

Code No. R076A

研究用

Takara

MightyAmp™
DNA Polymerase Ver.3

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● PCR 反应液组成	1
● Primer 设计	2
● PCR 反应条件设定	2
● PCR 产物电泳	2
● PCR 扩增产物的末端形状	2
● Troubleshooting	3
● 实验例	3
● 关联产品	8

● 制品说明

MightyAmp DNA Polymerase 是追求高反应性能开发的 PCR 酶，由于本酶具有很强的扩增性能，对于使用普通 PCR 酶难以扩增的样品，也显示出很好的扩增能力，如含有大量 PCR 阻害物的生体粗提样品。MightyAmp DNA Polymerase Ver.3 是对 MightyAmp DNA Polymerase 进行了改良，与 Ver.2 相比，这种改良后的 PCR 酶和 Buffer 组合使用，可进一步增强对 PCR 阻害物的抵抗性。此外，也提高了血液、动植物组织等生物体样品直接加入到反应液中的 Direct PCR 的反应性能。

无论是 PCR 阻害物含量较多的粗提样品，还是 GC Rich、AT Rich 的模板均可在宽广的模板范围内进行有效扩增，并根据需要将试剂盒中附带的 10× Additive for High Specificity 添加到 PCR 反应液中可提高 PCR 扩增的特异性和检测灵敏度。

本酶是使用单克隆抗体的 Hot Start 型 PCR 扩增用 DNA 聚合酶，98℃ 高温加热前，抗体与酶结合，有效抑制聚合酶活性。

● 制品内容 (200 次量) *1

MightyAmp DNA Polymerase Ver.3 (1.25 U/ μ l)	200 μ l
2×MightyAmp Buffer Ver.3 (Mg^{2+} , dNTP plus) *2	1 ml × 5
10× Additive for High Specificity	500 μ l × 2

*1: 反应体系为 50 μ l 时的反应次数。

*2: Mg^{2+} 浓度是 4 mM (2×)，dNTP 浓度是各 600 μ M (2×)。

● 保存:

-20℃

● PCR 反应液组成

试剂	使用量	终浓度
2×MightyAmp Buffer Ver.3	25 μ l	1×
Primer 1	15 pmol	0.3 μ M
Primer 2	15 pmol	0.3 μ M
生体/粗提样品*1	适量	
MightyAmp DNA Polymerase Ver.3	1 μ l	1.25 U/50 μ l
(10× Additive for High Specificity)	5 μ l	1×) *2
灭菌水	up to 50 μ l	
Total	50 μ l	

*1: 组织样品或者提取液的推荐使用量

- EDTA 抗凝血, 肝素抗凝血 ≤ 10 μ l
- 柠檬酸抗凝血*3 ≤ 5 μ l
- 小鼠尾 ≤ 1 mm
- 小鼠耳 ≤ 1.5 mm²
- 小鼠脏器、脑 ≤ 1.5 mm³
- 植物叶片 (西红柿、拟南芥、菠菜) \leq 直径 2 mm
- 生体样品粗提液 ≤ 5 μ l

*3: 使用柠檬酸抗凝的血液时反应性能有可能下降。

*2: 先使用不含 10× Additive for High Specificity 的反应体系进行 PCR 扩增。想进一步提高扩增特异性和检测灵敏度时再添加 10× Additive for High Specificity 进行 PCR 扩增。

● Primer 设计

请使用引物设计软件（如：OLIGO Primer Analysis Software: Molecular Biology Insights, Inc.）设计理想引物。

建议引物 Tm 值（按以下公式进行计算*）设计在 60°C 以上。

$$T_m \text{ 值 (}^\circ\text{C)} = [(A、T \text{ 数}) \times 2] + [(C、G \text{ 数}) \times 4] + 35 - 2 \times [\text{总碱基数}]$$

使用 MightyAmp DNA Polymerase Ver.3 时，请避免使用含有次黄嘌呤的 Primer。

● 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.	} 30~40 cycles
60°C	15 sec.	
68°C*2	1 min./kb	

[2 Step PCR]

