

Code No. R005A

研究用

Takara

Pyrobest[™]

DNA Polymerase

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● <i>Pyrobest</i> DNA Polymerase 的特点	1
● 最适参数的设定	1
● 反应液的配制	3
● 高保真性	3
● PCR 产物末端	3
● 反转录酶活性	3
● PCR 反应液配制	4
● Troubleshooting	4

● 制品说明

本制品是 *Pyrococcus* Sp. 由来的具有 3' → 5' Exonuclease 活性 (Proof reading 活性) 的耐热性 α 型 DNA 聚合酶。与 Pol I 型 DNA 聚合酶 (*Taq* DNA Polymerase 等) 相比, α 型 DNA 聚合酶具有 PCR 适用范围窄、最适反应条件难以确定等缺点。而 *Pyrobest* DNA Polymerase 所使用的 Buffer 已被优化, 与 *Taq* DNA 聚合酶具有相同的扩增效率 (可扩增人基因组 DNA 约 6 kb 和 λ DNA 约 12 kb 大小的片段)。另外, *Pyrobest* DNA Polymerase 具有 3' → 5' Exonuclease 活性可以把错配的碱基除去, 不仅适用于高保真性的 PCR 反应, 还具有很高的反应性能。

目前使用的 10× *Pyrobest* Buffer II 同原来使用的 10× *Pyrobest* Buffer 相比, 大大提高了 PCR 反应性能。

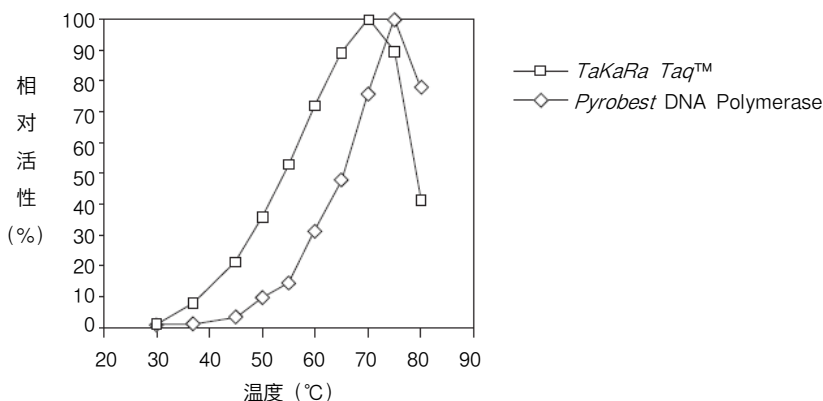
● 制品内容

<i>Pyrobest</i> DNA Polymerase (5 U/μl)	125 U (25 μl)
10× <i>Pyrobest</i> Buffer II (Mg ²⁺ plus, 10 mM)	500 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	400 μl
酶溶液组成: 50 mM Tris-HCl Buffer (pH8.2)、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、0.1% Tween 20、0.1% NP-40、50% Glycerol	

● 保 存: -20°C

● *Pyrobest* DNA Polymerase 的特点

- ◎ 耐热性: 95°C 加热反应 1 小时后残留活性为 90% 以上。
- ◎ Auto hot start: *Pyrobest* DNA Polymerase 的反应最适温度相对于 *Taq* DNA Polymerase 要高, 约 75°C。在 40°C~50°C 条件下, *Taq* DNA Polymerase 的活性为 15~30% (同最适温度时的活性比), 而 *Pyrobest* DNA Polymerase 的活性仅为 2~9%, 因此使用 *Pyrobest* DNA Polymerase 可抑制由引物错配而引起的引物二聚体等非特异性反应。



以上几点可以看出, 使用 *Pyrobest* DNA Polymerase 进行 PCR 反应时, 无需 *Taq* DNA Polymerase 的 Hot Start 法 PCR, 即可进行特异性 PCR 反应。

● 最适参数的设定

为很好的发挥 *Pyrobest* DNA Polymerase 的 PCR 反应性能, 需设定 PCR 反应的最适参数。

PCR 反应液的各组份

◎ 酶使用量

一般推荐酶的使用量为 1.25 U/50 μl。但有时根据扩增片段大小、模板纯度及使用量可适当增减酶的使用量。

◎ 模板 DNA 使用量

以下为模板 DNA 的推荐使用量。

人基因组 DNA: 50~500 ng/50 μl PCR。

λ DNA: 100 pg~10 ng/50 μl PCR。

质粒: 10~100 pg/50 μl PCR。

有时因模板 DNA 纯度差异可适当调整模板使用量。

想要获得准确的目的扩增片段时, 应加入足够量的模板, 并减少 PCR 循环次数。

◎ 引物

Pyrobest DNA Polymerase 因具有 3' →5' Exonuclease 活性可分解引物, 所以建议使用高浓度的引物可获得良好的扩增反应。

有报道称 3' 端附有 S-Oligo 的 Primer 不易受到 3' →5' Exonuclease 活性的影响, 在实际操作中 使用 S-Oligo Primer 有时可提高 PCR 反应性能。

