

Tks Gflex™ DNA Polymerase使用指南

— 目录 —

1. Tks Gflex™ DNA Polymerase 产品信息及技术信息	p.2
2. 多个扩增困难因素存在条件下的PCR	p.3
GC rich · AT rich目的序列 × 长链 · 短链扩增	
粗提样品 × Multiplex PCR	
粗提样品 × 长链 · 短链扩增	
3. 粗提样品起始的PCR实验例	p.4 -6
4. 用户实验例	p.7
小鼠尾提取液起始的扩增	
水稻Os12g37570基因的克隆	
小鼠ES细胞来源的粗提样品起始的PCR	
5. 参考文献	p.8
6. 关联产品	p.8



以下情况推荐使用Tks Gflex™

- ☑ 想要追求克隆等的准确性，但受GC rich · AT rich或长链合成等难扩增因素的限制，使用高保真PCR酶时很难扩增或非特异性扩增较多导致目的基因扩增量不足时。
- ☑ 使用了抗阻害物质的酶，但得不到全长扩增产物，或非特异性扩增较多。

产品名称	扩增效率	准确性	特异性	粗提耐性	扩增长度 (人基因组)	PCR产物 末端形状
Tks Gflex™ DNA Polymerase	★★★★★	★★★	★★★★★	★★★★	~30 kb	平滑末端
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase	★★★	★★★★★	★★★	★	~6 kb	平滑末端
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase	★★★★	★★★★	★★★★	★★★	~30 kb	平滑末端
MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3	★★★★★	★	★★★	★★★★★	~2 kb	A碱基突出

Tks Gflex™ DNA Polymerase产品信息与技术信息

产品信息

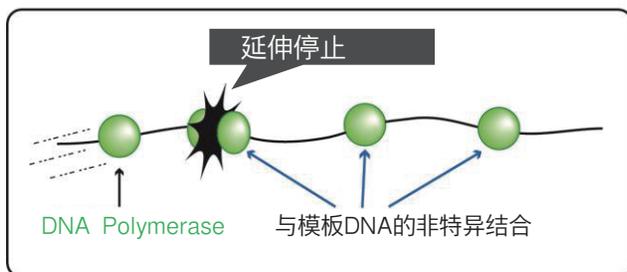
产品名称	Code No.	包装量
Tks Gflex™ DNA Polymerase	R060Q	50 U
	R060A	250 U
	R060B (A × 4)	1,000 U

技术信息

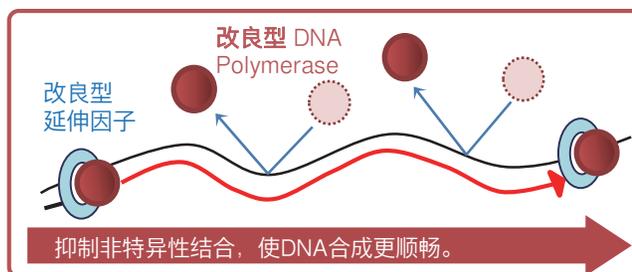
使用改良 α 型聚合酶、通过添加改良型延伸因子提高反应性能

通过对 α 型聚合酶进行改良、抑制了酶自身对于DNA模板的非特异性扩增以及过剩结合。此外，通过添加改良型延伸因子，使得DNA合成能够连续顺畅的进行，从而提高反应性能。增加延伸性、能够稳定的获得足够长度的扩增产物。（图1）

以往的 α 型聚合酶的反应（示意图）



Tks Gflex™ 的反应(示意图)