98°C	2 min.*1	
↓		
98°C	10 sec.	} 30~40 cycles
68°C	1 min./kb	

*1: 使用了抗性非常强的 Hot Start 酶，在预变性时必须进行 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 Ver.3 扩增得到的 PCR 产物，电泳时建议使用 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。这种情况下建议在 Loading Buffer 中添加 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 反应液按照 1: 5 (v/v) 比例混合。

● PCR 扩增产物的末端形状

使用本制品扩增得到的 PCR 产物 3' 端附有一个“A”碱基。因此 PCR 扩增产物可直接克隆于 T-Vector (pMD20: Code No. 3270、pMD19 (Simple): Code No. 3271 等) 中。此外，利用 Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027) 进行末端平滑化和磷酸化后可克隆于平滑末端载体。

● Troubleshooting

现象	问题点	对策
无扩增产物生成， 扩增效率低	引物的 Tm 值	请参考“Primer 设计”部分的要求设计引物
	2 Step PCR 方法	请尝试 3 Step PCR 方法
	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	每间隔 2°C 降低退火温度进行条件摸索
	循环圈数	循环圈数最大可以设定至 40 圈
	样品使用量或提取方法	减少或增加样品的使用量
		研讨样品的提取方法
PCR 反应液组成	在 PCR 反应液中添加 10× Additive for High Specificity*	
非特异性扩增片段 明显	引物的 Tm 值	请参考“Primer 设计”部分的要求设计引物
	3 Step PCR 方法	请尝试 2 Step PCR 方法
	循环圈数	循环圈数在 25-30 圈范围内进行研讨
	样品提取方法	研讨样品的提取方法
	PCR 反应液组成	在 PCR 反应液中添加 10× Additive for High Specificity*

※ 添加 10× Additive for High Specificity 可提高扩增特异性和检测灵敏度，请参考下面的实验例。

● 实验例

1. 在高浓度腐殖酸中的 PCR 反应

我们已知土壤中存在的腐殖酸对 PCR 反应有很强的阻害作用。本制品的耐腐殖酸性明显高于已有的 PCR 酶，可提高含有多量土壤成分粗提样品的 PCR 反应成功率。

模板： *E. coli* genomic DNA（相当于 2×10^5 copies）

目的基因：16S rDNA（173 bp）

10× Additive for High Specificity：未添加（-）和添加（+）

各种酶在推荐的反应条件下进行 PCR 反应

MightyAmp Ver.3 的 PCR 反应条件：

98°C 2 min.

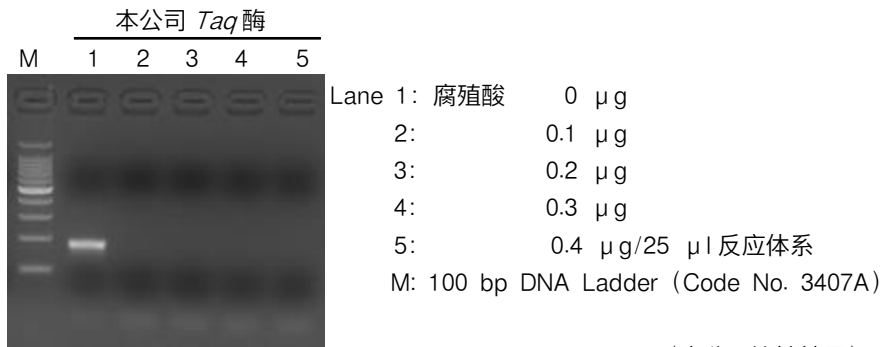
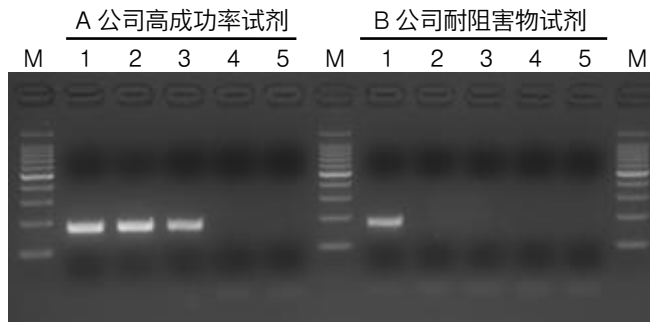
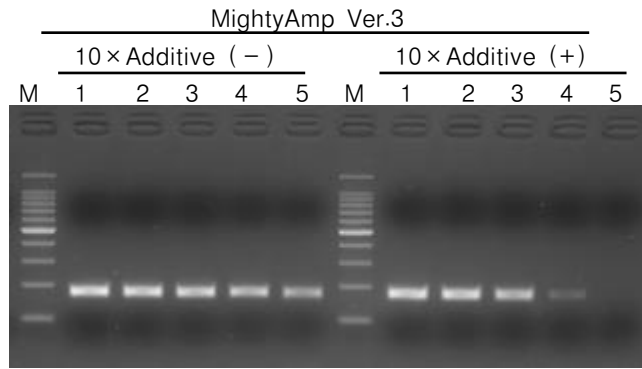
↓

