Code No. RR013A

研究用

TaKaRa

# TaKaRa LA PCR™ Kit Ver.2.1

说明书

v201908Da

# 目　　录


| 内　容 | 页 码 |
| --- | --- |
| ● 制品说明 | 1 |
| ● 制品内容 | 1 |
| ● 试剂盒外必备的试剂和仪器 | 2 |
| ● 保　　存 | 2 |
| ● 操作方法 | 3 |
| ● 实验例 | 4 |
| ● 使用注意 | 6 |
| ● Q&A | 6 |
| ● 参考文献 | 10 |
| ● 关联产品 | 11 |

## ● 制品说明

本试剂盒应用了特别的 LA PCR（Long and Accurate PCR）技术，适用于正确地扩增长链 DNA 片段。使用 *TaKaRa LA Taq*®并搭配专用的反应缓冲液（10×LA PCR Buffer II），可得到更长更准确的扩增产物。以λ DNA 为模板，扩增产物可达 48 kb；以基因组 DNA 为模板，扩增产物可达 30 kb。

本试剂盒包含所有适合 LA PCR 反应的必要试剂，以达到高效扩增、准确地获得长链 PCR 产物。LA PCR 技术扩大了 PCR 技术的应用范围，并在推动基因组分析的方方面面体现着特殊价值。本试剂盒同样适用于短链目的产物的扩增。此外，本制品中还配备了扩增高 GC 含量模板专用的 Buffer（2×GC Buffer I、II），可以对具有复杂二级结构（GC rich）的模板进行高效扩增。

## ● 制品内容（50 μl 的 PCR 反应体系；50 次量）

| | |
|---|---|
| 1. *TaKaRa LA Taq*[*1]（5 U/μl） | 125 U |
| 2. dNTP Mixture[*2]（各 2.5 mM） | 400 μl |
| 3. 10×LA PCR Buffer II（$Mg^{2+}$ plus；$Mg^{2+}$浓度 25 mM） | 250 μl |
| 4. 10×LA PCR Buffer II（$Mg^{2+}$ free） | 250 μl |
| 5. $MgCl_2$（25 mM） | 500 μl |
| 6. Control Template（100 ng/μl）[*2] | 10 μl |
| 7. Control Primer LA3[*4]（10 μM） | 10 μl |
| 8. Control Primer LA4[*4]（10 μM） | 10 μl |
| 9. λ-*Hin*d III digested MW Marker[*5]（100 ng/μl） | 20 μl |
| 10. 2×GC Buffer I（$Mg^{2+}$ plus；$Mg^{2+}$浓度 5 mM）[*3] | 1.25 ml |
| 11. 2×GC Buffer II（$Mg^{2+}$ plus；$Mg^{2+}$浓度 5 mM）[*3] | 1.25 ml |
| 12. Control Primer GC1[*4]（10 μM） | 10 μl |
| 13. Control Primer GC2[*4]（10 μM） | 10 μl |

＊1 *TaKaRa LA Taq* 酶说明

【浓度】

5 U/μl

【组份】

20 mM Tris-HCl（pH8.0），100 mM KCl，0.1 mM EDTA，1 mM DTT，0.5% Tween20，0.5% NP-40，50%甘油。

【活性定义】

用活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物，在 74℃、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）。

【活性测定的反应混合液】

| | |
|---|---|
| 25 mM | TAPS（pH9.3 at 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 用于 PCR 的 dNTP Mixture 使用前无需稀释

浓度：各 2.5 mM

状态：溶解于水（钠盐），pH7-9

纯度：每种 dNTP≥98%

＊3 GC Buffer 的使用

当扩增高 GC 含量或复杂的立体结构 DNA 片段时，请先使用 2×GC Buffer I。当使用 2×GC Buffer I 不能扩增时，再试用 2×GC Buffer II。

