

Code No. R060Q

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  $\alpha$  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 $\mu$ l 反应 $\times$ 40 次量)

Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 U/ $\mu$ l) * <sup>1</sup>	50 U (40 $\mu$ l)
2 $\times$ Gflex PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> , dNTP plus) * <sup>2</sup>	1 ml

### \* 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<sup>2+</sup> 浓度为 2 mM，dNTP 浓度各 400  $\mu$ 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 $\times$ Gflex PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> , dNTP plus)	25 $\mu$ l	1 $\times$ * <sup>1</sup>
primer 1	10-15 pmol	0.2 - 0.3 $\mu$ M * <sup>2</sup>
primer 2	10-15 pmol	0.2 - 0.3 $\mu$ M * <sup>2</sup>
Template	<500 ng	
Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 units/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	1.25 U/50 $\mu$ l
灭菌蒸馏水	up to 50 $\mu$ l	

注：酶等各种试剂在配制前请于冰上放置。

\* 1: Mg<sup>2+</sup> 1 mM，dNTP 各 200  $\mu$ M

\* 2: 扩增 10 kb 以上的长片段时，以终浓度 0.2  $\mu$ 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<sub>m</sub>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<sub>m</sub>值为55°C以下时→退火温度设定为55°C。

\*T<sub>m</sub>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

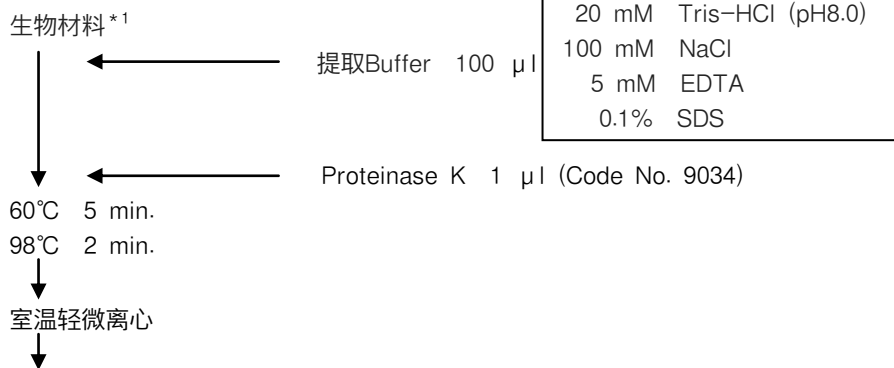
(1) 推荐使用的模板量如下。

	(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。

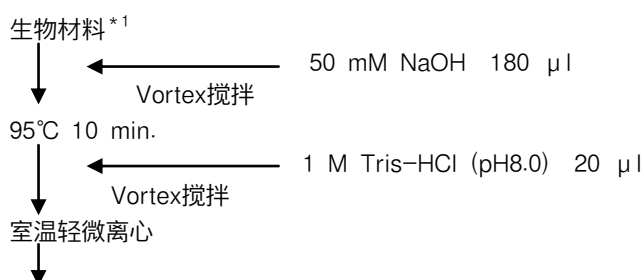
(2) 使用生物材料等提取液进行 PCR 时，按照以下方法配制提取液。

#### 【Proteinase K提取方法】



取 $\leq 2.5 \mu$ l上清 \*2作为模板进行PCR反应 (50  $\mu$ l)

#### 【alkali热提取方法】



取 $\leq 2.5 \mu$ l上清 \*2作为模板进行PCR反应 (50  $\mu$ l)

\* 1：加入生物材料的标准量

- 小鼠尾 $\leq 2 \text{ mm}$
- 小鼠耳 $\leq 5 \text{ mm}^2$
- 小鼠脏器 $\leq 30 \text{ mm}^3$
- 植物叶 $\leq 5 \text{ mm}^2$

\* 2：需要保存时，请将上清转移到新Tube中，于 $-20^\circ\text{C}$ 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 $\leq 10 \text{ kb}$ 时】