通过背景降低因子的添加大幅提高了反应的特异性（图2）

通过【背景降低因子】提高引物特异性结合，从而大幅减少非特异性扩增。

延伸性更好

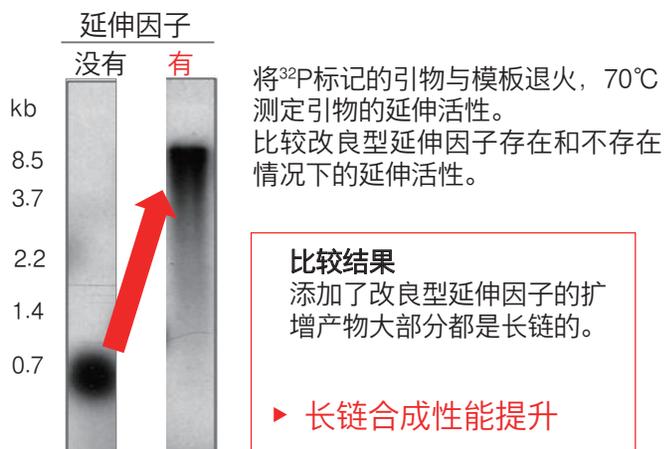


图1. 改良型延伸因子的效果

反应特异性大幅提升

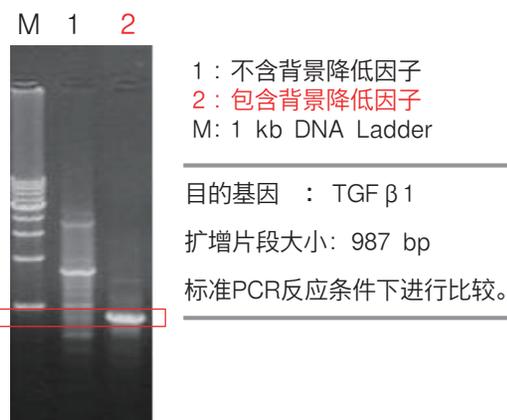


图2. 背景降低因子的效果

多个扩增困难因素存在条件下的PCR

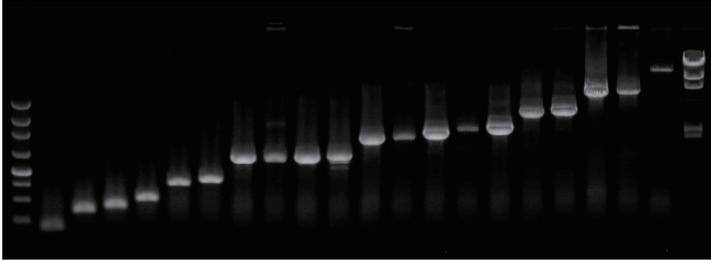
不同链长、不同GC含量的目的基因的扩增

长链·短链

GC rich·AT rich

以人心脏来源的total RNA起始的cDNA为模板、对链长和GC含量均不同的20种cDNA的ORF全长进行PCR扩增。标准条件下20种目的基因的ORF都被扩增出来。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M2



M : 250 bp DNA Ladder
M2: λ -Hind III digest

※退火温度的设定方法请参照
Tks Gflex™ DNA Polymerase
的操作说明书。

PCR条件
94°C 1 min
↓
98°C 10 sec
※ 55°C or 60°C 15 sec
68°C 30 sec/kb } 35 cycles

● 目的基因一览

Lane No.	基因名	链长 (bp)	GC (%)	lane No.	基因名	链长 (bp)	GC (%)
1	PLN	159	39.6	11	KCNQ1	2,031	64.2
2	NKX2-5	339	68.4	12	DTNA	2,232	49.5
3	FABP3	402	50.0	13	JUP	2,238	62.2
4	MYL2	501	50.4	14	CEP85L	2,418	42.0
5	CMA1	744	52.2	15	PKP2	2,514	53.3
6	CITED2	813	63.8	16	KCNH2	3,480	65.9
7	GATA4	1,329	68.8	17	JAG1	3,657	54.0
8	MEF2C	1,392	49.4	18	MYH6	5,820	57.6
9	CD36	1,419	39.5	19	SCN5A	6,048	57.3
10	ADRB1	1,434	71.8	20	RYR2	14,904	46.2

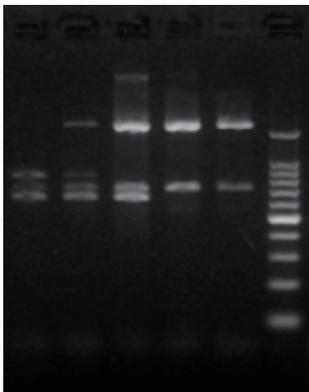
大米提取液的PCR扩增

粗提样品

Multiplex

为了判别品种，以大米（粉末）的粗提液为模板进行了PCR扩增。尝试对5个品种的大米进行了PCR扩增，结果显示可对全部品种进行判别。

1 2 3 4 5 M



模板量: 1 μ l / 20 μ l 反应液
1: 越光米
2: 一目惚米
3: 日光米
4: 秋田小町米
5: 绢光米
M: 100 bp DNA Ladder