＊4 Control Primer 序列

| 引物名称 | 各引物序列 |
|---|---|
| Control Primer LA3 | 5’-ACATGATTAGCAAAAGGGCCTAGCTTGGACTCAGA-3’ |
| Control Primer LA4 | 5’-TGCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC-3’ |
| Control Primer GC1 | 5’-GAGGGGACCGGGGAACAGAG-3’ |
| Control Primer GC2 | 5’-GAACAGTCCGTCACTTCACGTG-3’ |

Control Primer LA3 和 Control Primer LA4 可以扩增 Control Template 的 17.5 kb 片段。
Control Primer GC1 和 Control Primer GC2 可以扩增 Control Template 的高 GC 含量区域的 1,255 bp 片段。

＊5 λ-*Hin*d III digest MW Marker

Marker 大小范围：23,130；9,416；6,557；4,361；2,322；2,027；564；125 bp。

## ● 试剂盒外必备的试剂和仪器

**试剂：**

1. 琼脂糖凝胶
   如 PrimeGel™ Agarose LE 1-20K（Code No. 5800A）
   PrimeGel Agarose GOLD 3-40K（Code No. 5802A）
2. DNA 染色剂
   Ethidium Bromide
3. 6×Loading Buffer，包含 36% 甘油，0.035% Xylene Cyanol，0.05% 溴酚蓝，30 mM EDTA。
4. 灭菌水
5. 上下游引物

**仪器：**

1. PCR 仪器
   TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Touch（Code No. TP350）
   TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient（Code No. TP600）
2. Microcentrifuge tubes（聚丙烯材料）
3. 琼脂糖凝胶电泳装置
4. Microcentrifuge
5. Micropipets and pipette tips（高压灭菌）

## ● 保　存：　-20℃。

## ● 操作方法

1. 长链 DNA 片段扩增

以 Control Template（HL60 基因组 DNA）为模板，Control Primer LA3/Control Primer LA4 为引物，扩增 Control Template 的 17.5 kb 的 DNA 片段。

① 在反应管中按下列组成配制 LA PCR 反应液，总体积 50 μl。

【使用 10× LA PCR Buffer II（$Mg^{2+}$ plus）】

| 试剂 | 使用量 | 终浓度 |
|---|---|---|
| *TaKaRa LA Taq* | 0.5 μl | 2.5 U/50 μl |
| 10×LA PCR Buffer II（$Mg^{2+}$ plus） | 5 μl | [1×] |
| dNTP Mixture | 8 μl | each 400 μM |
| Template*1 | <1 μg | |
| Primer 1*2 | 10–50 pmol | 0.2–1.0 μM |
| Primer 2*2 | 10–50 pmol | 0.2–1.0 μM |
| 灭菌水 | up to 50 μl | |

【使用 10× LA PCR Buffer II（$Mg^{2+}$ free）】

| 试剂 | 使用量 | 终浓度 |
|---|---|---|
| *TaKaRa LA Taq* | 0.5 μl | 2.5 U/50 μl |
| 10×LA PCR Buffer II（$Mg^{2+}$ free） | 5 μl | [1×] |
| 25 mM $MgCl_2$ | 5 μl | 2.5 mM |
| dNTP Mixture | 8 μl | each 400 μM |
| Template*1 | <1 μg | |
| Primer 1*2 | 10–50 pmol | 0.2–1.0 μM |
| Primer 2*2 | 10–50 pmol | 0.2–1.0 μM |
| 灭菌水 | up to 50 μl | |

＊1：Control 实验中，Control Template 添加量为 2 μl (200 ng)。

＊2：使用 Control Template 时，Control Primer LA3 和 LA4 的使用量为各 1 μl (终浓度 0.2 μM)。

② 按以下条件进行 PCR 反应。

98℃ 10 sec. *3（变性）
68℃ 30 sec. ～1 min./kb *4（退火和延伸）
] 30 cycles

＊3：变性条件因 PCR 仪器和反应管的不同而异。建议设定 98℃ 5–10 sec 或 94℃ 20–30 sec。

＊4：退火和延伸时间因扩增片段的不同而异。建议设定 30 sec –1 min/kb。若使用 Control Primer LA3 和 LA4，最适时间为 15 min.。

