Code No. R011

研究用

TaKaRa

TaKaRa PCR Amplification Kit

说明书

v201908Da

目　　录

内　容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保　　存	2
● 试剂盒之外所需试剂和仪器	2
● 原　　理	2
● 实验操作	3
● 使用注意	4
● Q&A	4
● 参考文献	5

● 制品说明

PCR Amplification Kit 适用于各种 DNA 模板的 PCR 扩增。本试剂盒含有 λ DNA 作为对照模板以及扩增 λ DNA 目的序列用的对照引物（6,012 bp，500 bp）。

● 制品内容（100 μl PCR×100 次或 50 μl PCR×200 次）

TaKaRa Taq™*1（5 U/μl）	50 μl (250 U)
dNTP Mixture*2（各 2.5 mM）	1.28 ml
10×PCR Buffer（Mg^{2+} plus）	1 ml
100 mM Tris-HCl（pH8.9）	
500 mM KCl	
15 mM $MgCl_2$	
10×PCR Buffer（Mg^{2+} Free）	1 ml
100 mM Tris-HCl（pH8.9）	
500 mM KCl	
$MgCl_2$（25 mM）	1 ml
Control Template（1 μg/ml λ DNA）	100 μl
Control Primer 1*3（20 pmol/μl）	50 μl
Control Primer 2*3（20 pmol/μl）	50 μl
Control Primer 3*3（20 pmol/μl）	50 μl
λ-*Eco*T14 I Marker*4（100 ng/μl）	40 μl
6×Loading Buffer*5	1 ml

*1 *TaKaRa Taq* 说明（5 U/μl）

【酶贮存液】

20 mM	Tris-HCl (pH8.0)
100 mM	KCl
0.1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0.5%	Tween 20
0.5%	NP-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℃、pH9.3、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）。

【Reaction mixture】

25 mM	TAPS（pH9.3，25℃）
50 mM	KCl
2 mM	$MgCl_2$
0.1 mM	DTT
200 μM	each dATP·dGTP·dCTP
100 μM	[^{3}H]-dTTP
0.25 mg/ml	activated salmon sperm DNA

*2 dNTP Mixture（各 2.5 mM）

dNTP Mixture 无需稀释，可直接用于 PCR。

Form：溶于水（含钠盐），pH7-9

纯度：每种 dNTP≥98%

*3 Control Primer 序列

引物名称	各引物序列
Control Primer 1	5′-GATGAGTTCGTGTCCGTACAACT-3′
Control Primer 2	5′-CCACATCCATACCGGGTTTCAC-3′
Control Primer 3	5′-GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGCC-3′

* 使用 Control Primer 1、2 时，可以扩增 Control Template（λ DNA)的 6,012 bp DNA 片段。
使用 Control Primer 1、3 时，可以扩增 Control Template（λ DNA)的 500 bp DNA 片段。

*4 λ-*Eco*T14 I Marker

此 marker 是用限制性内切酶 *Eco*T14 I 分解 λ *cI*857 Sam7 DNA 得到的。由 DNA 片段 19,329 bp；7,743 bp；6,223 bp；4,254 bp；3,472 bp；2,690 bp；1,882 bp；1,489 bp；925 bp；421 bp；74 bp 等组成。由于 λ DNA 分解的末端片段与 COS end 相连，需加热处理（60℃，5 min）。

*5 6×Loading Buffer 的组成

36%	甘油
30 mM	EDTA
0.05%	溴酚兰
0.035%	二甲苯青

● 保　　存：-20℃

● 试剂盒之外所需试剂和仪器

-琼脂糖凝胶：PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A)
Agarose L03 [TAKARA] (Code No. 5003)

-DNA 染色试剂：SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (Code No. 5760A/5761A) 或 Ethidium Bromide
注意：当使用 SYBR® Green I 给凝胶染色时，需使用特定的过滤装置。

-灭菌水

-PCR 仪器：如 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient (Code No. TP600)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice *Touch* (Code No. TP350)

-0.2 ml Microtubes：0.2ml Single-Tube Dome Cap (Code No. NJ204)
（聚丙烯材料）　0.2 ml 96 well-plate for Real Time (Frosted) (Code No. NJ401)
Flat cap for snap plate (Code No. NJ720)

-琼脂糖凝胶电泳仪器：Mupid-2 plus, Mupid-exU, Mupid-One (Mupid CO., LTD)

