使用注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前一定认真阅读。

① Kit 中的所有组份，在室温～37℃完全融化后，用加样器或将 Microtube 上下颠倒仔细混匀，尽量避免剧烈振荡。混合 10×LA PCR Buffer (或 2×GC Buffer), *TaKaRa LA Taq* 时，为防止起泡或酶失活，需注意仔细轻轻混合。融化后的各组份在使用前请置于冰中保存。

② 混合配制反应液时，要用加样器轻轻混合，不能剧烈振荡。

③ 扩增长片段 DNA 时的反应液体积建议为 10～50 μl。体积超过 50 μl 时，有时会降低扩增效率。

④ 扩增长片段 DNA 时的引物特异性要高，引物长度在 30～35 mer 时的效果较好。

⑤ 尽量使用高纯度的模板 DNA。扩增长片段 DNA 时的模板使用量为通常 PCR 时的 4～5 倍。

⑥ 样品DNA中如有蛋白酶污染时，在热变性步骤 (Denaturation step) 之后，再加*TaKaRa LA Taq*。通过热处理使蛋白酶失活，可以防止*TaKaRa LA Taq*的分解。

⑦ 模板 DNA 的推荐使用量。

Human genome DNA:	0.1 μg～1 μg/50 μl PCR
大肠杆菌 Genome DNA:	10 ng～100 ng/50 μl PCR
λ DNA:	0.5 ng～5 ng/50 μl PCR

●基因组 DNA 的纯化方法

模板 DNA 的质量是 LA PCR 成功与否的关键之一。超过 10 kb 以上的 LA PCR 扩增反应，不适合使用采取简单方法（例如：只进行细胞热处理或蛋白酶处理）提取的 DNA 作为模板。建议使用经过充分纯化的完整 DNA（没有 Nick 等）作为模板。

从全血中提取 DNA 时，可使用 Genome DNA Extraction Kit（TaKaRa Code No D9081），操作十分方便。

以下为提取 Human Genome DNA 和大肠杆菌 DNA 时的一般操作方法，供参考。

◆Human Genome DNA纯化法

以HL60 培养细胞（1.5×10^9 Cells）为例。

1. 将培养的HL60 细胞（1.5×10^9 Cells）收集后，用 0.7%的NaCl溶液清洗两次，然后用 15 ml 的 10 mM Tris-HCl（pH8.3）将细胞重悬。
2. 在细胞重悬液中加入 150 μl 的 Proteinase K（10 mg/ml）和 150 μl 的 SDS（10%），60℃保温 1 小时后，再在 37℃保温 16 小时。
3. 将 15 ml 的 0.1 M Tris-HCl（pH8.0）饱和的苯酚加入上述溶液中，轻轻上下颠倒混合 15 分钟。
4. 9,000 rpm（约 6,000×g）离心 10 分钟。
5. 将水相（上层）移至另一 Microtube 中，再加入 15 ml 的 0.1 M Tris-HCl（pH8.0）饱和的苯酚/氯仿/异戊醇（25 ： 24 ： 1），轻轻上下颠倒混合 15 分钟。
6. 9,000 rpm（约 6,000×g）离心 10 分钟。
7. 将水相（上层）移至另一 Microtube 中，再加入 15 ml 的氯仿/异戊醇（24 ： 1），轻轻上下颠倒混合 15 分钟。
8. 9,000 rpm（约 6,000×g）离心 10 分钟。
9. 将水相（上层）移至另一 Microtube 中，加入 1.5 ml 的 3 M 醋酸钠（pH5.2）和 30 ml 的乙醇，轻轻上下颠倒混合 15 分钟。
10. 用细玻璃棒将 DNA 缠于玻璃棒上取出。

11. 用 80%乙醇冲洗缠有 DNA 的玻璃棒，干燥处理。
12. 用 10 ml 的 TE Buffer 溶解 DNA（将缠有 DNA 的玻璃棒放入 TE Buffer 中，4℃放置一夜），然后加入 100 μl 的 RNase A（10 mg/ml），37℃保温 1 小时。
13. 加入 10 ml 的 0.1 M Tris-HCl（pH8.0）饱和的苯酚/氯仿/异戊醇（25 ： 24 ： 1），轻轻上下颠倒混合 5 分钟。
14. 9,000 rpm（约 6,000×g）离心 10 分钟。
15. 将水相（上层）转移至另一 Microtube 中，再加入 10 ml 的氯仿/异戊醇（24 ： 1）。轻轻上下颠倒混合 5 分钟。
16. 9,000 rpm（约 6,000×g）离心 5 分钟。
17. 将水相（上层）移至另一 Tube 中，加入 1 ml 的 3 M 醋酸钠（pH5.2）和 20 ml 的乙醇，轻轻上下颠倒混合 15 分钟。
18. 用细玻璃棒将 DNA 缠于玻璃棒上取出。
19. 用 80%乙醇冲洗缠有 DNA 的玻璃棒，干燥处理。
20. 用 2 ml 的 TE Buffer 溶解 DNA（将缠有 DNA 的玻璃棒放入 TE Buffer 中，4℃放置一夜），然后调整 DNA 终浓度为 0.5 mg/ml。