一般引物长度为20~25 mer即可获得良好的扩增，当引物 $T_m$ 值在 $55^\circ\text{C}$ 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 $> 10 \text{ kb}$ 时】

建议引物 $T_m$ 值在 $65^\circ\text{C}$ 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 $T_m$ 值在 $60^\circ\text{C}$ 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Mg<sup>2+</sup>

2× Gflex PCR Buffer含有反应适宜的Mg<sup>2+</sup>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Mg<sup>2+</sup>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°C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°C上升温度至 63°C； 引物 Tm 值在 50°C以下时，尝试使用 50°C~55°C。
	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

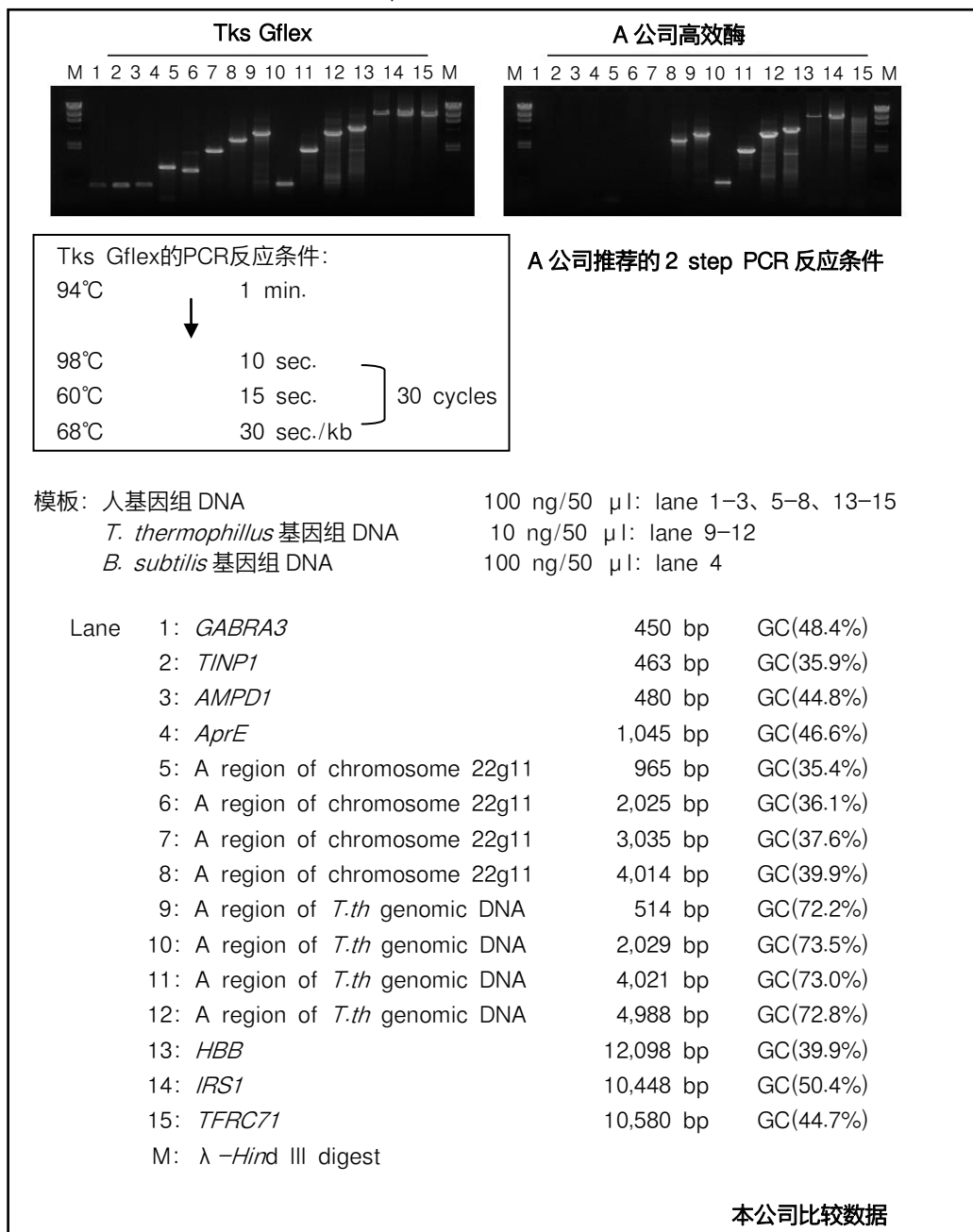
## ● Tks Gflex DNA Polymerase 的特点和实验例

### 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。

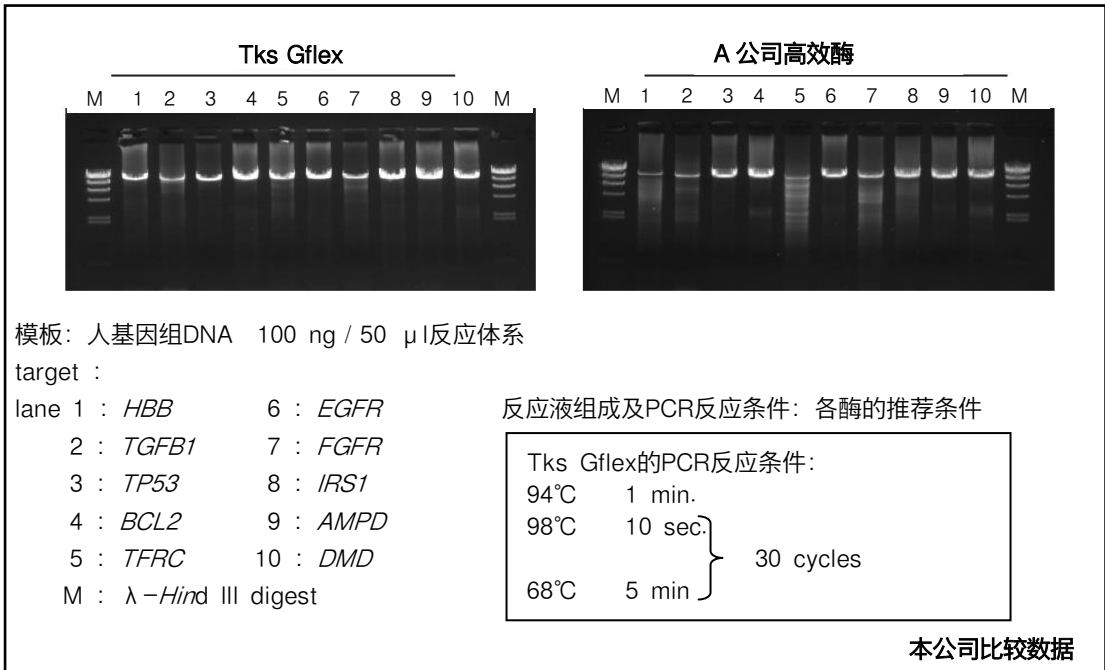
1) 使用3 step PCR条件扩增各种大小和GC含量不同的目的片段