-Microcentrifuge

-移液枪和枪头（灭菌处理）

● 原　　理

PCR（Polymerase Chain Reaction）法是一种简单高效的体外扩增 DNA 的方法。它通过以下不同温度下三个步骤进行：

1. DNA 链的热变性（Denaturation step）；
2. 引物退火（Annealing step）；

3. 聚合酶作用下引物的延伸（Extension step）。

一组连续 3 个步骤为一个周期。PCR 过程即在周期循环的基础上扩增 DNA 片段。PCR Amplification Kit 的主要组成是 *TaKaRa Taq* (Code No. R001)。*TaKaRa Taq* 是一种 94 kDa 的高纯度耐热性 DNA 聚合酶，是把 *Thermus aquaticus* YT-1 株的 DNA Polymerase 基因在大肠杆菌中表达后，分离提取得到的，与野生型 DNA Polymerase 具有相同的功能。

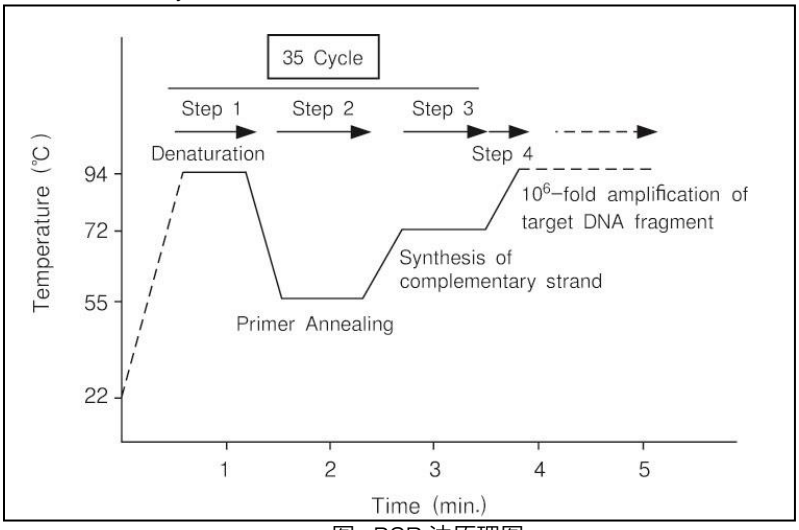

图. PCR 法原理图

Step 1：在含有引物、dNTP 及 DNA 聚合酶的反应液中双链 DNA 热变性（94℃、30 sec）；

Step 2：引物与热变性生成的单链 DNA 退火（55℃、30 sec）；

Step 3：在 DNA 聚合酶作用下合成互补链（72℃、1 min）；

Step 4：扩增的双链 DNA 再次热变性生成单链 DNA（返回 Step 1）；

Step 1～4：称为一个循环，如此循环往复 35 次。根据目的 DNA 片段不同，最优的 PCR 反应条件不同。

● 实验操作

使用 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice 为例。

A. Control 实验

本试剂盒中含有 λ DNA 以及扩增 λ DNA 的 6,012 bp 和 500 bp 目的片段的引物。

1. 按下列组成配制 PCR 反应液 50 μl。

试剂	使用量	终浓度
10×PCR Buffer (Mg^{2+} plus)*	5 μl	[1×]
dNTP Mixture	4 μl	each 200 μM
Control Primer 1	0.5 μl	0.2 μM
Control Primer 2 或 3	0.5 μl	0.2 μM
TaKaRa Taq	0.25 μl	1.25 U/50 μl
Control Template	0.5 μl	0.5 ng/50 μl
灭菌水	39.25 μl	
Total	50 μl	

*：根据需要，可使用 10×PCR Buffer（Mg^{2+} Free）和 $MgCl_2$ 溶液代替 10×PCR Buffer (Mg^{2+} plus)。

2. 将 microtube 放入仪器。

3. 按以下条件进行 PCR 反应。

【使用 Control Primer 1、2 时（扩增 6,012 bp DNA 片段）】

94℃　1 min（变性）
68℃　4 min （退火和延伸）　30 cycles
72℃　5 min　1 cycle

【使用 Control Primer 1、3 时（扩增 500 bp DNA 片段）】

94℃　30 sec（变性）
55℃　30 sec（退火）　25 cycles
72℃　30 sec（延伸）
72℃　2 min　1 cycle

B. 样品实验

实验过程与 A 中所述的实验过程基本相同。根据 DNA 片段大小、序列和引物长度不同，每一步的反应参数（温度、时间）也不同。

C. 电泳

1） 取 5～10 μl 反应液中加入 1/6 体积的 6×Loading buffer。
2） 进行琼脂糖凝胶电泳。琼脂糖凝胶的条件，需根据 DNA 片段的大小适当选择使用。
3） 电泳后，用 GelStar、SYBR® Green I 或 Ethidium Bromide solution (1 μg/ml) 染色 20–30 min。
4） 紫外观察扩增的 DNA 条带。

● 使用注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前一定认真阅读。

① 试剂盒中的各组份，要仔细混匀后使用，但 *TaKaRa Taq* 要避免剧烈操作。
② 因为样品 DNA 的提取方法不同，10×PCR Buffer (Mg^{2+} plus)中的 Mg^{2+}浓度可能并非最适浓度，此时可使用 10×PCR Buffer (Mg^{2+} Free)和 $MgCl_2$，调整 PCR 反应液的适合的 Mg^{2+}浓度。