◆大肠杆菌基因组DNA纯化法

1. 将 200 ml L-Broth 过夜培养（使用 2 L 烧瓶）的大肠杆菌 2 瓶离心收集菌体，用 40 ml 的 Buffer（50 mM EDTA，50 mM Tris-HCl，pH8.0）重悬。
2. -80℃冷冻处理 30 分钟。
3. 将 4 ml 的 0.25 M Tris-HCl（pH8.0）溶解的溶菌酶（10 mg/ml）加入 2.中，室温下均匀混合，溶解后于冰中放置 45 分钟。
4. 在 3.中加入 8 ml 的 STEP（0.5% SDS，50 mM Tris-HCl pH8.0，0.4 M EDTA，1 mg/ml Proteinase K）50℃保温 1 小时。
5. 加入 45 ml 的 TE Buffer（10 mM Tris-HCl pH8.3，1 mM EDTA），然后再加入 96 ml 的 0.1 M Tris-HCl（pH8.0）饱和的苯酚/氯仿/异戊醇（25 ： 24 ： 1），上下颠倒轻轻混合 5 分钟。
6. 5,000 rpm（约 4,000×g）离心 15 分钟。
7. 将水相（上层）移至另一 Microtube 中，再加入 96 ml 的氯仿/异戊醇（24 ： 1），轻轻上下颠倒混合 5 分钟。
8. 5,000 rpm（约 4,000×g）离心 15 分钟。
9. 将水相（上层）移至另一 Microtube 中，加入 9 ml 的 3 M 醋酸钠（pH5.2）和 225 ml 的乙醇，轻轻上下颠倒混合。
10. 用细玻璃棒将 DNA 缠于玻璃棒上取出。
11. 用 80%乙醇冲洗缠有 DNA 的玻璃棒，干燥处理。
12. 用 20 ml 的 TE Buffer 溶解 DNA（将缠有 DNA 的玻璃棒放入 TE Buffer 中，4℃放置一夜），然后加入 200 μl 的 RNase A（10 mg/ml），37℃保温 30 分钟。
13. 加入 20 ml 的 0.1 M Tris-HCl（pH8.0）饱和的苯酚/氯仿/异戊醇（25 ： 24 ： 1），轻轻上下颠倒混合 5 分钟。

14. 10,000 rpm（约 7,500×g）离心 15 分钟。
15. 将水相（上层）转移至另一 Microtube 中，再加入 20 ml 的氯仿/异戊醇（24 ： 1）。轻轻上下颠倒混合 5 分钟。
16. 10,000 rpm（约 7,500×g）离心 15 分钟。
17. 将水相（上层）移至另一 Microtube 中，加入 2 ml 的 3 M 醋酸钠（pH5.2）和 50 ml 的乙醇，轻轻上下颠倒混合。
18. 用细玻璃棒将 DNA 缠于玻璃棒上取出。
19. 用 80%乙醇冲洗缠有 DNA 的玻璃棒，干燥处理。
20. 用 20 ml 的 TE Buffer 溶解 DNA（将缠有 DNA 的玻璃棒放入 TE Buffer 中，4℃放置一夜），然后调整 DNA 终浓度为 0.1 mg/ml。

●实验操作

1. 使用Control Template DNA时的LA PCR扩增实验例

◆以 Control Template DNA 为模板，Control Primer LA3/Control Primer LA4 为引物，扩增 Control Template 的 17.5 kbp 的 DNA 区域。

① 按下列组成配制 LA PCR 反应液。

10×LA PCR™ Buffer II（Mg^{2+} plus）	5	μl
dNTP Mixture	8	μl
Control Primer LA3	1	μl
Control Primer LA4	1	μl
TaKaRa LA Taq®	0.5	μl
Control Template	2	μl
dH_2O	32.5	μl
Total	50	μl