③ 反应结束后，取 5～10 μl PCR 反应液进行琼脂糖凝胶电泳，确认 PCR 扩增产物。

2. 高 GC 含量 DNA 片段扩增

以 Control Template（HL60 基因组 DNA）为模板，Control Primer GC1/Control Primer GC2 为引物，扩增 Control Template 高 GC 含量区域的 1,255 bp 片段（GC 含量 65%）。

① 在反应管中按下列组成配制 LA PCR 反应液，总体积 50 μl。

| 试剂 | 使用量 | 终浓度 |
|---|---|---|
| *TaKaRa LA Taq* | 0.5 μl | 2.5 U/50 μl |
| 2×GC Buffer I 或 2×GC Buffer II*1 | 25 μl | [1×] |
| dNTP Mixture | 8 μl | each 400 μM |
| Template*2 | <1 μg | |
| Primer 1*3 | 10–50 pmol | 0.2–1.0 μM |
| Primer 2*3 | 10–50 pmol | 0.2–1.0 μM |
| 灭菌水 | up to 50 μl | |

＊1：首先使用 2× GC Buffer I。如果没有获得扩增产物，使用 2× GC Buffer II 可能会改善结果。

＊2：Control 实验中，Control Template 添加量为 2 μl (200 ng)。

＊3：使用 Control Template 时，Control Primer GC1 和 GC2 的使用量为各 1 μl (终浓度 0.2 μM) 。

② 按以下条件进行 PCR 反应。

94℃ 1 min.

94℃ 30 sec*4 ┐
60℃ 30 sec ├ 30 cycles
72℃ 1 min/kb*4 ┘

72℃ 5 min

＊4：变性条件因 PCR 仪器和反应管的不同而异。建议设定 98℃ 5–10 sec 或 94℃ 20–30 sec。

＊5：延伸时间因扩增片段的不同而异。建议设定 1 min/kb。若使用 Control Primer GC1 和 GC2，最适时间为 2 min.。

③ 反应结束后，取 5～10 μl PCR 反应液进行琼脂糖凝胶电泳，确认 PCR 扩增产物。

3. 电泳

1）取 5～10 μl PCR 扩增样品，加入其 1/5 量的 6 × Loading Buffer。

2）上样，并进行琼脂糖凝胶电泳。琼脂糖凝胶的浓度根据扩增 DNA 大小而异。

3）电泳完成后，在溴化乙锭（0.5 μg/ml）中浸泡 20–30 min.

4）紫外照射下，确认扩增 PCR 扩增产物。

在 Control 实验中，使用 Control Primer LA3 和 LA4 时可得到 17.5 kb 的扩增产物；使用 Control Primer GC1 和 GC2 时可得到 1,225 bp 的扩增产物。

## ● 实验例

1. 人基因组 DNA 扩增

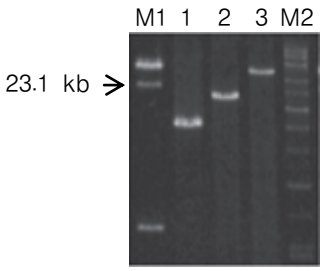
Target：β–globin cluster region（17.5 kb、21.5 kb），TPA gene region（27 kb）

① 按下列组成配制 LA PCR 反应液。

| 试剂 | 使用量 | 终浓度 |
|---|---|---|
| 10×LA PCR Buffer II（$Mg^{2+}$ plus） | 5 μl | [1×] |
| dNTP Mixture | 8 μl | each 400 μM |
| Sense Primer（20 μM） | 0.5 μl | 0.2 μM |
| Antisense Primer（20 μM） | 0.5 μl | 0.2 μM |
| *TaKaRa LA Taq* | 0.5 μl | 2.5 U/50 μl |
| Human genomic DNA（500 ng/μl） | 1 μl | 500 ng/μl |
| 灭菌水 | 34.5 μl | |
| total | 50 μl | |