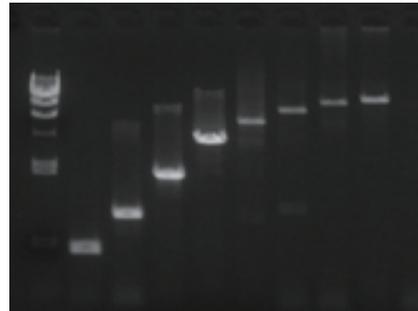
PCR条件
94°C 1 min
↓
98°C 10 sec
60°C 15 sec
68°C 1 min } 30 cycles

人培养细胞Hela悬浊液起始的扩增

粗提样品

长链·短链

M 1 2 3 4 5 6 7 8



模板
HeLa培养细胞悬浊液
(5 μ l / 50 μ l 反应体系)
1: 0.5 kb
2: 1 kb
3: 2 kb
4: 4 kb
5: 6 kb
6: 8.5 kb
7: 12 kb
8: 15 kb
M: λ -Hind III digest

PCR条件 (Lane 1~6)
94°C 1 min
↓
98°C 10 sec
60°C 15 sec
68°C 30 sec/kb } 35 cycles

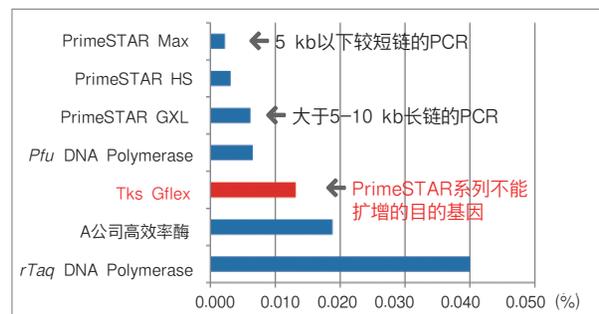
PCR条件 (Lane 7~8)
94°C 1 min
↓
98°C 10 sec
68°C 30 sec/kb } 35 cycles

专栏1.使用Tks Gflex™ DNA Polymerase进行克隆

进行克隆时的PCR反应推荐使用准确性较高的PrimeSTAR系列产品。不过由于目的基因不同，PrimeSTAR可能也会有反应不能顺利进行的现象。此时请尝试使用Tks Gflex™ DNA Polymerase。该酶对于长链·短链、GC rich·AT rich等难扩增的目的基因，都能够特异性良好的进行扩增。

保真性的测量实验（右图）

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，对每种序列挑取多个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）



由于Tks Gflex是以高保真的 α 型聚合酶为基础进行的改良，在维持保真性的同时实现了较高的扩增效率。

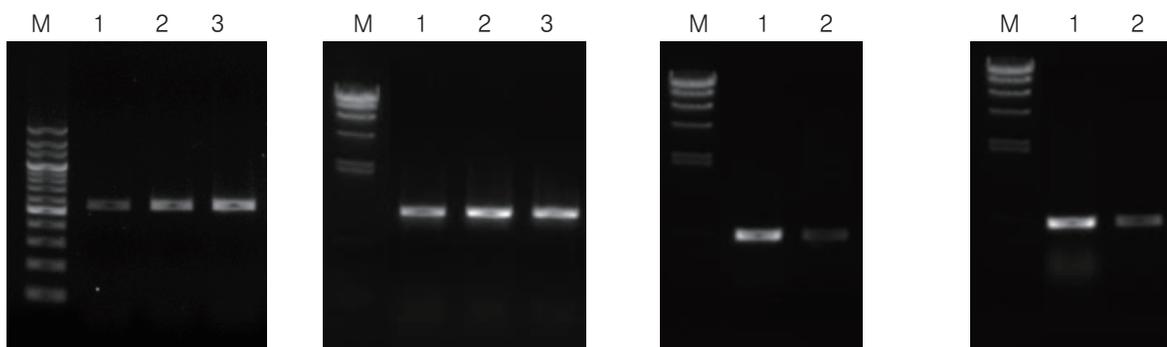
※ 以上数据来源于Takara Bio Inc.

