

Code No. R071A

研究用

Takara

MightyAmp™
DNA Polymerase Ver.2

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● PCR 反应液配制	1
● Primer 设计	2
● PCR 反应条件设定	2
● PCR 产物电泳	2
● 扩增产物末端	2
● 实验例	3
● Troubleshooting	4
● 关联产品	5

◆小鼠耳	≤1.5 mm ²
◆小鼠肝脏、脑	≤1.5 mm ³
◆植物的叶 (西红柿、芹菜、菠菜)	≤直径 2 mm
◆生体样品粗提液	≤5 μl

* 2: 使用柠檬酸抗凝的血液时反应性能明显下降, 进行 Direct PCR 时不推荐使用柠檬酸抗凝的血液。

● Primer 设计

请尽量使用引物设计软件设计合适的引物。

引物 T_m 值 (按以下公式进行计算*) 设计在 60°C 以上。

$$*: T_m \text{ 值 } (^{\circ}\text{C}) = [(A, T \text{ 总数}) \times 2] + [(C, G \text{ 总数}) \times 4] - 5$$

● PCR 反应条件设定

标准反应条件为 3 Step PCR, 延伸温度设定为 68°C。扩增 GC Rich 模板时可以使用 2 Step PCR 进行反应。

[3 Step PCR]

98°C 2 min*¹

↓

98°C 10 sec

60°C 15 sec

68°C*² 1 min/kb

} 30 ~ 40 Cycles

[2 Step PCR]

98°C 2 min*¹

↓

98°C 10 sec

68°C 1 min/kb

} 30 ~ 40 Cycles

* 1: 使用了抗性非常强的 Hot Start 酶, 在初期变性时必须进行 98°C 2 min 的抗体变性步骤。

* 2: 3 Step PCR 时, 延伸温度请设定在 68°C。

● PCR 产物电泳

◆ 使用 MightyAmp DNA Polymerase 扩增得到的 PCR 产物, 电泳时请尽量使用 TAE Buffer, 使用 TBE Buffer 有时得不到好的电泳结果。

◆ 动物组织 (例: 小鼠尾) 进行 Direct PCR 的扩增产物电泳时样品中有不溶物 (组织) 存在, 有时 DNA 片段电泳会产生挂孔现象, 在目的片段位置没有条带。这种情况推荐向样品中添加 Loading Buffer 和 Proteinase K。

1. 6×loading Buffer (Code No. 9156) 和 Proteinase K (Code No. 9034) 按照 10: 1 (v/v) 比例混合。

2. 电泳前用 1. 的混合液和 PCR 产物按照 1: 5 (v/v) 比例混合。

● 扩增产物末端

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 (pMD20: Code No. 3270、pMD19 (Simple): Code No. 3271 等) 中。也可以使用 Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027) 将末端平滑化和磷酸化后克隆到平滑末端载体中。

● 实验例

以下是以各种组织的粗提样品为模板进行 Direct PCR 反应的实验例。

1. 小鼠 EDTA 抗凝血液和肝素抗凝血液的 Direct PCR

<方法>

取小鼠 EDTA 抗凝血液和肝素抗凝血液各 1 μ l 添加到 20 μ l 反应体系中，扩增小鼠的 *Ccnd2* 基因 (0.5 kb) 以及 *TfrC* 基因 (2 kb) (反应条件采用 3 步法, 30 Cycles)，PCR 产物各取 3 μ l 进行电泳。

<结果>

使用 MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 对小鼠 EDTA 抗凝血液和肝素抗凝血液进行 Direct PCR，可以得到很好的扩增效果。