② 按以下条件进行 PCR 反应。

98℃ 10 sec.
68℃ 15 min.] 30 Cycles

③ 反应结束后，取 5～10 μl PCR 反应液进行 0.5%的琼脂糖凝胶电泳，可以确认到 17.5 kbp 的 PCR 扩增产物。

◆以 Control Template DNA 为模板，Control Primer GC1/Control Primer GC2 为引物，扩增 Control Template 的 1,255 bp 的 DNA GC rich 区域（GC 含量 65%）。

① 按下列组成配制 LA PCR 反应液。

2×GC Buffer I	25	μl
或 2×GC Buffer II		
dNTP Mixture	8	μl
Control Primer GC1	1	μl
Control Primer GC2	1	μl
TaKaRa LA Taq®	0.5	μl
Control Template	1	μl
dH_2O	13.5	μl
Total	50	μl

② 按以下条件进行 PCR 反应。

94℃	1 min.	
94℃	30 sec.	30 Cycles
60℃	30 sec.	
72℃	2 min.	
72℃	5 min.	

③ 反应结束后，取 5～10 μl PCR 反应液进行 1%的琼脂糖凝胶电泳，可以确认到 1,255 bp 的 PCR 扩增产物。

2. 使用Genome DNA时的LA PCR扩增实验例

◆以 Human Genome DNA 为模板，进行 LA PCR 实验，具体实验情况如下。

模板 DNA： Human genome DNA

Target： β-globin cluster region

扩增片段： 17.5 kbp、21.5 kbp

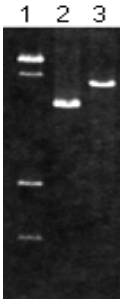
① 按下列组成配制 LA PCR 反应液。

Human Genome DNA（500 ng/μl）	1 μl
10×LA PCR™ Buffer II（Mg^{2+} plus）	5 μl
dNTP Mixture	8 μl
上游特异性引物（20 μM）	0.5 μl
下游特异性引物（20 μM）	0.5 μl
TaKaRa LA Taq®	0.5 μl
dH2O	34.5 μl
Total	50 μl

② 按以下条件进行 PCR 反应。

94℃	1 min.	
↓		
98℃	10 sec.	30 Cycles
68℃	15 min.	
↓		
72℃	10 min.	

③ 反应结束后，取 PCR 反应液 5 μl 进行 0.5%的琼脂糖凝胶电泳，确认 PCR 扩增产物。电泳结果如下，在 17.5 kbp、21.5 kbp 位置处有明显的 PCR 扩增产物。



1: λ-*Hin*d III digest DNA Marker

2: 17.5 kbp 的 DNA 片段

3: 21.5 kbp 的 DNA 片段

◆以大肠杆菌 Genome DNA 为模板，进行 LA PCR 实验，具体实验情况如下。

A. 扩增 20 kbp、28 kbp、35 kbp的DNA片段

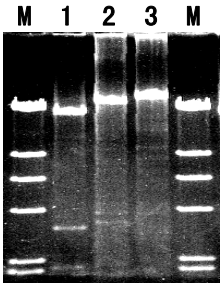
① 按下列组成配制 LA PCR 反应液。

大肠杆菌 Genome DNA（100 ng/μl）	1 μl
10×LA PCR™ Buffer II（Mg^{2+} plus）	5 μl
dNTP Mixture	8 μl
上游特异性引物（20 μM）	0.5 μl
下游特异性引物（20 μM）	0.5 μl
TaKaRa LA Taq®	0.5 μl
dH2O	34.5 μl
Total	50 μl

② 按以下条件进行 PCR 反应。

94℃ 1 min.
↓
98℃ 10 sec.
68℃ 15 min.] 30 Cycles
↓
72℃ 10 min.

③ 反应结束后，取 PCR 反应液 5 μl 进行 0.5%的琼脂糖凝胶电泳，确认 PCR 扩增产物。电泳结果如下，在 20 kbp、28 kbp、35 kbp 位置处有明显的 PCR 扩增产物。



Lane	Template	Size (bp)
1	λ DNA	20K
2	λ DNA	28K
3	λ DNA	35K
M	λ *Hin*dⅢ digest DNA Marker	

B. 扩增 2 kbp、4 kbp、6 kbp、8 kbp、10 kbp的DNA片段：

① 按下列组成配制 LA PCR 反应液。

大肠杆菌 Genome DNA（100 ng/μl）	1 μl
10×LA PCR™ Buffer II（Mg^{2+} plus）	5 μl
dNTP Mixture	8 μl
上游特异性引物（20 μM）	0.5 μl
下游特异性引物（20 μM）	0.5 μl
TaKaRa LA Taq™	0.5 μl
dH2O	34.5 μl
Total	50 μl

② 按以下条件进行 PCR 反应。

94℃ 1 min.

