

Code No. R071A

研究用

TaKaRa

MightyAmp™
DNA Polymerase Ver.2

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● PCR 反应液配制	1
● Primer 设计	2
● PCR 反应条件设定	2
● PCR 产物电泳	2
● 扩增产物末端	2
● 实验例	3
● Troubleshooting	4
● 关联产品	5

● 制品说明

MightyAmp DNA Polymerase 是 Takara 公司新开发的一种具有很高反应性能，特别适合 2 kb 左右片段扩增的 DNA 聚合酶。由于本酶具有很强的扩增性能，对于使用普通 PCR 酶难以扩增（含有 PCR 阻害物）的粗提样品显示很好的扩增能力。

MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 是对 MightyAmp DNA Polymerase 中的 Buffer 进行改良，可以将血液、动植物组织等生体直接加入到反应液中进行 Direct PCR。与以前 MightyAmp DNA Polymerase 相同，对于含有 PCR 阻害物的粗提样品以及 GC Rich、AT Rich 的模板均可在宽广的模板范围内进行有效扩增；对低浓度起始的模板也能进行很好的扩增。

本酶是使用单克隆抗体的 Hot Start 型 PCR 扩增用 DNA 聚合酶，98°C 高温加热前，抗体与酶结合，有效抑制聚合酶活性。

● 制品内容 (200 次量) *1

MightyAmp DNA Polymerase (1.25 U/μl) *2	200 μl
2×MightyAmp Buffer Ver.2 (Mg ²⁺ , dNTP plus) *3	1 ml×5

* 1: 反应体系为 50 μl 时的反应次数。

* 2: 酶贮存液

50 mM	Tris-HCl (pH8.2, 4°C)
100 mM	NaCl
0.1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0.1%	Tween 20
0.1%	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°C，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)。

* 3: Mg²⁺浓度是 4 mM (2×)，dNTP 浓度是各 800 μM (2×)。

● 保存: -20°C

● PCR 反应液配制

1. 在 Microtube 中配制下列混合液。

试剂	使用量	终浓度
2×MightyAmp Buffer Ver.2	25 μl	1×
Primer 1	15 pmol	0.3 μM
Primer 2	15 pmol	0.3 μM
生体/粗提样品*1	≤5 μl*1	
MightyAmp DNA Polymerase	1 μl	1.25 U/50 μl
灭菌水	Up to 50 μl	
Total	50 μl	

* 1: 组织样品或者提取液的添加标准

- ◆ EDTA 抗凝的血，肝素抗凝的血*2 ≤5 μl
- ◆ 小鼠尾 ≤1 mm

◆小鼠耳	≤1.5 mm ²
◆小鼠肝脏、脑	≤1.5 mm ³
◆植物的叶 (西红柿、芹菜、菠菜)	≤直径 2 mm
◆生体样品粗提液	≤5 μl

* 2: 使用柠檬酸抗凝的血液时反应性能明显下降, 进行 Direct PCR 时不推荐使用柠檬酸抗凝的血液。

● Primer 设计

请尽量使用引物设计软件设计合适的引物。

引物 Tm 值 (按以下公式进行计算*) 设计在 60°C 以上。

$$*: Tm \text{ 值 } (^{\circ}\text{C}) = [(A, T \text{ 总数}) \times 2] + [(C, G \text{ 总数}) \times 4] - 5$$

● PCR 反应条件设定

标准反应条件为 3 Step PCR, 延伸温度设定为 68°C。扩增 GC Rich 模板时可以使用 2 Step PCR 进行反应。

[3 Step PCR]

98°C 2 min*1

↓

98°C 10 sec

60°C 15 sec

68°C*2 1 min/kb

} 30 ~ 40 Cycles

[2 Step PCR]

98°C 2 min*1

↓

98°C 10 sec

68°C 1 min/kb

} 30 ~ 40 Cycles

* 1: 使用了抗性非常强的 Hot Start 酶, 在初期变性时必须进行 98°C 2 min 的抗体变性步骤。

* 2: 3 Step PCR 时, 延伸温度请设定在 68°C。

● PCR 产物电泳

◆ 使用 MightyAmp DNA Polymerase 扩增得到的 PCR 产物, 电泳时请尽量使用 TAE Buffer, 使用 TBE Buffer 有时得不到好的电泳结果。

◆ 动物组织 (例: 小鼠尾) 进行 Direct PCR 的扩增产物电泳时样品中有不溶物 (组织) 存在, 有时 DNA 片段电泳会产生挂孔现象, 在目的片段位置没有条带。这种情况推荐向样品中添加 Loading Buffer 和 Proteinase K。

1. 6×loading Buffer (Code No. 9156) 和 Proteinase K (Code No. 9034) 按照 10: 1 (v/v) 比例混合。

