

Code No. R006A

研究用

TaKaRa

TaKaRa Z-Taq™

说明书

目 录

| 内 容 | 页 码 |
|---------------------------------|-----|
| ● 制品说明 | 1 |
| ● 制品内容 | 1 |
| ● 特 点 | 1 |
| ● 参数优化 | 1 |
| ● 反应液配制 | 3 |
| ● 阻害物质对 <i>TaKaRa Z-Taq</i> 的影响 | 4 |
| ● Troubleshooting | 5 |

● 制品说明

本制品是用于高速 PCR 的耐热性 DNA 聚合酶。其反应速度约为 *Taq* DNA 聚合酶的 5 倍，约 20 分钟可以扩增 1 kb 片段。*TaKaRa Z-Taq* 因其良好的扩增反应性，可用于扩增人基因组 DNA、 λ DNA 和细菌 DNA。通过增加反应循环数（~50 cycles）也相应地提高了检测灵敏度。使用 *TaKaRa Z-Taq* 进行 PCR 反应可大大节省反应时间，适合于大量样品的 PCR 反应。本制品在 PCR 反应方面具有三大优点：高速、高反应性、高灵敏度。

● 制品内容

| | |
|--|-------------|
| <i>TaKaRa Z-Taq</i> (2.5 U/ μ l) | 200 U |
| 10 \times <i>Z-Taq</i> Buffer (Mg ²⁺ plus, 30 mM) | 800 μ l |
| dNTP Mixture (2.5 mM each) | 800 μ l |

[*TaKaRa Z-Taq* 的贮存溶液]

| | |
|--------|------------------|
| 20 mM | Tris-HCl (pH8.0) |
| 100 mM | KCl |
| 0.1 mM | EDTA |
| 1 mM | DTT |
| 0.5% | Tween 20 |
| 0.5% | Nonidet P-40 |
| 50% | Glycerol |

● 特 点

- 反应速度：约为 *Taq* DNA Polymerase 的 5 倍
- 耐热性能：92.5°C 时半衰期 > 130 min
- 扩增片段大小：Human genome DNA < 17.5 kb
E.coli DNA < 20 kb
 λ DNA < 20 kb
- 反转录酶活性：与 *Taq* DNA Polymerase 相同
- Exonuclease 活性：3' \rightarrow 5' 活性+
5' \rightarrow 3' 活性±
- 扩增产物末端：DNA 片段 3' 端带有 "A"，可直接克隆于 T-Vector 中
- 最适反应温度（链延伸温度）：70°C 左右

● 参数优化

为了获得成功的 PCR 结果，优化 *TaKaRa Z-Taq* 的 PCR 反应参数很重要。

1. PCR 反应条件（反应体系：50 μ l）

◆ 两步法 PCR (Shuttle PCR)

| | | |
|------|------------------------|----------------|
| 98°C | 1~5 sec.* ¹ | } 25~30 cycles |
| 68°C | X sec.* ² | |

*1：变性条件依据使用的 PCR 仪进行设定。

*2：根据扩增片段大小来设置。推荐时间为 10~20 sec./kb。

例如 (Shuttle PCR) :

扩增2 kb片段时

98°C 1 (或 5) sec.
68°C 20 sec. } 30 cycles

扩增8 kb片段时

98°C 1 (或 5) sec.
68°C 80 sec. } 30 cycles

扩增20 kb片段时

98°C 1 (或 5) sec.
68°C 200 sec. } 30 cycles

- ◆ 3步法PCR设置的延伸时间为 *Taq* DNA polymerase的1/3-1/5。

例如 (3-step PCR) :

扩增2 kb片段时

98°C 1 (或 5) sec.
55°C 1~10 sec.
72°C 10~20 sec. } 30 cycles

扩增 8 kb 片段时

98°C 1 (或 5) sec.
55°C 1~10 sec.
72°C 80 sec. } 30 cycles

扩增 20 kb 片段时

98°C 1 (或 5) sec.
55°C 1~10 sec.
72°C 200 sec. } 30 cycles

注意: 1) 无论是两步法 PCR 还是三步法 PCR, 过长的 incubation 时间会导致 Smear 条带。

2) 两步法 PCR 获得的结果因引物序列或模板长度不理想时, 可以再试试三步法 PCR。

2. 模板 DNA

模板 DNA 的适合添加量如下:

Human genomic DNA 50~500 ng/50 μ l PCR

E. coli genomic DNA 1~100 ng/50 μ l PCR

λ DNA 50 pg~5 ng/50 μ l PCR

Plasmid DNA 0.5~50 pg/50 μ l PCR

模板 DNA 的适合添加量可依据模板纯度适当改变。

3. 引物

适合的浓度: 0.2~1 μ M

引物长度: 20~30 mers

| 引物 | PCR 扩增 |
|--------------------|--------|
| 5' 末端标记 FITC 的引物 | 可以 |
| 5' 末端标记 ROX 的引物 | 可以 |
| 5' 末端标记 Biotin 的引物 | 可以 |
| 引物中含有 dUTP | 可以 |
| 引物中含有 dITP | 不可以 |

4. dNTP 和 Mg²⁺

由于 dNTP 具有螯合作用，dNTP 浓度过高就会使实际参与反应的 Mg²⁺ 浓度下降。

Mg²⁺ 3 mM (终浓度)
dNTPs 200 μM each (终浓度)

Mg²⁺ 浓度过高会产生非特异性扩增，Mg²⁺ 浓度过低会降低反应性能。螯合剂（如 EDTA）的存在会降低实际参与反应的 Mg²⁺ 浓度。Mg²⁺ 浓度比 dNTP 的总浓度高得多。每种 dNTP 浓度是一致的，如果不一致，那么可能会发生错配。

5. 各种底物的掺入

| 底物 | 扩增情况 |
|----------------|------|
| dUTP | - |
| Biotin-16-dUTP | - |
| Biotin-14-dATP | - |
| 7-deaza-dATP | + |
| 7-deaza-dGTP | + |
| Methyl-dCTP | - |
| DIG-dUTP | - |

| 底物 | 扩增情况 |
|-----------------------------|------|
| dUTP: dTTP = 1: 1 | - |
| Biotin-16-dUTP: dTTP = 1: 1 | - |
| Biotin-14-dATP: dATP = 1: 1 | + |
| 7-deaza-dATP: dATP = 1: 1 | + |
| 7-deaza-dGTP: dGTP = 1: 1 | + |
| Methyl-dCTP: dCTP = 1: 1 | + |
| DIG-dUTP: dTTP = 1: 1 | - |

6. 反应液体积

推荐的反应液体积为 50 μl。

变性的温度和时间根据反应体系的改变进行优化调整。

● 反应液配制

所有试剂都应该放在冰上融解，反应液配制也建议在冰上操作。这样可以避免由于引物错配产生的非特异扩增。

按照以下顺序添加试剂，然后使用移液器轻轻混匀。

- 1) H₂O
- 2) 10 × Z-Taq Buffer (Mg²⁺ plus)
- 3) dNTP Mixture
- 4) Template DNA
- 5) TaKaRa Z-Taq
- 6) Primer 1
- 7) Primer 2

反应液配制后立即进行 PCR 反应。

* 如果需要同时做多个反应，建议将 TaKaRa Z-Taq、10 × Z-Taq Buffer 和 dNTP Mixture 制备成预混液。

PCR 反应液组成 (共 50 μl)

| | |
|--|-----------------------|
| TaKaRa Z-Taq (2.5 U/μl) | 0.5 μl |
| 10 × Z-Taq Buffer(Mg ²⁺ plus) | 5 μl |
| dNTP Mixture (各 2.5 mM) | 4 μl (终浓度: 200 μM) |
| Template | <1 μg |
| 引物 1 | 10 pmol (终浓度: 0.2 μM) |
| 引物 2 | 10 pmol (终浓度: 0.2 μM) |
| 灭菌水 | up to 50 μl |

● 有害物质对 *TaKaRa Z-Taq* 的影响

在 50 μ l 反应液中，以 100 pg 的 *E. coli* genomic DNA 为模板，扩增 2 kb 目的片段来测定有害物质的影响。

反应条件如下：

| | | | |
|------|---------|---|-----------|
| 98°C | 5 sec. | } | 35 cycles |
| 66°C | 20 sec. | | |

