TaKaRa LA Taq® with GC Buffer

使 用 说 明 书

TaKaRa Code：DRR02AG

●包装量：125 U

●制品说明

本制品是应用 LA PCR 原理研制的具有 3′→5′ Exonuclease 活性（Proof reading 活性）的耐热性 DNA 聚合酶。无论是扩增短链 DNA 还是长链 DNA，其效率都优于其它同类产品，尤其在扩增大于 10 kbp 的 DNA 片段方面，其优势更加明显，而且保真性能强。当扩增具有复杂的二级结构（GC rich 等）的模板或具有重复序列的模板时，使用 GC Buffer 进行 PCR 扩增将非常有效。使用本制品扩增得到的 PCR 产物 3′端附有一个“A”碱基，因此可直接克隆于 T-Vector 中。

●制品内容

TaKaRa LA Taq（5 U/μl）	25	μl
2×GC Buffer I（5 mM Mg^{2+} Plus）*1	1.25	ml
2×GC Buffer II（5 mM Mg^{2+} Plus）*1	1.25	ml
dNTP Mixture（各 2.5 mM）	400	μl
6×Loading Buffer*2	1	ml

*1 请先使用 Buffer I，当使用 Buffer I 不能扩增时，再试用 Buffer II。

*2 ① 电泳时，请按每 5 μl PCR 反应液中加入 1 μl 本制品的比例添加混合后进行电泳。
② 6×Loading Buffer 详细说明请见 TaKaRa 商品目录。

●保　　存：-20℃

●活性定义

用活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/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

1）10 U 的本酶和 0.6 μg 的 λ-*Hin*d III 在 74℃下反应 1 小时，DNA 的电泳谱带不发生变化。
2）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。
3）10 U 的本酶和 0.6 μg 的 λ DNA 在 74℃下反应 1 小时，DNA 的电泳谱带不发生变化。

●用　　途

PCR 法扩增 DNA。

●PCR 反应性能

1）以 λ DNA 为模板，可以很好地扩增 35 kbp 的 DNA 片段（使用 2×GC Buffer I）。
2）以人基因组 DNA 为模板，可很好地扩增 17.5 kbp（β -Globin gene）的 DNA 片段（使用 2×GC Buffer I）。
3）以人基因组 DNA 为模板，可很好地扩增 *c-jun* proto oncogene 1,255 bp（GC 含量 65%）的 DNA 片段（使用 2×GC Buffer I，II）。

●应用例

以人基因组 DNA 为模板扩增 c-jun proto oncogene 1,255 bp（GC 含量 65%）的 DNA 片段

1. 按下列组份配制 PCR 反应液。

TaKaRa LA Taq (5 U/μl)	0.5	μl
2×GC Buffer I (or 2×GC Buffer II)	25	μl
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	8	μl
模板 DNA（人基因组 DNA）*	100	ng
Primer1 (20 μM)	1	μl
Primer2 (20 μM)	1	μl
灭菌蒸馏水	up to 50	μl

*【50 μl PCR 反应体系中模板 DNA 推荐使用量】

人基因组 DNA	0.1 μg～1 μg
大肠杆菌基因组 DNA	10 ng～100 ng
λDNA	0.5 ng～5 ng
质粒 DNA	0.1 ng～10 ng

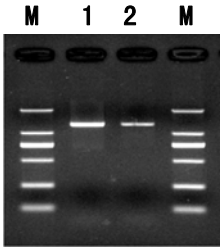
2. PCR 反应条件。

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

30 Cycles

注） PCR 反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。在实际操作中需根据模板、目的片段的大小、碱基序列和引物的长短等具体情况，设定最佳的反应条件（温度、时间等）。

3. 结果。



2% Agarose gel 10 μl 电泳结果
M: DL2,000 DNA Marker *
1: 使用 2×GC Buffer I 的 1,255 bp PCR 扩增产物
2: 使用 2×GC Buffer II 的 1,255 bp PCR 扩增产物

*（TaKaRa Code：D501A）

●注意事项

1. 使用 GC Buffer 进行 PCR 扩增时，建议使用 Tm 值较高的引物。因此，引物最好设计在 30 mer 左右。
2. 使用 GC Buffer 可能扩增的 GC rich 的 DNA 片段长度，会因 GC 含量不同而各有差异。TaKaRa 公司曾经扩增过 2 kbp 的 GC 含量在 70%的 DNA 模板。同时也可应用于 200 bp～300 bp 的短链 DNA GC rich 模板。
3. 对于一般的 DNA 模板，TaKaRa 公司曾用 GC Buffer I 成功地扩增了 GC 含量在 50% 的 17.5 kbp 的人基因组 DNA 和 35 kbp 的λ DNA。但由于 GC Buffer 和一般的 PCR 用 Buffer 相比 DNA 变性效果较强(特别是 GC Buffer II)，因此，一般的 DNA 模板使用 GC Buffer 进行 PCR 扩增时，有时会降低 PCR 的扩增效率。
4. PCR 的反应液请在冰中配制，然后置于 PCR 反应仪上进行 PCR 反应。这种冷启动法(Cool Start Method) 可增强 PCR 扩增的特异性，减少 PCR 过程中的非特异性反应，能得到良好的 PCR 结果。