2. 电泳前用 1. 的混合液和 PCR 产物按照 1: 5 (v/v) 比例混合。

● 扩增产物末端

使用本制品扩增得到的 PCR 产物 3' 端附有一个“A”碱基, 因此可直接克隆于 T-Vector (pMD20: Code No. 3270、pMD19 (Simple): Code No. 3271 等) 中。也可以使用 Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027) 将末端平滑化和磷酸化后克隆到平滑末端载体中。

● 实验例

以下是以各种组织的粗提样品为模板进行 Direct PCR 反应的实验例。

1. 小鼠 EDTA 抗凝血液和肝素抗凝血液的 Direct PCR

<方法>

取小鼠 EDTA 抗凝血液和肝素抗凝血液各 1 μ l 添加到 20 μ l 反应体系中，扩增小鼠的 *Ccnd2* 基因 (0.5 kb) 以及 *TfrC* 基因 (2 kb) (反应条件采用 3 步法, 30 Cycles)，PCR 产物各取 3 μ l 进行电泳。

<结果>

使用 MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 对小鼠 EDTA 抗凝血液和肝素抗凝血液进行 Direct PCR，可以得到很好的扩增效果。

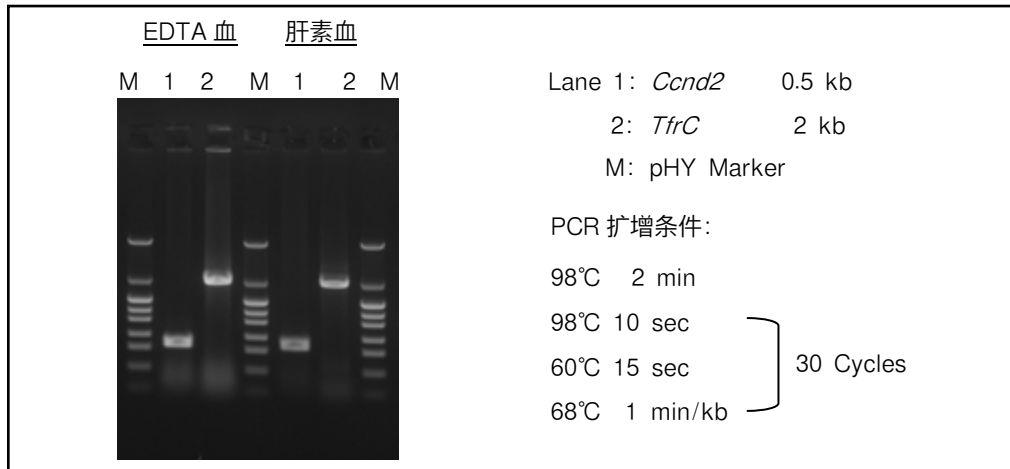


图 1. 小鼠 EDTA 抗凝血液和肝素抗凝血液进行 Direct PCR

2. 西红柿及菠菜叶的 Direct PCR

<方法>

各取直径 0.5 mm 和 1.2 mm 大小的西红柿和菠菜叶片，加入到 20 μ l 反应体系中，进行 *cox I* 基因 (0.5 kb) (反应条件采用 3 步法, 30 Cycles) 扩增。PCR 产物各取 5 μ l 进行电泳。

<结果>

使用 MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 对西红柿及菠菜叶进行 Direct PCR，可以得到很好的扩增效果。