↓

98℃ 10 sec.

68℃ 3 min.（2 kbp、4 kbp 时）

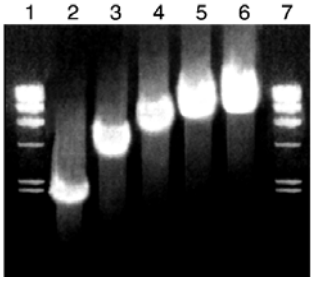
或 5 min.（6 kbp、8 kbp 时）

或 8 min.（10 kbp 时）

72℃ 10 min.

30 Cycles

③ 反应结束后，取 PCR 反应液 5 μl 进行 1%的琼脂糖凝胶电泳，确认 PCR 扩增产物。电泳结果如下，在 2 kbp、4 kbp、6 kbp、8 kbp、10 kbp 位置处有明显的 PCR 扩增产物。



1. λ *Hin*d III digest DNA Marker
2. 2 kbp
3. 4 kbp
4. 6 kbp
5. 8 kbp
6. 10 kbp
7. λ *Hin*d III digest DNA Marker

●DNA 电泳时的琼脂糖凝胶选择

根据 DNA 片段长度不同，进行电泳时选择最佳浓度的琼脂糖凝胶，可以得到效果较好的 DNA 电泳图像。下表显示了琼脂糖凝胶浓度与线形 DNA 最佳分辨范围的关系，供参考。

琼脂糖浓度	最佳线形 DNA 分辨范围
0.5%	1,000～30,000
0.7%	800～12,000
1.0%	500～10,000
1.2%	400～7,000
1.5%	200～3,000
2.0%	50～2,000

●Q&A

Q1. LA PCR 扩增的条件?

A1. 因扩增片段的大小、反应体积、使用的扩增仪器的不同而不同。

◆循环次数

根据模板 DNA 的量以及扩增片段的大小，设定 25～30 个循环。

如果循环次数太少，扩增量不足；如果循环次数太多，则会出现 Smear。

◆Denature 温度与时间

根据 PCR 仪种类不同稍有差异，一般情况如下。

使用 0.5 ml microtube	98℃, 20 sec.或 94℃, 30 sec.
使用 0.2 ml microtube	98℃, 10 sec.或 94℃, 20 sec.

Denature 时间太短或温度太低时会出现 Smear、扩增效率低；

Denature 时间太长或温度太高时，有时会得不到扩增产物。

◆Anneal 以及 Extension

合适的Anneal温度通常在 45～68℃之间。由于*TaKaRa LA Taq*在 60～68℃间也具有很高活性，可在此温度范围内设定Anneal-Extension温度，进行 2 阶段温度PCR反应。Anneal-Extension温度为 68℃时，每kbp大约可设定 30 秒～1 分钟；当温度设定在 68℃以下时，时间设定可稍长一些。通常，Anneal温度太高，有时会得不到扩增产物；Anneal温度太低时，容易发生非特异性反应。此外，Extension时间太短时，会得不到扩增产物或者会有一些短的非特异性产物生成；而Extension时间太长时，会出现Smear。

Q2. 选择 LA PCR 引物时的注意事项?

A2. 特异性非常重要。20 mer 左右的 Primer，如果特异性高，扩增 20 kbp 没有问题，但如果可能的话，建议设计在 30～35 mer 左右。使用特异性较低的引物时，会出现很多非特异性产物。

Q3. 如何确定引物的使用量?

A3. 请在终浓度为 0.1 μM～1.0 μM 的范围内进行条件研讨。引物的浓度过低时，有时扩增量较小；而引物的浓度过高时，会产生非特异性带，同时可能导致特异性扩增反应难以进行。

通常当模板 DNA 的量较多或模板为复杂结构（High Complexity）时，引物浓度应低一些；而当模板 DNA 的量较少或模板结构不很复杂（Low Complexity；如质粒等）时，引物浓度应稍高一些，通常引物终浓度以 0.4 μM 为宜。

Q4. LA PCR 时酶的使用量?