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。



2) 以人基因组DNA为模板, 对涵盖了不同基因的目的片段 (约10 kb), 按照各酶推荐的条件进行扩增, 比较其扩增成功率。

Tks Gflex DNA Polymerase对于10种目的基因都有扩增, 能得到比其他公司特异性更高的结果。

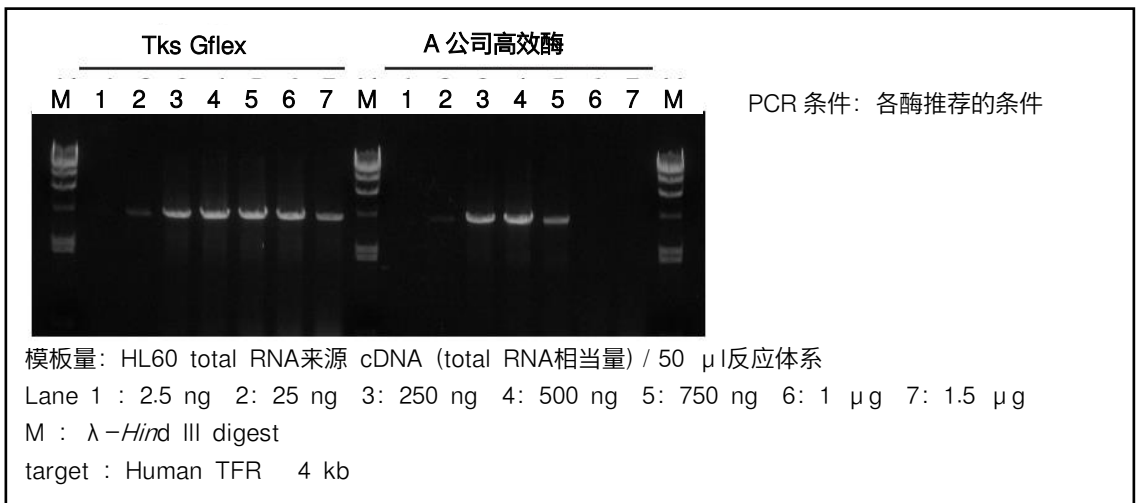


### B. 反应灵敏度与模板使用量的适用范围

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。

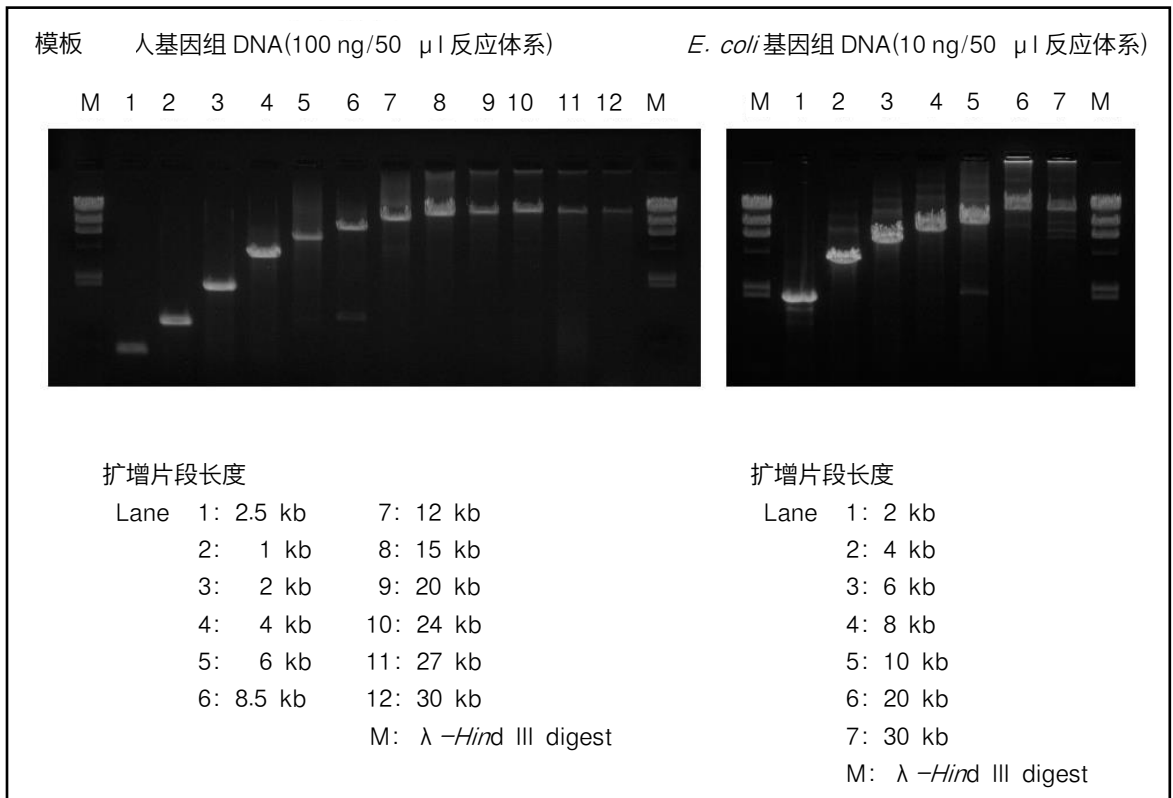


### C. 延伸性

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≤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。