粗提样品起始的PCR实验例 –动物组织–

使用Tks Gflex™可对通过Lysis Buffer简易提取的粗提样品进行高灵敏度且特异性良好的扩增。高通量实验体系也推荐使用。 → (第7页记录了同源重组ES细胞的高通量筛选实验例：用户实验例3)

小鼠组织来源提取液的扩增

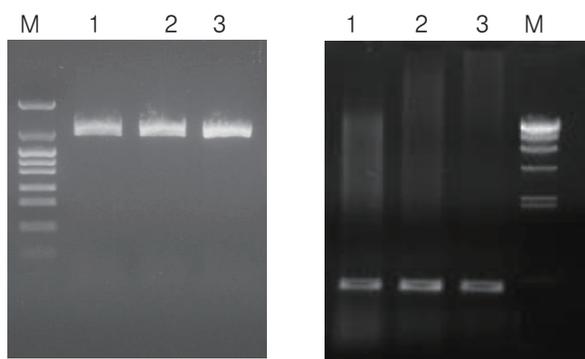
粗提样品



样品	小鼠尾提取液	小鼠脑提取液	小鼠肺提取液	小鼠肝脏提取液
目的基因	<i>Rever2</i> (1.1 kb)	<i>Rever2</i> (1.1 kb)	<i>Hbb-b1</i> (542 bp)	<i>Hbb-b1</i> (542 bp)
模板量 (裂解量 /50ul反应液)	1: 0.8 μ l 2: 2.0 μ l 3: 5.0 μ l M: 200 bp DNA Ladder	1: 2.5 μ l 2: 1.0 μ l 3: 0.4 μ l M: λ - <i>Hind</i> III digest	1: 2.0 μ l 2: 0.4 μ l M: λ - <i>Hind</i> III digest	1: 2.0 μ l 2: 0.4 μ l M: λ - <i>Hind</i> III digest
PCR条件	94°C 1 min ↓ 98°C 10 sec 60°C 15 sec 68°C 1 min 30 cycles	94°C 1 min ↓ 98°C 10 sec 60°C 15 sec 68°C 1 min 30 cycles	94°C 1 min ↓ 98°C 10 sec 60°C 15 sec 68°C 30 sec 30 cycles	94°C 1 min ↓ 98°C 10 sec 60°C 15 sec 68°C 30 sec 30 cycles

其他动物组织来源提取液起始的扩增

粗提样品



样品	果蝇翅提取液	斑马鱼尾提取液
目的基因	<i>Hsf</i> (1,959 bp)	<i>ba1</i> (466 bp)
模板量	1: 0.8 μ l 2: 2.0 μ l 3: 5.0 μ l M: pHY Marker	1: 2.5 μ l 2: 1.0 μ l 3: 0.4 μ l M: λ - <i>Hind</i> III digest
PCR条件	94°C 1 min ↓ 98°C 10 sec 60°C 15 sec 68°C 2 min 35 cycles	94°C 1 min ↓ 98°C 10 sec 60°C 15 sec 68°C 30 sec 30 cycles

※ 以上数据来源于Takara Bio Inc.

专栏2.提取液的配制方法

动物组织
植物组织
食品样品
等等

Lysis Buffer(※) 100 μ l
20 mM Tris-HCl, pH8.0
100 mM NaCl
5 mM EDTA
0.1% SDS



ProteinaseK (※)
(20 mg/ml) 1 μ l

60°C 5分
98°C 2分

室温下轻微离心

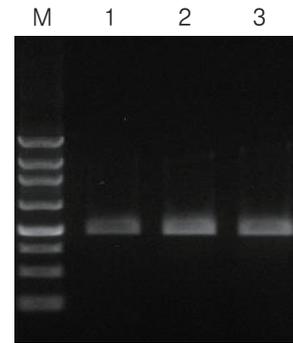
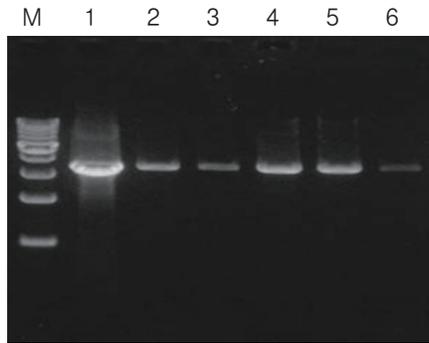
上清(提取液) \leq 2.5ul 至PCR反应