98°C 10 sec.

60°C 15 sec.

68°C 30 sec.

} 30 cycles



(本公司比较结果)

2. 在高浓度 NaCl 中的 PCR 反应

我们已知海水 (约含 500 mM NaCl) 等含高浓度盐的样品对 PCR 反应有阻害作用。本产品的耐盐性明显高于已有的 PCR 酶, 可提高含盐多的粗提样品 PCR 反应成功率。

模板: *E. coli* genomic DNA (相当于 2×10^5 copies)

目的基因: 全长 16S rDNA (1,465 bp)

10×Additive for High Specificity: 未添加 (-) 和添加 (+)

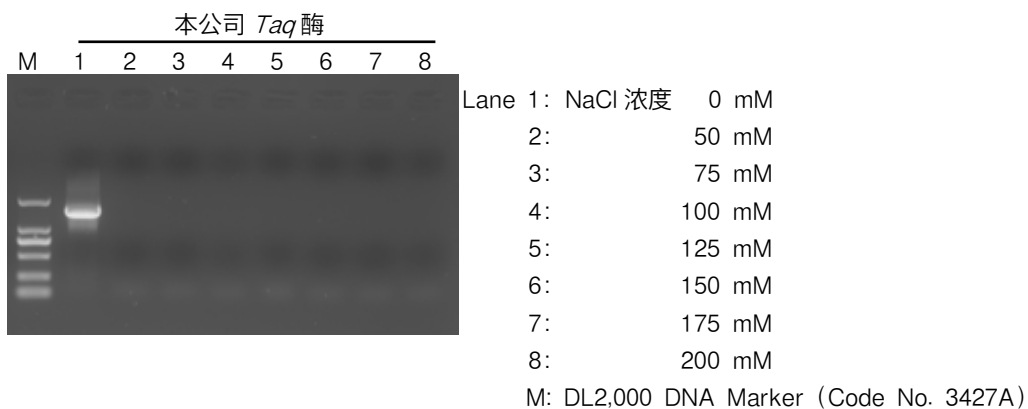
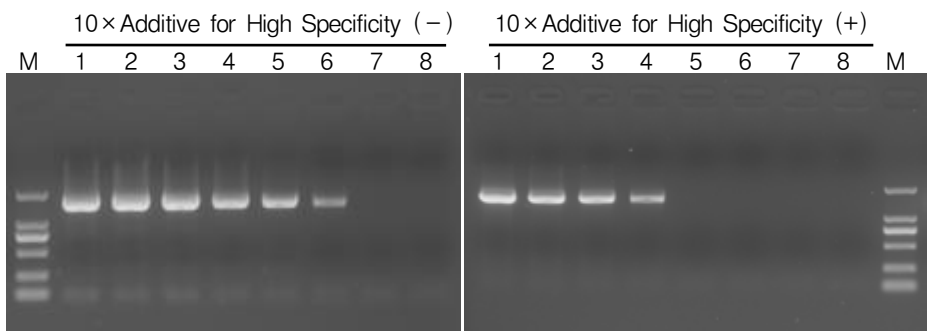
各种酶在推荐的反应条件下进行 PCR 反应

MightyAmp Ver.3 的 PCR 反应条件:

98°C 2 min.