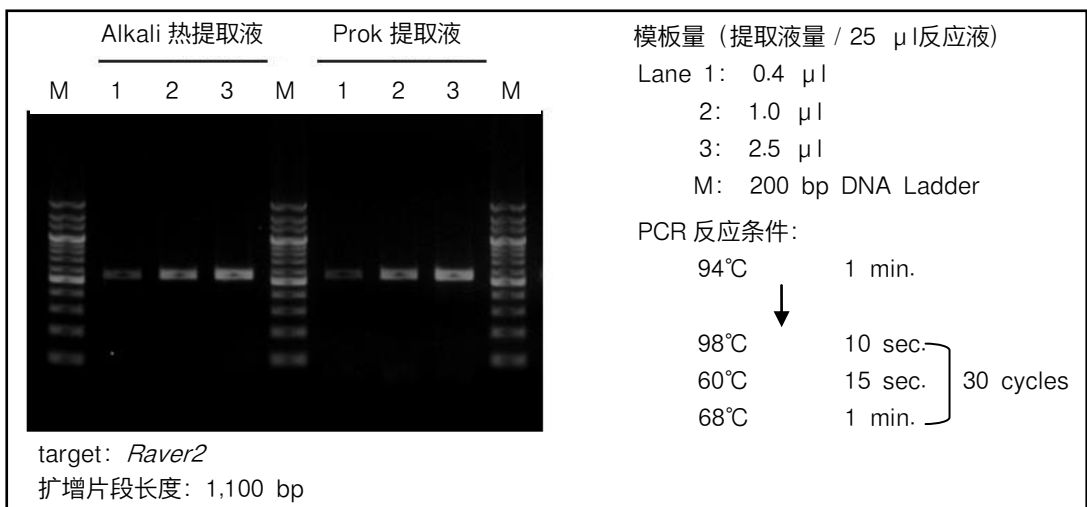


#### D. 对粗提样品进行扩增

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。

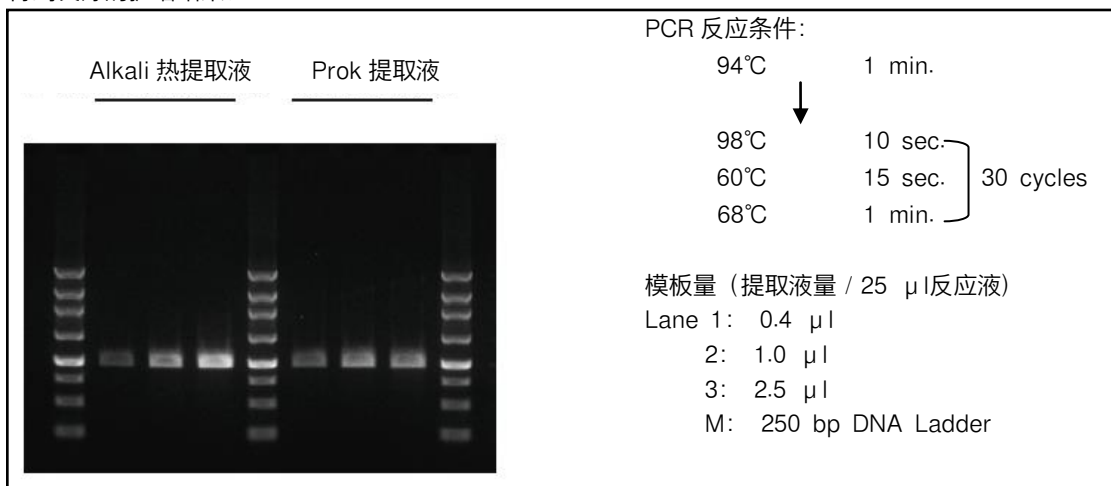
##### 1) 小鼠尾的DNA提取及PCR扩增

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。



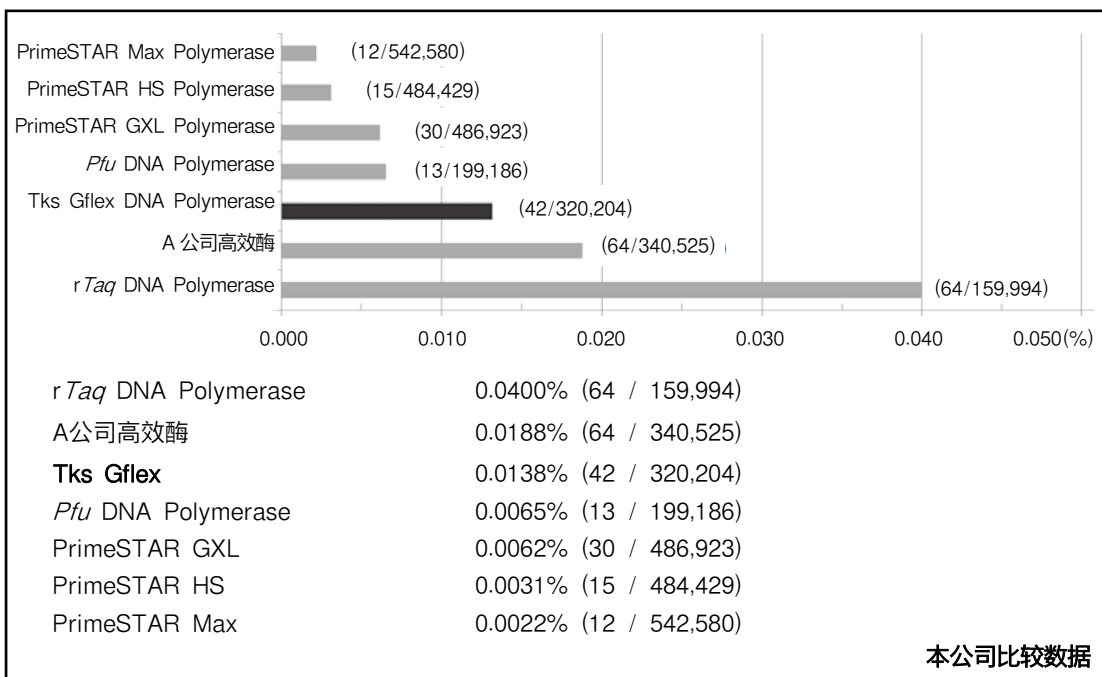
## 2) 番茄叶的DNA提取及PCR扩增

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  $\mu$ l 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<sup>®</sup> GXL DNA Polymerase (Code No. R050A/B)  
PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase (Code No. R045A)  
PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA Polymerase (Code No. R010A/B)  
PrimeSTAR<sup>®</sup> HS (Premix) (Code No. R040A)  
MightyAmp<sup>™</sup> DNA Polymerase Ver.2 (Code No. R071A/B)  
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice<sup>™</sup> Gradient/Standard (Code No. TP600/TP650)  
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt end) (Code No. 6027)  
Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR<sup>®</sup> (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](http://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