※同时销售制备好的Lysis Buffer。
详细请参考第8页的关联产品。

粗提样品起始的PCR实验例 –植物组织–

植物组织来源提取液的扩增

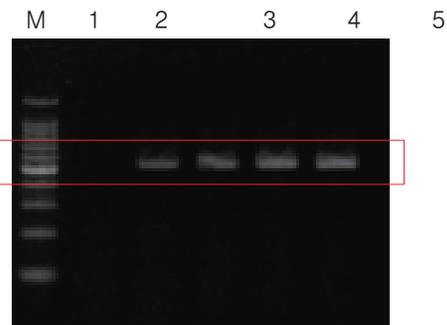
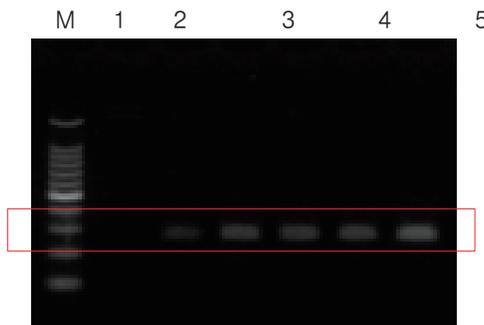
粗提样品



样品	温州蜜桔各部位提取液			番茄叶提取液		
目的基因	<i>Psy1</i> (约3.5 kb)			<i>cox1</i> (1 kb)		
模板量 (裂解液量 /25 μ l反应液)	1: 叶片纯化DNA 2: 叶 (ϕ 2 mm) 裂解液 3: 果皮 (ϕ 2 mm) 裂解液 4: 枝 (1.2 mm) 裂解液	5: 果实 (ϕ 2 mm) 裂解液 6: 薄皮 (ϕ 2 mm) 裂解液 M: 1 kb DNA Ladder 各使用1.25 μ l		1: 0.4 μ l 2: 1.0 μ l 3: 2.5 μ l M: 250 bp DNA Ladder		
PCR条件	94 $^{\circ}$ C 1 min ↓ 98 $^{\circ}$ C 10 sec 60 $^{\circ}$ C 15 sec 68 $^{\circ}$ C 1 min/kb 30 cycles			94 $^{\circ}$ C 1 min ↓ 98 $^{\circ}$ C 10 sec 60 $^{\circ}$ C 15 sec 68 $^{\circ}$ C 1 min 30 cycles		

植物组织来源提取液的扩增：GMO基因的检出

粗提样品



样品	玉米提取液			大豆提取液		
目的基因	<i>m-epsps</i> (除草剂抗性基因)			<i>EPSPS</i> (除草剂抗性基因)		
模板量	1.25 μ l / 25 μ l反应液			1.25 μ l / 25 μ l反应液		
GMO作物 混入率	1: 0 % 2: 0.25 % 3: 0.50 % 4: 0.75 %	5: 1 % 6: 4 % M: 100 bp DNA Ladder		1: 0 % 2: 0.25 % 3: 0.50 %	4: 0.75 % 5: 1 % M: 100 bp DNA Ladder	
PCR条件	94 $^{\circ}$ C 1 min ↓ 98 $^{\circ}$ C 10 sec 60 $^{\circ}$ C 15 sec 68 $^{\circ}$ C 1 min 30 cycles			94 $^{\circ}$ C 1 min ↓ 98 $^{\circ}$ C 10 sec 60 $^{\circ}$ C 15 sec 68 $^{\circ}$ C 1 min 30 cycles		

米提取液起始的Multiplex PCR实验例请详见第3页。

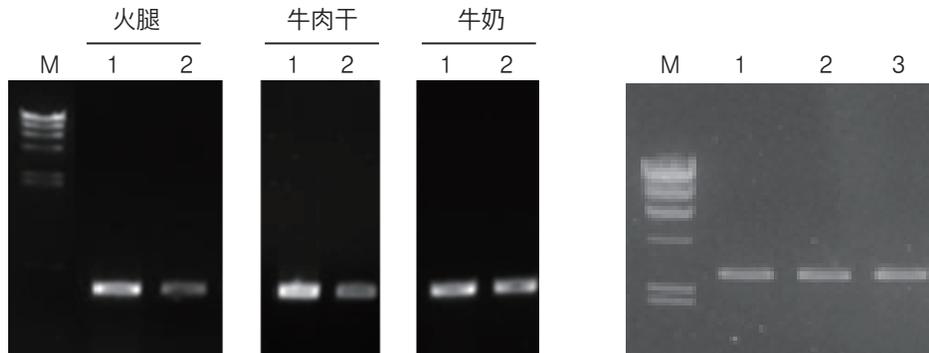
※ 以上数据来源于Takara Bio Inc.