↓

98°C	10 sec.	}	30 cycles
60°C	15 sec.		
68°C	90 sec.		



3. 添加 10× Additive for High Specificity 可改善扩增特异性

模板: Human genomic DNA

目的基因: *APOE* 基因 (520 bp)

10× Additive for High Specificity: 未添加 (-) 和添加 (+)

PCR 反应条件

98°C 2 min.

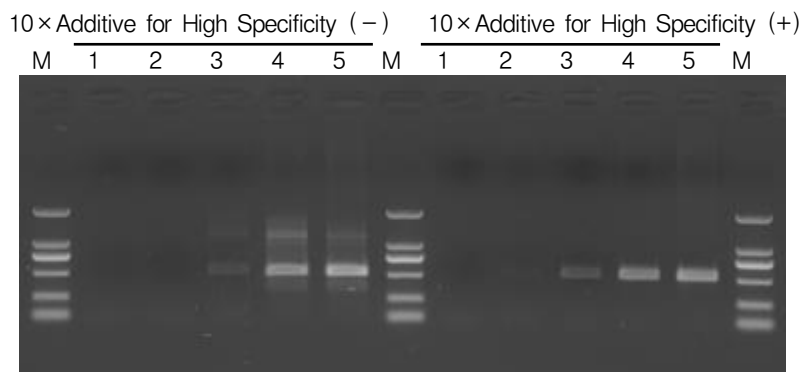
↓

98°C 10 sec.

60°C 15 sec.

68°C 30 sec.

30 cycles



Lane 1: Human genomic DNA 100 pg
 2: 1 ng
 3: 10 ng
 4: 100 ng
 5: 500 ng/50 μl 反应体系
 M: DL2,000 DNA Marker (Code No. 3427A)

(注)以纯化的基因组 DNA 为模板时,若模板的纯度较高,建议反应时添加 10× Additive for High Specificity。

4. 添加 10× Additive for High Specificity 可改善对阻害物的抵抗性 (存在单宁酸时)

我们已知植物中富含的单宁酸对 PCR 反应有很强的阻害作用。

本制品的抗单宁酸性明显高于已有的 PCR 酶,可提高富含植物成分粗提样品的 PCR 反应成功率。

模板: Human genomic DNA (100 ng)

目的基因: Human *DCLRE1A* 基因 (1 kb)

10× Additive for High Specificity: 未添加 (-) 和添加 (+)

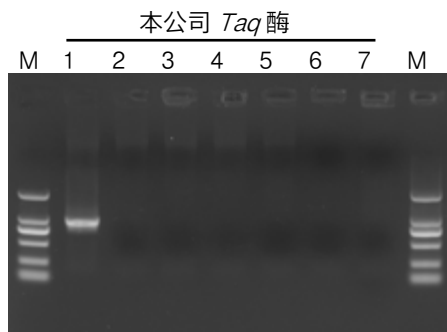
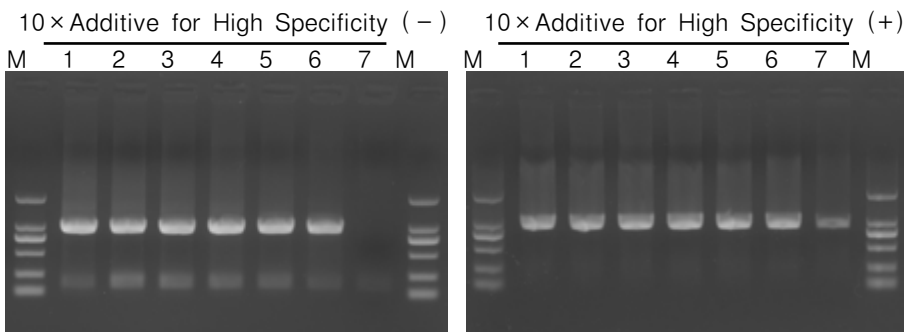
各种酶在推荐的反应条件下进行 PCR 反应

MightyAmp Ver.3 的 PCR 反应条件:

98°C 2 min.