最适浓度: 0.2~2 μM

引物长度: 25~30 mer

(因 3' →5' Exonuclease 活性的影响, 引物长度较长有利于 PCR 扩增)

※ 注: 使用 *Pyrobest* DNA Polymerase 时避免使用含有次黄嘌呤核苷的引物。可使用简并引物。

◎ dNTP和Mg²⁺

dNTP 具有螯合作用, dNTP 浓度过高会导致参与反应的 Mg²⁺有效浓度降低。

使用 *Pyrobest* DNA Polymerase 时, 建议 dNTP 和 Mg²⁺的使用浓度如下:

Mg²⁺ : 1 mM (终浓度)

dNTP : 200 μM each (终浓度)

通常 Mg²⁺浓度过高时, 易产生非特异性反应; 反之, Mg²⁺浓度过低时, 会降低 PCR 反应性能。

EDTA 等螯合剂存在时, 有效参与反应的 Mg²⁺浓度就会降低。一般 PCR 反应溶液中设定的 Mg²⁺浓度要高于 dNTP 浓度 (4 种的总浓度)。

同时要注意 dNTP 浓度低时, 3' →5' Exonuclease 活性就会过强。

各 dNTP 的浓度要相同。各 dNTP 的浓度有差异时会产生 misincorporation error (错掺) 现象。

※ 注: 使用 *Pyrobest* DNA Polymerase 时, 以 dUTP 替代 dTTP 会降低 PCR 反应性能。

PCR反应条件

◎ 预变性

以基因组 DNA 为模板时, 通常 94°C 1 min 即可充分变性。

◎ 2 step PCR或3 step PCR

通常建议使用 2 step PCR (shuttle PCR)。引物的 T_m 值低、2 step PCR 反应性能差时请尝试使用 3 step PCR。

< 2 step PCR >	98°C 1 sec~10 sec	}	25~30 cycles
	68°C 1 min/kb		
< 3 step PCR >	98°C 1 sec~10 sec	}	25~30 cycles
	55°C 30 sec~1 min		
	72°C 1 min/kb		

◎ 变性

为了抑制酶失活及对模板 DNA 的损伤, 应尽量缩短变性时间。变性条件根据使用的仪器种类和反应 Tube 种类进行设定。

设定的标准为: 98°C 1 sec ~10 sec; 94°C 10 sec ~30 sec。

◎ 引物退火/延伸反应 (2 step PCR)、延伸反应 (3 step PCR)

考虑到 *Pyrobest* DNA Polymerase 的反应速度 (约 25 bases/sec) 及 3' → 5' Exonuclease 活性对 PCR 产物的分解, 延伸反应时间通常设定为 1~2 min/kb (延伸温度为 68~72°C)。

通常延伸时间设定为 1 min/kb, 避免延伸时间过长。

◎ 引物退火 (3 step PCR)

设定的引物退火温度要同引物的 T_m 值接近。

引物退火温度一般设定为 (T_m-5) °C。

同时也适用于 Touch Down PCR 法。Touch Down PCR 法是每一个循环退火温度降低 1°C 的 PCR 法。退火温度高时, 虽然扩增效率低, 但特异性强。随着循环数增加, 退火温度逐渐降低则提高了扩增效率, 从而达到大幅提高 PCR 的特异性和扩增效率的目的, 既有效地抑制了非特异性扩增, 又获得了高效率的特异性扩增。

◎ 循环次数

为了获得可信用高的 PCR 反应, 减少循环次数十分重要。PCR 扩增时, 应加入足够量的模板 DNA。

◎ 循环后的延伸反应

使用 *Taq* 酶系列通常要进行循环后的延伸反应, 而使用 *Pyrobest* DNA Polymerase 进行 PCR 反应时不需要后延伸 (例如 72°C、10 分) 步骤, 增加该步骤有时反而会产生 smear。

● 反应液的配制

各种试剂融化后置于冰上。配制反应液时应在冰上进行, 可抑制由引物错配而引起的非特异性扩增。配制反应液时, 各试剂按照以下顺序添加到 PCR Tube 中后再轻轻混匀。