粗提样品起始的PCR实验例 –其他–

Tks Gflex™可使用Lysis Buffer制备的简易提取液，对含有PCR阻害物质的食品样品进行扩增。

不同粗提样品起始的扩增

粗提样品



样品	食品提取液	酵母悬浮液
目的基因	线粒体DNA (478 bp)	RAT1 (2,901 bp)
模板量	1: 2.0 μ l 2: 0.4 μ l M: λ -Hind III digest	1~3: 50 μ l反应体系N=3个克隆PCR M: λ -Hind III digest
PCR条件	94 $^{\circ}$ C 1 min ↓ 98 $^{\circ}$ C 10 sec 60 $^{\circ}$ C 15 sec 68 $^{\circ}$ C 30 sec 30 cycles	94 $^{\circ}$ C 1 min ↓ 98 $^{\circ}$ C 10 sec 60 $^{\circ}$ C 15 sec 68 $^{\circ}$ C 1 min/kb 30 cycles

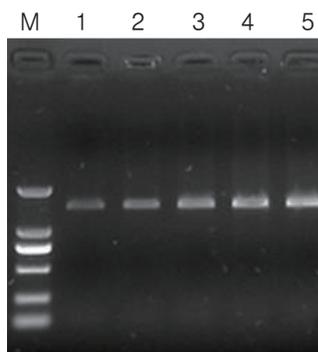
专栏3.使用Tks Gflex™ DNA Polymerase制备NGS文库

能够制备无偏差的文库

进行NGS文库用片段的PCR扩增时，为**降低偏差同时防止嵌合体的生成**，通常是建议**减少循环圈数**。

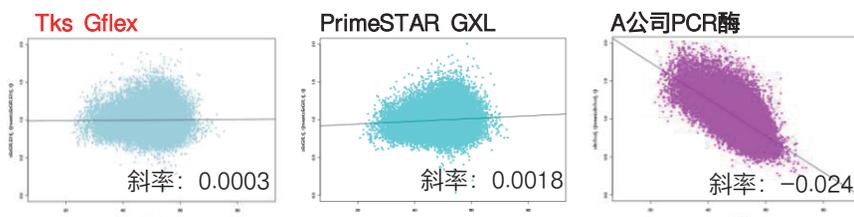
以土壤中的细菌提取的DNA为模板，使用Tks Gflex进行PCR时，显示使用**15个循环**就可以得到足够的扩增产物。

通过减少循环圈数，能够降低扩增偏差。



样品 : 土壤中细菌来源的纯化DNA
扩增长度 : 1,492 bp
模板量 : 1: 25 ng 4: 100 ng
(DNA量 / 25 μ l反应体系) 2: 50 ng 5: 125 ng
3: 75 ng
M: DL2,000 DNA Marker
PCR条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min
↓
94 $^{\circ}$ C 30 sec
55 $^{\circ}$ C 30 sec
72 $^{\circ}$ C 90 sec
↓
72 $^{\circ}$ C 5 min
15 cycles

大肠杆菌基因组文库使用各PCR酶扩增后，使用GA IIx (illumina公司) 进行测序分析。结果显示，与未进行PCR扩增的文库相比，Tks Gflex能够不受GC含量影响对文库进行均一的扩增。



X轴: GC%
Y轴: normalized depth (PCR free)
对象生物: *E. coli*

★ 面向illumina公司MiSeq的16S rRNA细菌丛分析用PCR扩增试剂盒 (Code No. R161A) 也使用Tks Gflex。

HeLa细胞悬浮液起始的PCR实验例请参照第3页。

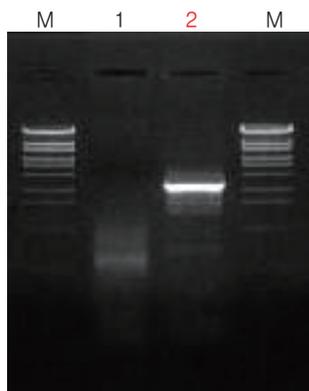
※ 以上数据来源于Takara Bio Inc.