A4. 50 μl 的反应体系可使用 2.5 U 的 *TaKaRa LA Taq*。但合适的用量也与模板 DNA 的量、DNA 的结构、扩增片段的大小等有关。酶量过多时，易发生非特异性反应，出现 Smear；酶量过少时，反应性能下降。

Q5. LA PCR 时模板 DNA 的制备方法及使用量?

A5. 模板 DNA 的质量是 LA PCR 成功与否的重要因素。扩增超过 10 kbp 的 DNA 片段时，用简单的方法（例如 Cell 只经过加热处理或 Protease 处理）制备的 DNA 作模板不太合适，建议使用充分纯化的完整 DNA（没有 Nick 等）。

<u>模板DNA的推荐使用量如下：</u>

Human genome DNA:	0.1 μg～1 μg/50 μl PCR
大肠杆菌 Genome DNA:	10 ng～100 ng/50 μl PCR
λ DNA:	0.5 ng～5 ng/50 μl PCR

Q6. 是否可以对λphage 直接进行 LA PCR 反应?

A6. 可以。99℃、10 min.处理后的Phage约 10^6～10^7 pfu作为模板，至少可扩增 8 kbp的DNA片段。

Q7. 对 Mammalian Cell 或 *E.coli* 只进行热处理（98℃、2 min.）或 Protease 处理的样品可否进行 LA PCR?

A7. *E.coli*只进行热处理时可扩增 10 kbp的DNA片段 (50 μl PCR反应体系中 37℃ Overnight culture in L-both使用 2 μl)。

Human 细胞（培养细胞）如只经过热处理，可扩增数百 bp；经过 Protease 处理、热处理后的样品，可扩增 1～2 kbp。如果要扩增长片段 DNA，建议使用经过充分纯化的完整 DNA（没有 Nick 等）作模板。

Q8. 电泳时出现 Smear，为什么?

A8.

原 因	建 议
酶量过多	0.5 U 间隔递减
变性时间过短	变性时间 5 sec.间隔递增
变性温度过低	变性温度 0.5℃间隔递增
dNTP 量过少	50 μM 间隔递增
Extension 时间过长	1 min 间隔递减
循环次数过多	2 个循环间隔递减
Template 量过多	Template 量按 20%间隔递减

Q9. 出现很多非特异性 DNA 带，为什么?

A9.

原 因	建 议
Primer 浓度过高	0.1 μM 间隔递减
Primer 设计不合理	改变 Primer 的位置，增强特异性。 设计 Primer 长度为 30～35 mer， 增强特异性。
酶量过多	0.5 U 间隔递减
循环次数过多	2 个循环间隔递减
Anneal 温度过低	2℃间隔递增
从室温上升至变性温度 (94～98℃) 过程中引起的 Primer 非特异性 Annealing	使用 *TaKaRa Taq-HS* 酶、*TaKaRa Ex Taq-HS* 酶进行 Hot start 法
Extension 时间过短	1 min 间隔递增
Template 量过多	Template 量按 20%递减

Q10. 使用*LA Taq*也产生A的Overhang吗（PCR产物可否直接克隆于T-Vector）？

A10. 可以。使用*TaKaRa LA Taq*时的PCR扩增产物产生A的Overhang，与使用*TaKaRa Taq*时的PCR扩增产物一样，可以克隆于T-Vector。

●参考文献

1. Barnes, W. M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2216-2220.
2. Cheng, S., *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5695-5699.
3. Cheng, S., Higuchi, R. and Stoneking, M. (1994) *Nature Genet* 7, 350-351.
4. Cheng, S., *et al.* (1994) *Nature* 369，684-685.
5. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erich, H. A. (1988) *Science* 239, 487-491.
6. Gyllensten, U. B. and Erlich, H, A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7652-7656.
7. Kawasaki, E. S., Clark, S. C., Coyne, M. Y., Smith, S. D., Champlin, R., White, O. N. and McCormick, F. P. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5698-5702.
8. Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K. B., Drummond, R. and Gelfand. D. H. (1988) *J. Biol. Chem.* 264, 6427-6473.

MEMO

技术咨询热线：

0411-87641685，87641686
8008909508，4006518769

宝生物工程（大连）有限公司

TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号（116600）

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电　话：　0411-87641681 87641683

传　真：　0411-87619946 87621675

E.mail：　service@takara.com.cn

网　址：　http://www.takara.com.cn

V2010. 04

本制品仅供研究用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