通过扩增片段量来比较每种有害物质的影响。对照反应中没有有害物质。

| 有害物质 | 终浓度 | 对 PCR 反应的影响 |
|--------------|--------|-------------|
| Formamide | 1% | 不影响 |
| | 5% | 完全抑制 |
| | 10% | 完全抑制 |
| DMSO | 1% | 不影响 |
| | 5% | 50%抑制 |
| | 10% | 完全抑制 |
| Nonidet P-40 | 0.01% | 80 - 90%抑制 |
| | 0.1% | 80 - 90%抑制 |
| Tween20 | 0.1% | 不影响 |
| | 1% | 不影响 |
| Triton X-100 | 0.1% | 不影响 |
| | 1% | 完全抑制 |
| SDS | 0.01% | 完全抑制 |
| | 0.1% | 完全抑制 |
| Glycerol | 1% | 不影响 |
| | 5% | 90%抑制 |
| PEG#6000 | 0.1% | 不影响 |
| | 1% | 不影响 |
| EDTA | 0.5 mM | 不影响 |
| | 5 mM | 完全抑制 |
| LB broth | 1% | 不影响 |
| | 10% | 90%抑制 |
| DTT | 1 mM | 不影响 |
| | 10 mM | 不影响 |
| Gelatin | 0.01% | 不影响 |
| | 0.1% | 可能出现 Smear |
| BSA | 0.01% | 不影响 |
| | 0.1% | 不影响 |

● Troubleshooting

无扩增或产量低时

| 可能的原因 | 建议 |
|--------------------|--|
| 延伸时间可能过短 | 于68~72°C设置10~20 sec./kb。 |
| 退火温度可能过高 | 以2°C为间隔降低退火温度，或进行touch down PCR。 |
| 退火时间可能过短 | 设置为0.5~1 min.。 |
| 模板GC含量高或模板具有复杂二级结构 | 提高变性温度或延伸时间，如98°C，1~10 sec.或94°C，10~30 sec.。 |
| 引物不适合 | <ul style="list-style-type: none"> · 提高引物纯度。 · 调整引物的GC含量为~50%。 · 设计更长的引物(20~30 mer)。 · 设计的引物在3'末端不可以互补。 |
| 引物浓度过低 | 引物终浓度在0.2~1 μM。 |
| 变性条件不合适 | 98°C，1~10 sec.或94°C，10~30 sec.。 |
| 模板纯度过低 | 再次纯化。 |
| 模板量过低 | 添加适合量的模板 Human genomic DNA ~ 500 ng/50 μl PCR <i>E. coli</i> genomic DNA ~ 100 ng/50 μl PCR λ DNA ~ 5 ng/50 μl PCR Plasmid DNA ~ 50 pg/50 μl PCR |
| PCR循环数不够 | 进行PCR ~50 cycles.。 |

出现非特异性扩增

| 可能的原因 | 建议 |
|-----------|--|
| 退火温度可能过低 | <ul style="list-style-type: none"> · 以2°C为间隔提高退火温度。 · 进行touch down PCR。 |
| 模板DNA加量过多 | 添加适合量的模板 Human genomic DNA ~ 500 ng/50 μl PCR <i>E. coli</i> genomic DNA ~ 100 ng/50 μl PCR λ DNA ~ 5 ng/50 μl PCR Plasmid DNA ~ 50 pg/50 μl PCR |
| PCR循环数过多 | <ul style="list-style-type: none"> · 在50 cycles内进行PCR。 · 以2 cycles为间隔减少循环数。 |
| 引物量过多 | 0.2~1 μM (终浓度)。 |
| 引物可能过长 | 设计引物长度低于30 mer.。 |

出现 Smear

| 可能的原因 | 建议 |
|-----------|--|
| 延伸时间过长 | 于68°C~72°C设置10~20 sec./kb。 |
| PCR循环数过多 | 在50 cycles内进行PCR。 |
| 模板DNA加量过多 | 添加适合量的模板 Human genomic DNA ~ 500 ng/50 μl PCR <i>E. coli</i> genomic DNA ~ 100 ng/50 μl PCR λ DNA ~ 5 ng/50 μl PCR Plasmid DNA ~ 50 pg/50 μl PCR |

TaKaRa Z-Taq is a trademark 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: <http://www.takarabiomed.com.cn>