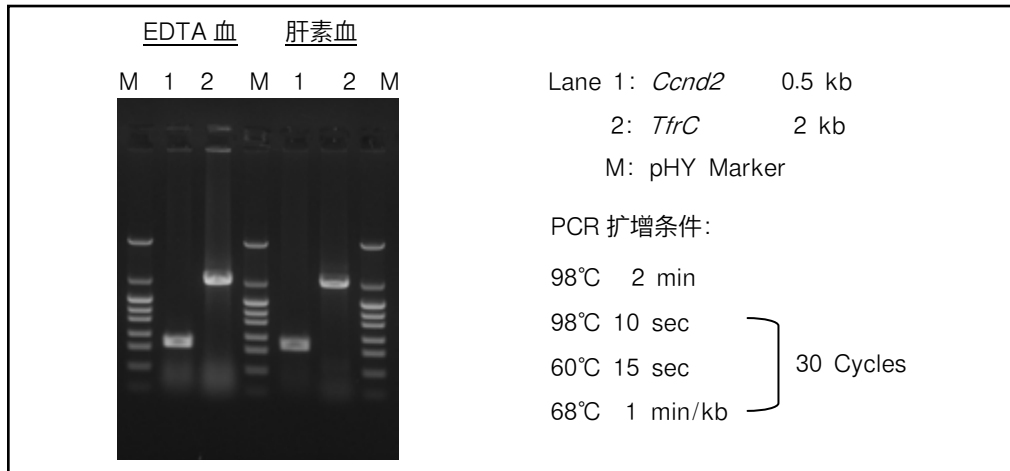


图 1. 小鼠 EDTA 抗凝血液和肝素抗凝血液进行 Direct PCR

2. 西红柿及菠菜叶的 Direct PCR

<方法>

各取直径 0.5 mm 和 1.2 mm 大小的西红柿和菠菜叶片，加入到 20 μ l 反应体系中，进行 *cox I* 基因 (0.5 kb) (反应条件采用 3 步法, 30 Cycles) 扩增。PCR 产物各取 5 μ l 进行电泳。

<结果>

使用 MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 对西红柿及菠菜叶进行 Direct PCR，可以得到很好的扩增效果。

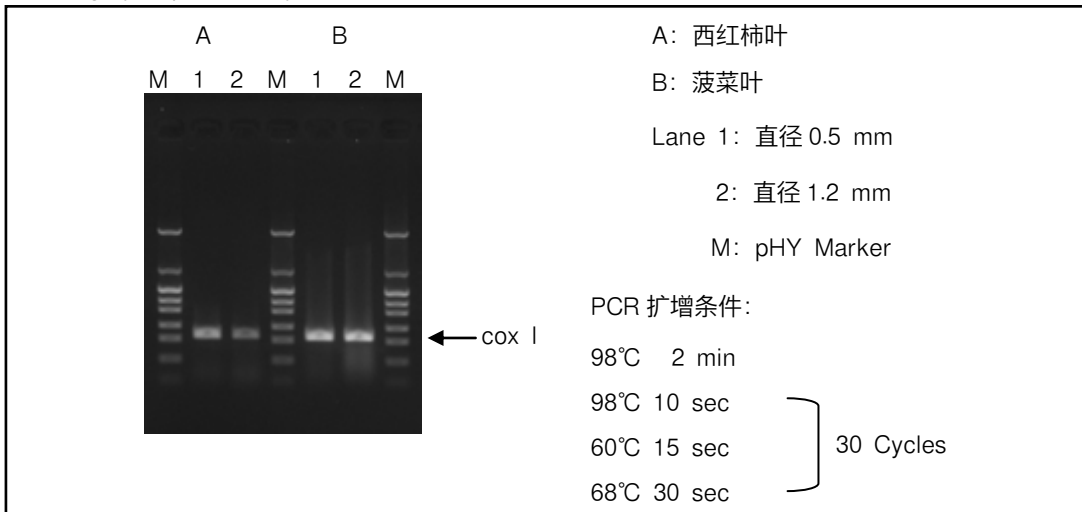


图 2. 西红柿及菠菜叶进行 Direct PCR

3. 小鼠尾及耳的 Direct PCR

<方法>

取小鼠尾前端 1 mm 及耳 1.5 mm 分别加入到 50 μ l 反应体系中, 进行小鼠 *Ywhaz* 基因 (1 kb) (反应条件采用 3 步法, 30 Cycles) 的扩增。PCR 产物各取 4 μ l 加入不含 Proteinase K 的 Loading Buffer 和含有 Proteinase K 的 Loading Buffer 中进行电泳。