● Q&A

1. PCR 优化

适合的反应条件根据扩增大小、反应体积、PCR 仪器类型等的不同而不同。

1）循环数

根据模板 DNA 的数量及复杂程度和扩增 DNA 片段的长度，理想的循环数为 25–30 次。减少循环次数可能不能形成足够扩增产物，循环次数过多则可能在电泳时得到弥散条带。

2）变性条件

当使用薄壁 PCR tube 时，推荐设定 98℃ 10 sec 或 94℃ 20 sec。当使用普通 PCR microtube 时，推荐设定 98℃ 20 sec 或 94℃ 30 sec。变性时间过短或变性温度过低可能导致电泳弥散或扩增效率低。变性时间过长或变性温度过高可能得到非目的条带。

3）退火及延伸条件

37℃–65℃范围内以 2℃梯度变化设定退火温度。由于 *TaKaRa Taq* 在 60℃–68℃显出活性，Shuttle PCR (Two Temperature PCR)可在此范围内设定退火–延伸温度。进行 68℃二步法 PCR 的退火和延伸时，建议时间设定为每 kb 30 sec 至 1 min。当温度低于 68℃时，适当延长时间。退火温度过高不能获得产物，温度过低则非特异性反应增强。延伸时间太短不能产生扩增产物或出现非特异性的较短产物。同时，延伸时间过长导致电泳带弥散。

2. 制备引物

引物的特异性对于扩增较长 DNA 片段很重要。尽量按下列标准设计引物。

1）两条引物的退火温度差需在 2–3℃内。

2）CG 含量 50–60%。

3）避免引物形成发夹结构或引物二聚体，尤其是 3’末端。

3. 引物浓度

适合浓度为 0.1 μM–1.0 μM。低于适合浓度，扩增产量低。另一方面，高于适合浓度，非特异性反应可能多于引物特异性扩增。在普通操作中，引物浓度根据模板 DNA 特点和数量而定：较复杂的 DNA 如人类基因组 DNA 或高模板 DNA 数量时，建议采用低引物浓度。相反，较简单的 DNA 如质粒 DNA 或低模板 DNA 数量时，建议采用高引物浓度。

4. 酶量

虽然 50 μl 反应推荐使用 1.25 U *TaKaRa Taq*，也可根据最适反应条件做适当改变。改变酶量考虑以下因素：模板 DNA 数量、长度以及扩增 DNA 片段长度。酶过多可能会发生非特异性反应，导致电泳弥散。低酶量可能降低扩增效率。

5. 扩增产物电泳弥散

可能原因	解决方法
酶量过多	以 0.5 U 梯度减少酶量
变性时间过短	以 5 sec 梯度延长变性时间
变性温度过低	以 0.5℃梯度升高变性温度
dNTP 浓度过低	以 50 μM 梯度增加 dNTP 浓度
延伸时间过长	以 30–60 sec 梯度递减
PCR 循环次数过多	以 2 cycles 梯度减少循环次数
模板量过多	以 20%梯度减少模板数量

6. 电泳产生多个非特异性产物

可能原因	解决方法
引物浓度过高	以 0.1 μM 梯度降低引物浓度
引物设计不合理	通过改变特异性区域或延长引物长度 25–30 mer 来增强引物特异性
酶量过多	以 0.5 U 梯度减少酶量
循环次数过多	以 2 cycles 梯度减少循环次数
退火温度过低	以 2℃梯度降低退火温度
引物非特异性退火	从室温加热至变性温度（94–98℃）时，使用 Hot Start method 如应用 Taq Antibody (Code No. 9002)来避免此现象
延伸时间过短	延伸时间以 30–60 sec 梯度递增
变性不完全	以 0.5℃梯度增加变性温度并以 5 sec 梯度延长变性时间
模板量过多	以 20%梯度减少模板数量

● 参考文献

1) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. *Science*. (1988) **239**: 487–491.

2) Scharf, S. J., Horn, G. T., and Erlich, H. A. *Science*. (1986) **233**: 1076–1078.

3) Gyllensten, U. B. and Erlich, H. A. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1988) **85**: 7652–7656.

4) Kawasaki, E. S., Clark, S. C., Coyne, M. Y., Smith, S. D., Champlin, R., Whitte, O. N., and McCormick, F. P. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1988) **85**: 5698–5702.

5) Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K. B., Drummond, R., and Gelfand, D. H. *J Biol Chem*. (1989) **264**: 6427–6437.

SYBR is a registered trademark of Life Technologies Corporation.
TaKaRa Taq, PrimeGel, 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