② 按以下条件进行 PCR 反应。

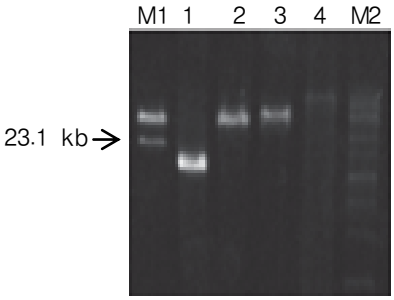
| | | |
|---|---|---|
| 94℃ | 1 min | |
| ↓ | | |
| 98℃ | 10 sec | 30 cycles |
| 68℃ | 15 min（17.5 kb，21.5 kb）或 20 min（27 kb） | |
| ↓ | | |
| 72℃ | 10 min | |




Lane: PCR products size
1: 17.5 kb（β-globin clustesr）
2: 21.5 kb（β-globin clustesr）
3: 27 kb（TPA gene）
M1: λ-*Hin*d Ⅲ digest
M2: High Molecular Weight DNA Marker

0.4% Agarose gel electrophoresis
Applied volume: 5 μl

2. *E.coli* 基因组 DNA（>18 kb）扩增
模板 DNA 浓度：100 ng/50 μl
反应液组成和 PCR 反应条件同实验例 1

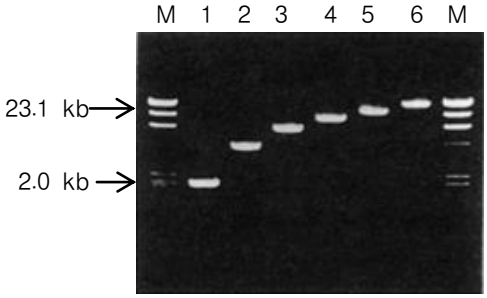



Lane: PCR products size
1: 20 kb
2: 28 kb
3: 30 kb
4: 38 kb
M1: λ-*Hin*d Ⅲ digest
M2: High Molecular Weight DNA Marker

0.4% Agarose gel electrophoresis
Applied volume: 5 μl

3. *E.coli* 基因组 DNA（≤18 kb）扩增
反应液组成同实验例 2；PCR 反应条件如下：

| | | |
|---|---|---|
| 94℃ | 1 min. | |
| ↓ | | |
| 98℃ | 10 sec | 30 cycles |
| 68℃ | 3 min（2 kb、4 kb 时） | |
| ↓ | 或 5 min（6 kb、8 kb 时） | |
| | 或 15 min（10 kb、18 kb 时） | |
| 72℃ | 10 min | |




Lane: PCR products size
1: 2 kb
2: 4 kb
3: 6 kb
4: 8 kb
5: 10 kb
6: 18 kb
M: λ-*Hin*d Ⅲ digest

0.4% Agarose gel electrophoresis
Applied volume: 5 μl

4. 富含 GC 的 Huntington’s disease gene 扩增

比较 LA PCR Buffer 和 GC Buffer Ⅰ, Ⅱ的扩增性能。

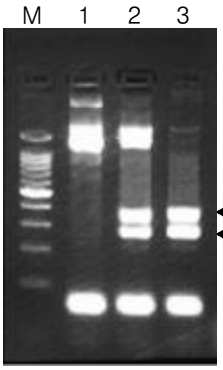
Target: Huntington’s disease (HD) gene IT 15 CAG repeat region

262 bp–GC content: 73%

358 bp–GC content: 71.5%

PCR 反应条件:

| | | |
|---|---|---|
| 94℃ | 1 min | |
| 94℃ | 30 sec | 30 cycles |
| 60℃ | 30 sec | |
| 72℃ | 1 min | |
| 72℃ | 5 min | |