Tks Gflex™ DNA Polymerase 用户实验例

用户实验例-1. 小鼠尾粗提液起始的基因扩增

粗提样品

GC rich · AT rich



1: A公司高效PCR酶
2: Tks Gflex DNA Polymerase
M: λ/Sty I maker

样品 : 小鼠尾粗提液
目的基因 : 未公开
扩增大小 : 约2 kb
GC含量 : GC rich
PCR条件 : 98 °C 10 sec
60 °C 15 sec
68 °C 50 sec } 30 cycles

数据提供:
东京大学医学研究所 炎症免疫学分部
佐藤 慎太郎先生
现隶属大阪大学微生物病研究所·BIKEN下一代疫苗协同研究所·粘膜疫苗项目组。隶属变更后也依然喜欢使用Tks Gflex。

实验结果·感想

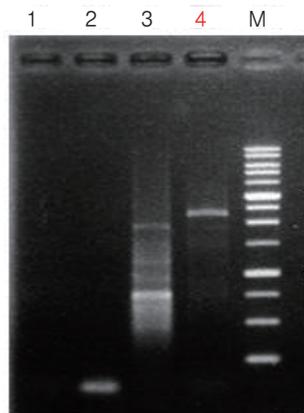
以往使用的是A公司的高效酶,但是由于本次扩增的目的基因GC含量较多,该酶未能很好的扩增。于是尝试使用了Tks Gflex,很好的扩增了目的基因。

▼ Point ! ▼

本次实验例包含了粗提样品和GC rich两个PCR扩增困难因素,只有Tks Gflex成功扩增了目的基因。

用户实验例-2. 水稻Os12g37570基因的克隆

GC rich · AT rich



1: A公司酶 2: B公司酶
3: C公司酶
4: Tks Gflex DNA Polymerase
M: 其他公司1Kb DNA Ladder

样品 : 水稻(日本晴)叶来源cDNA
目的基因 : Os12g37570
扩增片段 : 2,277 bp
GC含量 : 50.5% (局部含连续的GC)
PCR条件 : 94 °C 1 min
98 °C 10 sec
68 °C 2.5 min } 30 cycles
68 °C 5 min

※各酶的推荐反应组中中添加终浓度5%的DMSO。

数据提供:
神戸大学大学院农学研究科
细胞机能控制学研究室
松冈大介先生、高冈翔平先生、南森隆司先生

实验结果·感想

进行Os12g37570基因克隆时总得不到全长的基因,很是烦恼,尝试使用了贵公司的Tks Gflex™ DNA polymerase顺利的克隆了全长,非常感谢。

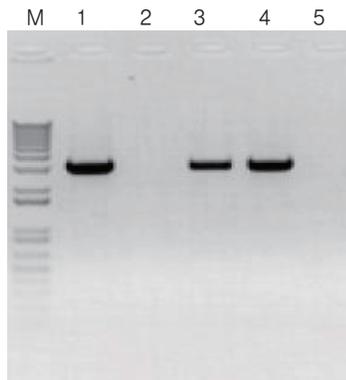
▼ Point ! ▼

目的基因整体的GC含量虽不高,但含有局部GC含量高的序列,扩增全长时也会很困难。Tks Gflex对于含有各种扩增困难因素的目的基因,都能够有效的进行扩增。

用户实验例-3. 使用小鼠ES细胞的粗提样品筛选同源重组的方法

粗提样品

高通量



M: 其他公司wide range DNA Ladder
1~5: 克隆A~E
(其它克隆体结果省略)

样品 : 小鼠ES细胞粗提液
目的基因 : 非公开
扩增片段 : 3,053 bp
GC含量 : 48%
PCR条件 : 94 °C 1 min
98 °C 10 sec
60 °C 15 sec
68 °C 180 sec } 30 cycles