↓

98°C	10 sec.	} 30 cycles
60°C	15 sec.	
68°C	1 min.	



Lane1: 单宁酸浓度 0 ng/μl
 2: 1 ng/μl
 3: 5 ng/μl
 4: 10 ng/μl
 5: 50 ng/μl
 6: 100 ng/μl
 7: 250 ng/μl

M: DL2,000 DNA Marker (Code No. 3427A)

5. 各种生体样品的 Direct PCR 例

5-1. 小鼠血液 FTA Card 的 Direct PCR

【方法】

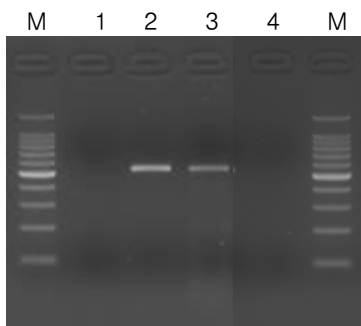
将直径为1.2 mm打孔钳剪下的小鼠血液FTA Card添加到25 μl反应体系中，扩增小鼠*Hbb-b1*基因（542 bp）（各种酶的推荐反应条件：采用3步法、30 cycles）。PCR产物各取5 μl进行电泳。

【结果】

使用 MightyAmp DNA Polymerase Ver.3 对小鼠血液 FTA Card 进行 Direct PCR，可以很好地扩增目的基因。

MightyAmp Ver.3 的PCR反应条件：

98°C	2 min.	
↓		
98°C	10 sec.	} 30 Cycles
60°C	15 sec.	
68°C	30 sec.	



Lane 1: MightyAmp Ver.2 (Code No. R071A)
 2: MightyAmp Ver.3
 10×Additive for High Specificity (-)
 3: MightyAmp Ver.3
 10×Additive for High Specificity (+)
 4: B 公司耐抗阻害物试剂
 M: 100 bp DNA Ladder (Code No. 3407A)
 (本公司比较结果)

5-2. 人 EDTA 抗凝血液和肝素抗凝血液的 Direct PCR

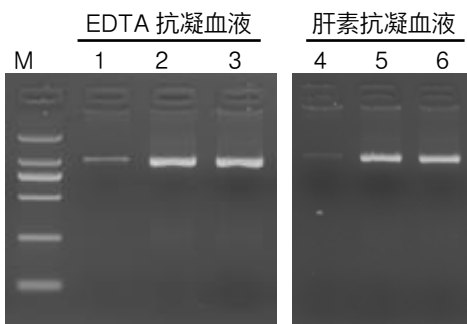
【方法】

取人 EDTA 抗凝血液和肝素抗凝血液各 5 μl 添加到 25 μl 反应体系中，扩增人的 *DCLRE1A* 基因（1 kb）（反应条件采用 3 步法，30 cycles），PCR 产物各取 5 μl 进行电泳。

【结果】

使用 MightyAmp DNA Polymerase Ver.3 对人 EDTA 抗凝血液和肝素抗凝血液进行 Direct PCR，可以很好地扩增目的基因。

PCR反应条件：	98°C	2 min.	
	↓		
	98°C	10 sec.	} 30 cycles
	60°C	15 sec.	
	68°C	1 min.	



Lane1,4: MightyAmp Ver.2 (Code No. R071A)
 2,5: MightyAmp Ver.3
 10×Additive for High Specificity (-)
 3,6: MightyAmp Ver.3
 10×Additive for High Specificity (+)
 M: DL2,000 DNA Marker (Code No. 3427A)

● 关联产品

MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.2 (Code No. R071A/B)
MightyAmp™ Genotyping Kit (Code No. R074A)
MightyAmp™ for Card (Code No. R072A/B)
MightyAmp™ for FFPE (Code No. R073A/B)
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)
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, SimplePrep, Thermal Cycler Dice, and Tks Gflex 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>