Lane: buffer
1: 10×LA PCR Buffer
2: 2×GC Buffer Ⅰ
3: 2×GC Buffer Ⅱ
M: 100 bp DNA Ladder

3% Agarose gel electrophoresis
Applied volume: 5 μl

## ● 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 试剂盒中的所有组份，在室温～37℃完全融化后，用移液枪吸打混匀或将 Microtube 上下颠倒混匀，尽量避免剧烈振荡。混合 10×LA PCR Buffer，*TaKaRa LA Taq* 时，为防止起泡或酶失活，需注意仔细轻轻混合。融化后的各组份在使用前请置于冰中保存。

② 配制反应液时，使用移液器轻轻吸打混合，不能剧烈振荡。

③ 扩增长片段 DNA 时的引物特异性要高。引物的推荐长度为 25–30 mers。

④ 尽量使用高纯度的模板 DNA。扩增长片段 DNA 时，模板使用量为通常 PCR 时的 4～5 倍。

## ● Q&A

Q1. LA PCR 扩增的条件?

A1. 因扩增片段的大小、反应体积、使用的扩增仪器的不同而不同。

1）循环次数

根据模板 DNA 的质量和复杂程度，以及扩增片段的大小，循环次数可设定为 25～35。

如果循环次数太少，扩增量不足；如果循环次数太多，电泳时可能会出现 Smear。

2）初始变性条件

当模板为基因组 DNA 时，建议 94℃下变性 1–2 分钟。

3）变性条件

根据反应管种类的不同稍有差异，一般情况如下。

| | |
|---|---|
| 使用普通 microtube | 98℃，20 sec 或 94℃，30 sec |
| 使用薄壁型 microtube | 98℃，10 sec 或 94℃，20 sec |

变性时间太短或温度太低，可能会导致电泳时出现 Smear 或者扩增效率低；
变性时间太长或温度太高时，有时会得不到扩增产物。

4）退火以及延伸条件

退火温度通常在 55～68℃之间，以每 2℃为梯度来获取最适温度。由于 *TaKaRa LA Taq* 在 60～68℃间也具有很高活性，可在此温度范围内设定退火-延伸温度，进行 2 阶段温度 PCR 反应。退火-延伸温度为 68℃（two step PCR）时，每 kb 设定为 30 秒～1 分钟；当温度设定在 68℃以下时，时间设定可稍长一些。通常退火温度太高，有时会得不到扩增产物；退火温度太低时，容易发生非特异性反应。此外，延伸时间太短时，会得不到扩增产物或者会有一些短的非特异性产物生成；而延伸时间太长时，电泳时会出现 Smear。

Q2. 选择 LA PCR 引物时的注意事项?

A2. 特异性非常重要。20 mer 左右的 Primer，如果特异性高，扩增 20 kb 没有问题。

如果可能，根据以下原则制备引物：

1）长度在 25-30 bases。
2）引物间最适退火温度相差 2℃以内。
3）选择 GC 含量 40-60%的引物。
4）避免引物形成发夹结构或引物二聚体，尤其是 3’末端。
5）避免使用序列中含 inosine 的引物。

Q3. 如何确定引物的使用量?

A3. 请在终浓度为 0.1 μM～1.0 μM 的范围内进行条件研讨。引物的浓度过低时，有时扩增量较小；而引物的浓度过高时，会产生非特异性带。

通常当模板 DNA 的量较多或模板为复杂结构（High Complexity）时，引物浓度应低一些；而当模板 DNA 的量较少或模板结构不很复杂（Low Complexity；如质粒等）时，引物浓度应稍高一些。

Q4. LA PCR 时酶的使用量?

A4. 50 μl 的反应体系可使用 2.5 U 的 *TaKaRa LA Taq*。但合适的用量也与模板 DNA 的量、DNA 的结构、扩增片段的大小等有关。酶量过多时，易发生非特异性反应，电泳时出现 Smear；酶量过少时，反应性能下降。

Q5. LA PCR 时模板 DNA 的制备方法及使用量?