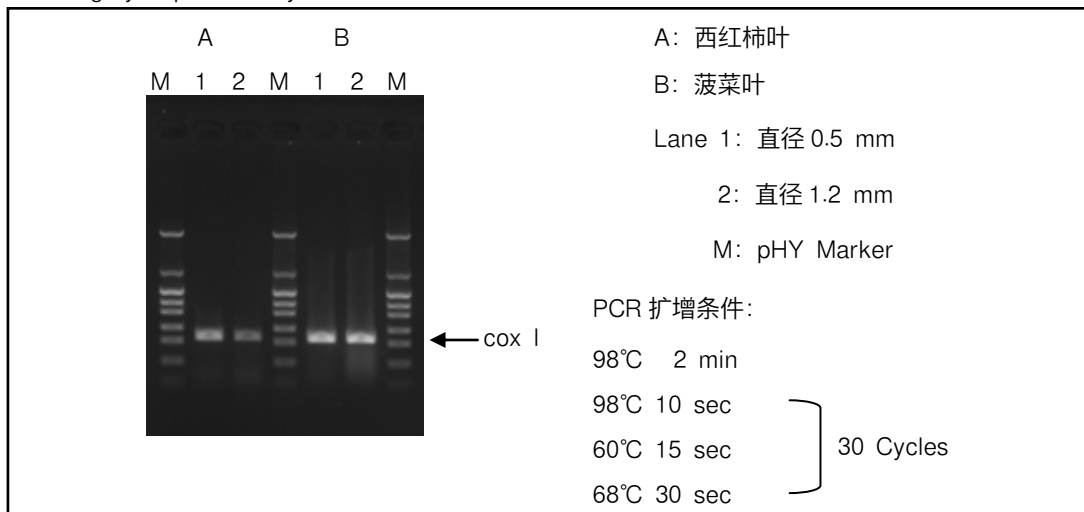


图 2. 西红柿及菠菜叶进行 Direct PCR

3. 小鼠尾及耳的 Direct PCR

<方法>

取小鼠尾前端 1 mm 及耳 1.5 mm 分别加入到 50 μ l 反应体系中, 进行小鼠 *Ywhaz* 基因 (1 kb) (反应条件采用 3 步法, 30 Cycles) 的扩增。PCR 产物各取 4 μ l 加入不含 Proteinase K 的 Loading Buffer 和含有 Proteinase K 的 Loading Buffer 中进行电泳。

<结果>

PCR 产物加入不含 Proteinase K 的 Loading Buffer 进行电泳时, 在胶孔有 DNA 片段挂孔现象, 在目的片段位置没有条带。PCR 产物加入含有 Proteinase K 的 Loading Buffer 进行电泳时, 在目的片段位置有条带。

使用 MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 对小鼠尾和耳进行 Direct PCR, 可以得到很好的扩增效果。

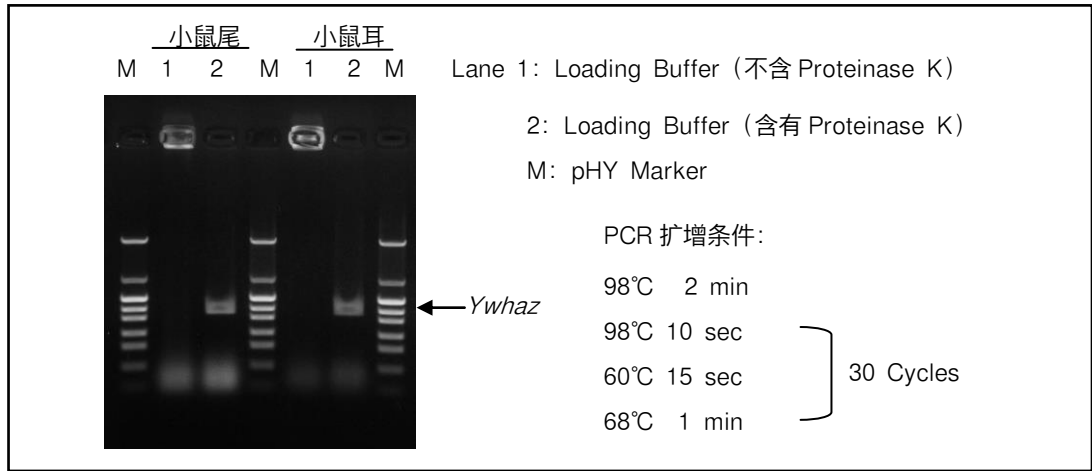


图 3. 小鼠尾及耳的 Direct PCR

● Troubleshooting

现象	问题点	对策
无扩增产物生成, 扩增效率不高	引物的 Tm 值不合适	请参考“Primer 设计”部分的要求设计引物
	使用了 2 Step PCR 方法	请尝试 3 Step PCR 方法
	使用了 3 Step PCR 方法	请尝试 2 Step PCR 方法 (3 Step PCR 没有扩增, 有时使用 2 Step PCR 可以扩增)
	退火温度高	每间隔两度降低退火温度进行条件摸索
	循环圈数少	循环圈数最大可以设定至 40 圈
	样品添加量或提取方法的问题	减少或增加样品添加量, 或者研讨样品的提取方法
有非特异性片段生成	引物的 Tm 值不合适	请参考“Primer 设计”部分的要求设计引物
	使用了 3 Step PCR 方法	请尝试 2 Step PCR 方法
	循环圈数多	循环圈数在 25-30 圈范围内进行研讨
	样品提取方法的问题	研讨样品的提取方法

● 关联产品

MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 (Code No. R076A/B)
MightyAmp™ Genotyping Kit (Code No. R074A)
Tks Gflex™ DNA Polymerase (Code No. R060A/B)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Gradient* (Code No. TP600)
Agarose L03 [TAKARA] (Code No. 5003/5003B)
T-Vector pMD20 (Code No. 3270)
T-Vector pMD19 (Simple) (Code No. 3271)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)
Lysis Buffer for PCR (Code No. 9170A)
SimplePrep™ reagent for DNA (Code No. 9180)
Plant DNA Isolation Reagent (Code No. 9194)
Proteinase K (Code No. 9034)
6×Loading Buffer (Code No. 9156)

MightyAmp, Tks Gflex, SimplePrep, 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