数据提供:
东京大学医学研究所
干细胞治疗研究中心 干细胞治疗分部
水野 直彬先生、山口 智之先生

实验结果·感想

使用Lysis Buffer和Tks Gflex通过crude PCR确认了103个克隆中的10个克隆获得了同源重组ES细胞株

▼ Point ! ▼

进行重组菌株的PCR筛选等高通量的实验反应时,确认各个反应的适宜反应条件不仅费时费力且很困难。Tks Gflex使用相同的条件进行PCR也可以得到稳定的结果,是【不需要确认适宜反应条件】的PCR酶。

参考文献

- **PTB-Associated Splicing Factor (PSF) cDNA克隆用参考文献**
Tsukahara T, Haniu H, and Matsuda Y.
PTB -Associated Splicing Factor (PSF) is a PPAR γ -Binding Protein and Growth Regulator of Colon Cancer Cells. *PLoS One* 2013; **8**:e58749.
- **TCR β 链的再合成分析扩增用参考文献**
Iguchi T, Aoki K, Ikawa T, Taoka M, Taya C, Yoshitani H, Toma-Hirano M, Koizumi O, Isobe T, Kawamoto H, Masai H, and Miyatake S.
BTB-ZF Protein Znf131 Regulates Cell Growth of Developing and Mature T Cells.
J Immunol 2015 Aug 1; **195**(3): 982-993.
- **使用粪便纯化的DNA进行16S rRNA细菌菌丛分析时制备NGS文库用参考文献**
Murakami S, Goto Y, Ito K, Hayasaka S, Kurihara S, Soga T, Tomita M, and Fukuda S.
The Consumption of Bicarbonate-Rich Mineral Water Improves Glycemic Control.
Evid Based Complement Alternat Med. 2015; 2015: 824395
- **使用果蝇肠纯化的DNA进行16S rRNA细菌菌丛分析时制备NGS文库用参考文献**
Sekihara S, Shibata T, Hyakkendani M, and Kawabata SI.
RNA Interference Directed against the Transglutaminase Gene Triggers Dysbiosis of Gut Microbiota in *Drosophila*
J Biol Chem, 2016; **291**(48): 25077-25087
- **使用藻类粗提液进行PCR, 筛选基因编辑株用参考文献**
Nomura T, Sakurai T, Osakabe Y, Osakabe K, and Sakakibara H.
Efficient and Heritable Targeted Mutagenesis in Mosses Using the CRISPR/Cas9 System.
Plant Cell Physiol 2016; **57**(12): 2600-2610. doi: 10.1093/pcp/pcw173

关联产品

产品名称	概要	包装量	Code No.
Tks Gflex™ DNA Polymerase Low DNA	该酶采用特别的精致技术和DNA灭活技术, 能够充分抑制可能成为PCR模板的大肠杆菌及周围环境中的DNA, 是预混型PCR酶。尤其适用于扩增困难的环境来源的基因组的扩增、单细胞起始的PCR扩增。	20 μ l 反应 \times 100 次	R091A
Lysis Buffer for PCR	使用小鼠尾等动物组织或植物组织、加工食品等简便制备粗裂解液的试剂。常用于Tks Gflex用模板裂解液的制备。	20 ml	9170A
Proteinase K	高活性的丝氨酸蛋白酶。	5 ml	9034
16S (V3-V4) Metagenomic Library Construction Kit for NGS	粪便·环境样品起始, 使用illumina公司MiSeq进行16S rRNA细菌丛分析时PCR扩增用试剂盒。以V3-V4区域为对象, PCR酶使用Tks Gflex。	1 Kit	R161A

- 本宣传页上登载的产品, 都是以科研为目的。请不要用于其它方面, 如: 不要用于人、动物的临床诊断和治疗。也不能用于食品、化妆品及家庭用品等方面。
- 未经本公司许可, 严禁产品的转售·转让、以转售·转让为目的的产品更改、以及用于商品的制造。
- 专利许可及注册商标信息请在本公司网站上确认: <http://www.takarabiomed.com.cn/>。
- 本宣传页上登载的公司名称及产品名称即使没有特殊标注, 使用的也是各公司的商标或注册商标。

宝日医生物技术 (北京) 有限公司
Takara Biomedical Technology (Beijing) Co., Ltd.

技术咨询电话: 4006518761 4006518769
E-mail: service@takarabiomed.com.cn

Ver.1 2017年9月印刷 3K