A5. 超过 10 kb 以上的 LA PCR 扩增反应，不适合使用采取简单方法（例如：只进行细胞热处理或蛋白酶处理）提取的 DNA 作为模板。建议使用经过充分纯化的完整 DNA（没有 Nick 等）作为模板。

以下为提取 Human Genomic DNA 和大肠杆菌 Genomic DNA 时的一般操作方法：

◆ Human Genomic DNA 纯化法

以 HL60 培养细胞（$1.5\times10^9$ Cells）为例。

1. 将培养的 HL60 细胞（$1.5\times10^9$ Cells）收集后，用 0.7%的 NaCl 溶液清洗两次。
2. 用 15 ml 的 10 mM Tris-HCl（pH8.3）将细胞重悬。
3. 在细胞重悬液中加入 150 μl 的 Proteinase K（10 mg/ml）和 150 μl 的 SDS（10%）进行裂解。
4. 60℃温育 1 小时后，再在 37℃温育 16 小时。
5. 将 15 ml 的 0.1 M Tris-HCl（pH8.0）饱和的苯酚加入上述溶液中，轻轻上下颠倒混合 15 分钟。
6. 9,000 rpm（约 6,000 g）离心 10 分钟。
7. 将水相（上层）移至另一新的离心管中。
8. 再加入 15 ml 的 0.1 M TE buffer（pH8.0）饱和的苯酚/氯仿/异戊醇（25：24：1），轻轻上下颠倒混合 15 分钟。
9. 室温下 9,000 rpm（约 6,000 g）离心 10 分钟。
10. 将水相（上层）移至另一新的离心管中。
11. 再加入 15 ml 的氯仿/异戊醇（24：1），轻轻上下颠倒混合 15 分钟。

12. 室温下 9,000 rpm（约 6,000 g）离心 10 分钟。
13. 将水相（上层）移至另一新的离心管中。
14. 加入 1.5 ml 的 3 M 醋酸钠（pH5.2）和 30 ml 的 99.5%乙醇，轻轻上下颠倒混合。
15. 用细玻璃棒将 DNA 缠于玻璃棒上取出，用 80%乙醇冲洗缠有 DNA 的玻璃棒。
16. 干燥处理。
17. 用 10 ml 的 TE Buffer 溶解 DNA（将缠有 DNA 的玻璃棒放入 TE Buffer 中，4℃放置一夜）。
18. 然后加入 100 μl 的 RNase A（10 mg/ml），37℃温育 1 小时。
19. 加入 10 ml 的 0.1 M Tris-HCl（pH8.0）饱和的苯酚/氯仿/异戊醇（25：24：1），轻轻上下颠倒混合 5 分钟。
20. 9,000 rpm（约 6,000 g）离心 10 分钟。
21. 将水相（上层）转移至另一新的离心管中。
22. 再加入 10 ml 的氯仿/异戊醇（24：1）。轻轻上下颠倒混合 5 分钟。
23. 9,000 rpm（约 6,000 g）离心 10 分钟。
24. 将水相（上层）移至另一新的离心管中。
25. 加入 1 ml 的 3 M 醋酸钠（pH5.2）和 20 ml 的乙醇，轻轻上下颠倒混合 15 分钟。
26. 用细玻璃棒将 DNA 缠于玻璃棒上取出。
27. 用 80%乙醇冲洗缠有 DNA 的玻璃棒。
28. 干燥处理。
29. 用 2 ml 的 TE Buffer 溶解 DNA（将缠有 DNA 的玻璃棒放入 TE Buffer 中，4℃放置一夜），然后调整 DNA 终浓度为 0.5 mg/ml。

