

Code No. R091A

研究用

Takara

Tks Gflex™ DNA
Polymerase Low DNA

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	2
● 扩增产物的 Agarose Gel 电泳、克隆和测序	2
● Troubleshooting	3
● Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA 的特点和实验例	3
● 关联产品	6

● 制品说明

本制品是预混型 PCR 酶，采用 Takara 特别研发的精制技术及 DNA 失活技术，可很好地抑制制品中大肠杆菌来源的 DNA 和环境中混入的 DNA 污染。本制品是在 PCR 扩增效率很高的 Tks Gflex DNA Polymerase 基础上改良，对微量模板进行低背景、特异地高灵敏度扩增。另外，本制品是一种 Hot Start 型聚合酶，室温条件下，单克隆抗体与酶结合，抑制聚合酶活性和 3' → 5' Exonuclease 活性。本制品适用于难以扩增的环境宏基因组、单细胞和无偏好性文库等难度高、要求解析准确性高的 PCR 扩增。

本制品将含酶、反应 Buffer 和 dNTP 的 2X Premix 分装成制品包装后，在关闭管盖状态下对溶液内残留的微量 DNA 进行失活处理。建议在洁净的环境下进行反应管的开闭及反应液的配制。

● 制品内容 (20 μl 反应×100 次)

Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA (2X)*	200 μl×5
dH ₂ O for Low DNA	200 μl×5

*: 2 mM Mg²⁺ (2X); dNTP (2X)各 400 μM。混合液呈现淡粉色，不影响试剂性能。

● 保存: -20°C

● 操作流程

按照下列组份配制PCR反应液
酶等各种试剂在配制前请于冰上放置。

试剂	使用量	终浓度
Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA (2X)	10 μl	1X ^{*1}
Template	<200 ng	
Primer 1	4-6 pmol	0.2-0.3 μM ^{*2}
Primer 2	4-6 pmol	0.2-0.3 μM ^{*2}
dH ₂ O for Low DNA	up to 20 μl	
Total	20 μl	

* 1: Mg²⁺ 1 mM, dNTP 各 200 μM

* 2: 扩增 10 kb 以上长片段时，以终浓度 0.2 μM 进行反应。

当使用简并引物时，以终浓度 ≥ 0.6 μM 进行反应。

PCR 反应条件

推荐三步法 PCR

94°C	1 min ^{*1}	
↓		
98°C	10 sec	} 30-35 cycles ^{*3}
55-60°C ^{*2}	15 sec	
68°C	60 sec/kb	

* 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: 由于反应体系采用了高特异性的缓冲液，因此退火温度高于60°C时，不能获得良好的实验结果。
在标准PCR反应条件下即可进行特异性扩增。

* 3: 当模板量低时，适当增加循环数。

注意：如果没有获得扩增产物或有smear及非特异性扩增产物，请查看Troubleshooting。

● 关于模板

推荐使用的模板 DNA 和 cDNA 量如下。

人基因组DNA	1 copy (~4 pg) – 200 ng
大肠杆菌基因组DNA	1 copy (~5 fg) – 100 ng
质粒DNA*	1 copy – 10 ng
cDNA	相当于反转录反应时的 total RNA 10 pg – 300 ng

*: 扩增少量质粒 DNA (1 copy) 时, 请使用线性质粒 DNA。

注意: 亚硫酸氢盐处理的 DNA 或其他含有尿嘧啶的 DNA 为模板时, 不能使用本制品。

● 参数优化

为了发挥 Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA 的最大性能、获得良好的 PCR 扩增结果, 有必要设定适宜反应参数。

(1) 引物设计

请选择具有相近 Tm 值的上下游引物, 最好利用专业引物设计软件进行设计, 选择适宜引物序列。

*: $T_m (^{\circ}C) = [(the\ number\ of\ A\ and\ T) \times 2] + [(the\ number\ of\ G\ and\ C) \times 4] + 35 - 2 \times total\ nt\ number$

【扩增片段 ≤ 10 kb 时】

一般引物长度为 20~25 mer 即可获得良好的扩增, 当引物 Tm 值在 55°C (使用上述公式计算) 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 kb 时】

建议引物 Tm 值在 65°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 Tm 值在 60°C 以上。

注意: 使用 Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA 时, 避免使用含次黄嘌呤核苷碱基 (Inosine) 的引物。

【In-Fusion® primers】

如果 PCR 产物用于 In-Fusion 克隆试剂盒 (Cat. #638909, etc.) 时, 请设计 In-Fusion 引物。设计的引物 5' 末端带有与载体 5' 末端互补的 15 个碱基, 在引物的 3' 末端设计目的基因的特异性序列。引物的特异性序列部分的 Tm 在 55°C 以上, 可提高 PCR 扩增成功率。

(2) dNTP 与 Mg²⁺

Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA 含有反应最适的 Mg²⁺ 和 dNTP, 配制反应液更简便。