<结果>

PCR 产物加入不含 Proteinase K 的 Loading Buffer 进行电泳时, 在胶孔有 DNA 片段挂孔现象, 在目的片段位置没有条带。PCR 产物加入含有 Proteinase K 的 Loading Buffer 进行电泳时, 在目的片段位置有条带。

使用 MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 对小鼠尾和耳进行 Direct PCR, 可以得到很好的扩增效果。

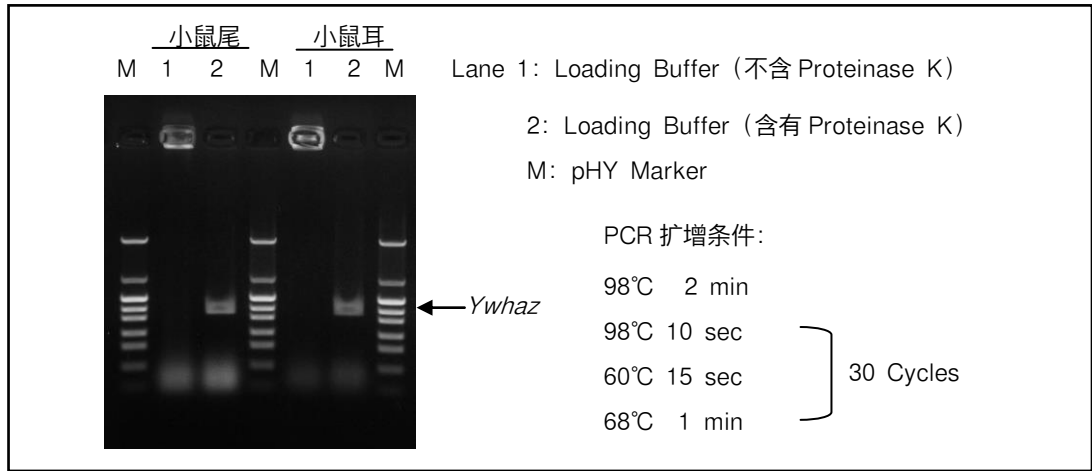


图 3. 小鼠尾及耳的 Direct PCR

● Troubleshooting

现象	问题点	对策
无扩增产物生成, 扩增效率不高	引物的 Tm 值不合适	请参考“Primer 设计”部分的要求设计引物
	使用了 2 Step PCR 方法	请尝试 3 Step PCR 方法
	使用了 3 Step PCR 方法	请尝试 2 Step PCR 方法 (3 Step PCR 没有扩增, 有时使用 2 Step PCR 可以扩增)
	退火温度高	每间隔两度降低退火温度进行条件摸索
	循环圈数少	循环圈数最大可以设定至 40 圈
	样品添加量或提取方法的问题	减少或增加样品添加量, 或者研讨样品的提取方法
有非特异性片段生成	引物的 Tm 值不合适	请参考“Primer 设计”部分的要求设计引物
	使用了 3 Step PCR 方法	请尝试 2 Step PCR 方法
	循环圈数多	循环圈数在 25-30 圈范围内进行研讨
	样品提取方法的问题	研讨样品的提取方法

● 关联产品

MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 (Code No. R076A/B)
MightyAmp™ Genotyping Kit (Code No. R074A)
Tks Gflex™ DNA Polymerase (Code No. R060A/B)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Gradient* (Code No. TP600)
Agarose L03 [TAKARA] (Code No. 5003/5003B)
T-Vector pMD20 (Code No. 3270)
T-Vector pMD19 (Simple) (Code No. 3271)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)
Lysis Buffer for PCR (Code No. 9170A)
SimplePrep™ reagent for DNA (Code No. 9180)
Plant DNA Isolation Reagent (Code No. 9194)
Proteinase K (Code No. 9034)
6×Loading Buffer (Code No. 9156)

MightyAmp, Tks Gflex, SimplePrep, 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: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v201908Da