试剂添加顺序 (例): 1) 灭菌水

2) 10 × *Pyrobest* Buffer II

3) dNTP Mixture

4) *Pyrobest* DNA Polymerase

5) 模板 DNA

6) Primer 1

7) Primer 2

PCR 反应液配制后尽快进行反应。

※注: 在配制反应液时, 请在加入 dNTP Mixture 后再添加 *Pyrobest* DNA Polymerase。因为本酶的 3' → 5' exonuclease 活性较强, 反应液中如果不含 dNTP, 反应液中的引物有可能被分解。

● 高保真性

按照 Cline 和 Kunkel 等方法, 对 *Pyrobest* DNA Polymerase 和 *TaKaRa Taq*、*Pfu* DNA Polymerase 的保真性进行了比较。结果显示, *Pyrobest* DNA Polymerase 的保真性是 *Taq* DNA Polymerase 的 10 倍左右, 与 *Pfu* 酶有着相同的保真性。

● PCR 扩增产物末端

耐热性 DNA Polymerase 一般都具有 TdT 活性, PCR 扩增后的 PCR 产物 3' 端附加 A 碱基。使用 *Pyrobest* DNA Polymerase 时, 因其 TdT 活性较弱, PCR 扩增后的 PCR 产物大部分为平滑末端, PCR 产物 (必要时进行磷酸化) 可直接克隆于平滑末端载体中。

● 反转录酶活性

反转录酶活性在检出范围以下。

● PCR反应液配制 (50 μ l)

Template DNA	<500 ng
<i>Pyrobest</i> DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 \times <i>Pyrobest</i> Buffer II	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l
Primer 1	0.2~2 μ M (final conc.)
Primer 2	0.2~2 μ M (final conc.)
灭菌水	up to 50 μ l

● Troubleshooting

现象	原因	解决办法
无 PCR 扩增产物 或扩增效率低	延伸时间过短	延伸时间设定为 2 min/kb
	退火或退火/延伸温度过高	2 $^{\circ}$ C 间隔递减或进行 touch down PCR
	退火或退火/延伸时间过短	时间设定为 1~2 min
	配制反应液时, 试剂添加顺序不对	加入 dNTP Mixture 后再加入 <i>Pyrobest</i> DNA Polymerase
	扩增片段 GC 含量高 或具有复杂的二级结构	提高变性温度; 延长变性时间; 98 $^{\circ}$ C 1 sec~10 sec 或 94 $^{\circ}$ C 10 sec~30 sec
	Primer 不合适	提高引物纯度; 使引物 GC 含量在 50%左右; 设计的 Primer 长度要长, 为 25~30 mer; 上下游 Primer 的 3' 端碱基序列不能互补; 使用的引物 3' 端为 S-Oligo primer。
	Primer 浓度过低	在 0.2~2 μ M (终浓度) 范围进行调整
	变性条件不合理	98 $^{\circ}$ C 1 sec~10 sec 或 94 $^{\circ}$ C 10 sec~30 sec
	酶量过低	酶的使用量为 0.625 U~1.25 U/50 μ l PCR; 酶的使用量可根据扩增片段大小、模板纯度及使用量适当增减。
	Template DNA 纯度低	再精制 Template
出现非特异性扩 增	Template DNA 量过少	使用适量的 Template DNA 人基因组 DNA ~500 ng / 50 μ l PCR λ DNA ~10 ng / 50 μ l PCR 质粒 ~100 pg / 50 μ l PCR
	循环次数过少	循环次数设定为~40 cycles
	退火或退火/延伸温度过低	2 $^{\circ}$ C 间隔递增或进行 touch down PCR
	Template DNA 量过多	使用适量的 Template DNA 人基因组 DNA ~500 ng / 50 μ l PCR λ DNA ~10 ng / 50 μ l PCR 质粒 ~100 pg / 50 μ l PCR
	循环次数过多	循环次数设定为 25~30 cycles
	Primer 浓度过高	在 0.2~2 μ M (final conc.) 范围进行调整。
	Primer 长度过长	设计的 Primer 长度为~30 mer

现象	原因	解决办法
出现 smear	酶量过多	酶的使用量为 0.625 U~1.25 U/50 μ l PCR; 酶的使用量可根据扩增片段大小、模板纯度及使用量适当增减
	延伸时间过长	延伸时间设定为 1 min/kb (68 $^{\circ}$ C~72 $^{\circ}$ C)
	循环次数过多	循环次数设定为 25~30 cycles
	Template DNA 量过多	使用适量的 Template DNA 人基因组 DNA ~500 ng / 50 μ l PCR λ DNA ~10 ng / 50 μ l PCR 质粒 ~100 pg / 50 μ l PCR

Pyrobest and *TaKaRa Taq* 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