● 扩增产物的 Agarose Gel 电泳、克隆和测序

(1) 扩增产物的 Agarose Gel 电泳

使用 Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA 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 Low DNA 获得的 PCR 扩增产物大部分为平滑末端, 因此不能直接用于 TA 克隆。建议使用可在任意载体的任意位置定向插入的 In-Fusion 克隆 (In-Fusion 引物请参考“参数优化”)。必要时进行磷酸化反应, 可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、使用NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.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 Low DNA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。

(4) 直接测序时

由于Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA具有3' → 5' 外切酶活性，因此，扩增产物直接测序前，建议进行苯酚/氯仿处理、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250) 等除去蛋白质。

● Troubleshooting

现象	问题点	对策
无扩增产物或 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	以终浓度在 0.3 μM 以上进行 PCR 反应
	延伸时间	延长延伸时间
	循环圈数	增加循环圈数
	模板纯度和量	使用适量的模板 DNA； 提高 DNA 纯度。
出现杂带或 Smear	引物 Tm 值	参考：参数优化 (1) 引物设计
	退火温度	每间隔 2°C升高温度； 每间隔 2°C降低温度。
	引物浓度	以终浓度 0.2 μM 进行 PCR 反应
	循环圈数	减少循环圈数
	模板纯度	重新纯化 DNA
阴性反应有 扩增产物	引物污染*	重新合成引物； 进行 HPLC 精制。
	实验环境	在洁净的环境下进行操作。

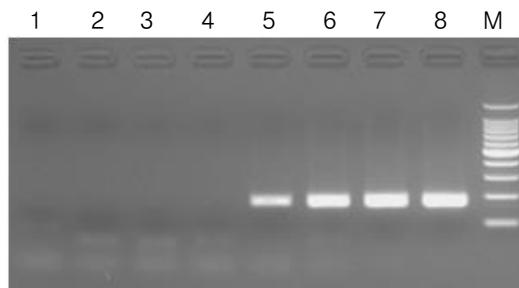
*: 引物中可能混入了环境中的DNA。

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

A. 大肠杆菌基因组污染的检测

PCR酶中大肠杆菌来源的DNA和环境中混入的DNA污染，会导致假阳性结果或出现No template control扩增。Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA (2X)和dH₂O for Low DNA都通过Takara Bio公司特有的DNA失活处理技术去除了DNA污染。因此，本制品能够最大限度抑制可作为PCR模板的混入DNA，使用本制品和在环境微生物16S rDNA保守区设计的引物进行40 cycles的PCR扩增，比较结果。(扩增片段大小为173 bp)。在不添加模板时，没有扩增产物；在添加了大肠杆菌基因组DNA 5 fg (相当于1 cell) 的扩增反应中，获得了良好的扩增结果。

因此使用本制品可抑制混入DNA的扩增，只对检测样品进行扩增，可准确进行检测。



Lanes 1 - 4: 不添加模板
 5: 大肠杆菌基因组 相当于1 cell
 6: 大肠杆菌基因组 相当于10 cell
 7: 大肠杆菌基因组 相当于100 cell
 8: 大肠杆菌基因组 相当于1,000 cell
 M: 100 bp DNA Ladder

PCR反应条件

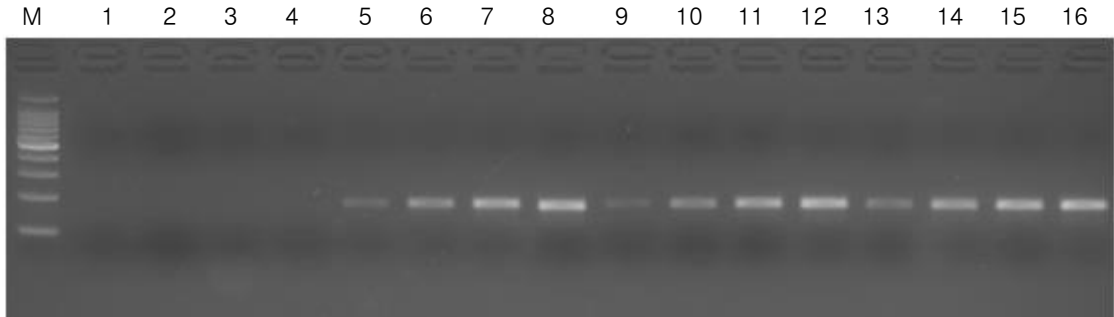
98°C 10 sec
55°C 15 sec
68°C 10 sec

} 40 cycles

B. 高灵敏度检出

Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA 在反应液中添加了 Takara Bio 公司特有的提高灵敏度的组份，即便是少量模板，也能够高灵敏度地扩增。

使用18S rDNA的保守区设计的引物进行40 cycles的PCR扩增。(扩增片段大小为179 bp)。以相当于1 cell的人、小鼠和鲑鱼基因组DNA为模板，都能够获得良好的扩增结果，足以证明本制品适用于普通PCR酶难以扩增的单细胞PCR扩增。