◆ 大肠杆菌基因组 DNA 纯化法

1. 将200 ml L-Broth过夜培养（使用2 L烧瓶）的大肠杆菌2瓶离心收集菌体。
2. 用40 ml的Buffer（50 mM EDTA，50 mM Tris-HCl，pH8.0）重悬。
3. -80℃冷冻处理30分钟。
4. 将4 ml的0.25 M Tris-HCl（pH8.0）溶解的溶菌酶（10 mg/ml）加入到冷冻后的菌液中，室温下融化并均匀混合。
5. 融化后的菌体于冰中放置45分钟。
6. 加入8 ml的STEP（0.5% SDS，50 mM Tris-HCl pH8.0，0.4 M EDTA，1 mg/ml Proteinase K）50℃温育1小时。
7. 加入45 ml的TE Buffer（10 mM Tris-HCl pH8.3，1 mM EDTA）。
8. 然后再加入96 ml的0.1 M Tris-HCl（pH8.0）饱和的苯酚/氯仿/异戊醇（25：24：1），上下颠倒轻轻混合5分钟。
9. 5,000 rpm（约 4,000 g）离心 15 分钟。
10. 将水相（上层）移至另一新的离心管中。
11. 再加入 96 ml 的氯仿/异戊醇（24：1），轻轻上下颠倒混合 5 分钟。
12. 5,000 rpm（约 4,000 g）离心 15 分钟。
13. 将水相（上层）移至另一新的离心管中。
14. 加入 9 ml 的 3 M 醋酸钠（pH5.2）和 225 ml 的乙醇，轻轻上下颠倒混合。
15. 用细玻璃棒将 DNA 缠于玻璃棒上取出，用 80%乙醇冲洗缠有 DNA 的玻璃棒。
16. 干燥处理。
17. 用 20 ml 的 TE Buffer 溶解 DNA（将缠有 DNA 的玻璃棒放入 TE Buffer 中，4℃放置一夜）。
18. 然后加入 200 μl 的 RNase A（10 mg/ml），37℃保温 30 分钟。
19. 加入 20 ml 的 0.1 M Tris-HCl（pH8.0）饱和的苯酚/氯仿/异戊醇（25：24：1），轻轻上下颠倒混合 5 分钟。

20. 10,000 rpm（约 7,500 g）离心 15 分钟。
21. 将水相（上层）转移至另一新的离心管中。
22. 再加入 20 ml 的氯仿/异戊醇（24：1）。轻轻上下颠倒混合 5 分钟。
23. 10,000 rpm（约 7,500 g）离心 10 分钟。
24. 将水相（上层）移至另一新的离心管中。
25. 加入 2 ml 的 3 M 醋酸钠（pH5.2）和 50 ml 的乙醇，轻轻上下颠倒混合。
26. 用细玻璃棒将 DNA 缠于玻璃棒上取出。
27. 用 80%乙醇冲洗缠有 DNA 的玻璃棒。
28. 干燥处理。
29. 用 20 ml 的 TE Buffer 溶解 DNA（将缠有 DNA 的玻璃棒放入 TE Buffer 中，4℃放置一夜），然后调整 DNA 终浓度为 0.1 mg/ml。

按以上方法制备的人基因组 DNA 和 *E.coli* 基因组 DNA 可以在 Takara 购买到商业化产品，可作为 LA PCR 中的 control template。

LA PCR Genome DNA Set（Code No. 9060）

(包含了人基因组 DNA 和 *E. coli* 基因组 DNA)

模板 DNA 的推荐使用量如下：

Human genome DNA: 0.1 μg～1 μg/50 μl PCR

*E. coli* Genome DNA: 10 ng～100 ng/50 μl PCR

λ DNA: 0.5 ng～2.5 ng/50 μl PCR

Q6. 是否可以对 λ phage 直接进行 LA PCR 反应?

A6. 可以。99℃、10 min.处理后的 Phage 约 $10^6$～$10^7$ pfu 作为模板，至少可扩增 8 kb 的 DNA 片段。

Q7. 对 Mammalian Cell 或 *E.coli* 只进行热处理（98℃、2 min）或 Protease 处理的样品可否进行 LA PCR?

A7. *E.coli* 只进行热处理时可扩增 10 kb 的 DNA 片段（50 μl PCR 反应体系中 37℃ Overnight culture in L-both 使用 2 μl）。

Human 细胞（培养细胞）如只经过热处理，可扩增数百 bp；经过 Protease 处理、热处理后的样品，可扩增 1～2 kb。如果要扩增长片段 DNA，建议使用经过充分纯化的完整 DNA（没有 Nick 等）作模板。

Q8. 电泳时出现 Smear，为什么?

A8.

| 原 因 | 建 议 |
|---|---|
| 酶量过多 | 0.5 U 间隔递减 |
| 变性时间过短 | 变性时间 5 sec 间隔递增 |
| 变性温度过低 | 变性温度 0.5℃间隔递增 |
| dNTP 量过少 | 50 μM 间隔递增 |
| 延伸时间过长 | 1 min 间隔递减 |
| 循环次数过多 | 2 个循环间隔递减 |
| 模板量过多 | 模板量按 20%间隔递减 |

Q9. 出现很多非特异性 DNA 带，为什么?

A9.

| 原 因 | 建 议 |
|---|---|
| 引物浓度过高 | 0.1 μM 间隔递减 |
| 引物设计不合理 | 改变引物的位置，增强特异性。<br>设计引物长度为 30～35 mer，增强特异性。 |
| 酶量过多 | 0.5 U 间隔递减 |
| 循环次数过多 | 2 个循环间隔递减 |
| 退火温度过低 | 2℃间隔递增 |
| 从室温上升至变性温度(94～98℃)过程中引起的引物非特异性退火 | 使用 *TaKaRa Taq* HS、*TaKaRa Ex Taq* HS 进行 Hot start 法 PCR 扩增 |
| 延伸时间过短 | 1 min 间隔递增 |
| 模板量过多 | 模板量按 20%间隔递减 |

Q10. 使用 *LA Taq* 也产生 A 的 Overhang 吗（PCR 产物可否直接克隆于 T-Vector）?

A10. 可以。使用 *TaKaRa LA Taq* 时的 PCR 扩增产物产生 A 的 Overhang，与使用 *TaKaRa Taq* 时的 PCR 扩增产物一样，可以克隆于 T-Vector。因此，扩增产物可直接应用到 TA-cloning。克隆长链 PCR 产物（> 5 kb）到 T-Vector 时，效率降低。

Q11. 什么琼脂糖凝胶适用于对 LA PCR 中形成的长链 DNA 片段进行电泳?

A11. 建议使用 0.4%的 PrimeGel Agarose GOLD 3-40K (Code No. 5802A)。

## ● 参考文献


1) Barnes W M. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1994) **91**: 2216-2220.

2) Cheng S, *et al. Proc Natl Acad Sci USA.* (1994) **91**: 5695-5699.

3) Cheng S, Higuchi R, and Stoneking M. *Nature Genet.* (1994) **7**: 350-351.

4) Cheng S, *et al. Nature.* (1994) **369**: 684-685.

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

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

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

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

9) Lawyer F C, Stoffel S, Saiki R K. Myambo K B, Drummond R, and Gelfand D H. *J Biol Chem.* (1988) **264**: 6427-6437.

## ● 关联产品

*TaKaRa LA Taq*® (Code No. RR002A/B)
*TaKaRa LA Taq*® Hot Start Version (Code No. RR042A/B)
*TaKaRa LA Taq*® with GC Buffer (Code No. RR02AG/BG)
Taq Antibody (Code No. 9002A/B)
LA PCR Genome DNA Set (Code No. 9060)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient (Code No. TP600)
PrimeGel™ Agarose LE 1-20K (Code No. 5800A)
PrimeGel™ Agarose GOLD 3-40K(Code No. 5802A)

*TaKaRa LA Taq* is a registered trademark of Takara Bio Inc.
LA PCR, 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