Lanes	1 - 4:	不添加模板	
	5:	人基因组 DNA	相当于 1 cell
	6:	人基因组 DNA	相当于 10 cell
	7:	人基因组 DNA	相当于 100 cell
	8:	人基因组 DNA	相当于 1,000 cell
	9:	小鼠基因组 DNA	相当于 1 cell
	10:	小鼠基因组 DNA	相当于 10 cell
	11:	小鼠基因组 DNA	相当于 100 cell
	12:	小鼠基因组 DNA	相当于 1,000 cell
	13:	鲑鱼基因组 DNA	相当于 1 cell
	14:	鲑鱼基因组 DNA	相当于 10 cell
	15:	鲑鱼基因组 DNA	相当于 100 cell
	16:	鲑鱼基因组 DNA	相当于 1,000 cell
	M:	100 bp DNA Ladder	

PCR反应条件

98°C 10 sec
55°C 15 sec
68°C 10 sec

} 40 cycles

C. 高反应成功率

本制品能够对普通 PCR 酶难以扩增的 GC-Rich 及 AT-Rich 模板进行高成功率的扩增。

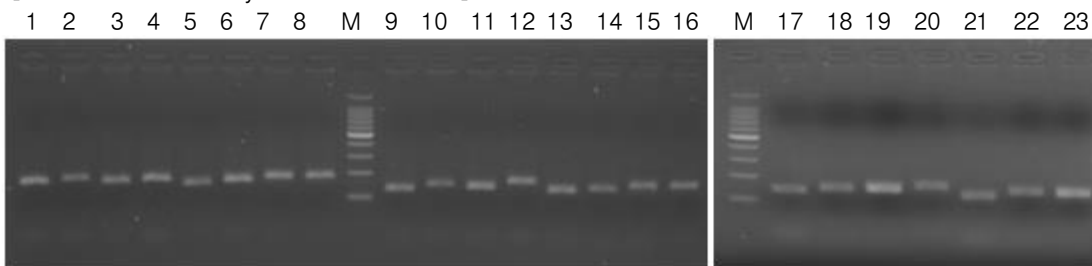
另外，采用特异性强的缓冲液系统，可以在一定的 PCR 条件下对各种目的基因进行扩增。

使用 Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA 和其他公司酶对 GC 含量不同的 23 种目的基因进行 PCR 扩增。

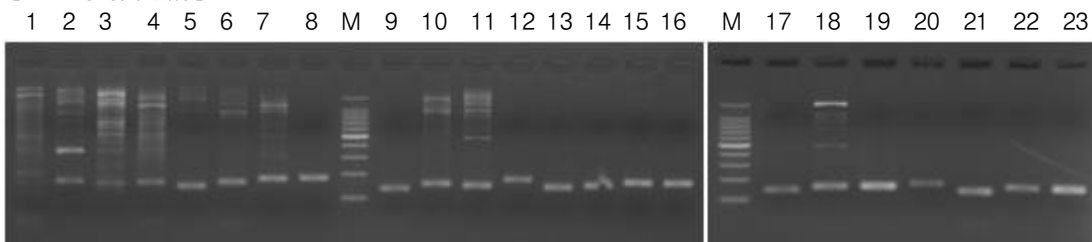
Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA 采用三步法 PCR 条件，对所有目的基因均可获得特异性扩增产物。

同其他公司酶相比，可获得更高特异性的良好扩增结果。

【Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA】



【K 公司的高效酶】



【L 公司的 Low DNA 酶】



模板：人基因组 DNA，2 ng/20 μl 反应体系

PCR 条件：每种酶的推荐条件

Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA PCR 条件：30 cycles (98°C, 10 sec; 55°C, 15 sec; 68°C, 10 sec)

Lane	GC 含量	片段大小	Lane	GC 含量	片段大小	Lane	GC 含量	片段大小
1:	81.3%	144 bp	9:	61.8%	131 bp	17:	38.4%	146 bp
2:	77.7%	157 bp	10:	57.6%	151 bp	18:	39.4%	160 bp
3:	80.6%	144 bp	11:	63.7%	143 bp	19:	38.1%	160 bp
4:	69.5%	154 bp	12:	52.9%	170 bp	20:	33.0%	176 bp
5:	70.1%	137 bp	13:	50.0%	138 bp	21:	29.8%	141 bp
6:	70.3%	155 bp	14:	50.0%	146 bp	22:	32.1%	162 bp
7:	65.9%	170 bp	15:	47.0%	164 bp	23:	29.4%	160 bp
8:	58.2%	177 bp	16:	40.0%	165 bp	M:	100 bp DNA Ladder	

● 关联产品

TaKaRa Taq[™] HS Low DNA (Code No. R090A)
Tks Gflex[™] DNA Polymerase (Code No. R060A/B)
PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase (Code No. R050A/B)
PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (Code No. R045A)
PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (Code No. R010A/B)
PrimeSTAR[®] HS (Premix) (Code No. R040A)
MightyAmp[™] DNA Polymerase Ver.3 (Code No. R076S/A)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[™] *Touch* (Code No. TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[™] Gradient (Code No. TP600)
In-Fusion[®] HD Cloning Plus (Code No. 638909, etc.)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt end) (Code No. 6027)
Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR[®] (Code No. 6019)
NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250)

PrimeSTAR is a registered trademarks of Takara Bio Inc.

In-Fusion is a registered trademark of Takara Bio USA, Inc.

TaKaRa Taq, MightyAmp, 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.takarabio.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>