

Code No. R074A

研究用

TaKaRa

MightyAmp™
Genotyping Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● Primer 设计	1
● 操作流程	1
● PCR 扩增产物的末端构造	2
● 使用 MightyAmp Genotyping Kit 的实验例	3
● Troubleshooting	4
● 关联产品	5

● 制品说明

MightyAmp Genotyping Kit 是一种从小鼠尾等动物组织或植物组织中简单、快速地提取 DNA 后直接用于 PCR 扩增的试剂盒。

试剂盒中含有提取 DNA 的专用 Buffer 和 Proteinase K，可直接从动植物组织中提取 DNA。PCR 反应中使用了粗提样品显示出很强扩增能力的 MightyAmp DNA Polymerase，可对普通 PCR 酶难以扩增的含有 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。特别适合 2 kb 左右片段的扩增，并对低浓度起始的模板也能进行很好的扩增。本制品也适用于基因型的判定。

同时，为了减轻混入杂质的影响，PCR 扩增产物电泳时使用专用 5×Loading Dye 进行 Agarose Gel 电泳，在短时间内可检测出 PCR 扩增产物。

MightyAmp DNA Polymerase 是使用单克隆抗体的 Hot-Start 型 PCR 扩增用 DNA 聚合酶。98℃高温加热前，抗体与酶结合，抑制聚合酶活性，可以抑制非特异性扩增。

● 制品内容 (50 μl 反应, 200 次量)

1. MightyAmp DNA Polymerase (1.25 U/μl)	200 μl
2. 2 × MightyAmp Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus) *	1.25 ml × 4
3. 5 × Loading Dye	1 ml × 3
4. Extraction Buffer	20 ml
5. Proteinase K (20 mg/ml)	200 μl

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

● 保存:

-20℃。

Extraction Buffer 开封后请于室温 (约 15–25℃) 保存。

● Primer 设计

请尽量使用专业软件进行引物设计，如 OLIGO Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights, Inc.)。

引物 Tm 值 (按以下公式进行计算*) 设计 >60℃。

Tm 值 (°C) = 2 (A、T 数) + 4 (G、C 数) - 5

● 操作流程

A. 从组织材料中提取 DNA (在室温下操作)

1. 将组织材料*¹ 放入已加入 100 μl Extraction Buffer 的 PCR Tube 中。

【注意】Extraction Buffer 出现沉淀时，加热至 60℃，缓慢搅拌溶解。

2. 将 1 μl Proteinase K (20 mg/ml) 加入到 Tube 中。
3. 60℃加热 5 分钟后，98℃再加热 2 分钟，然后降至室温*²。
4. 室温下离心，使组织材料沉淀，上清为 PCR 的模板 (Extraction Buffer 提取液)*³。

*1 组织材料的添加标准

- ◆ 小鼠尾 ≤ 2 mm
- ◆ 小鼠耳 ≤ 5 mm²
- ◆ 小鼠脏器 ≤ 30 mm²
- ◆ 植物的叶 ≤ 5 mm²

*2 4℃时会产生沉淀物，操作中请保持室温(25℃)。

* 3 需要保存时，将上清移至新的 Tube 中于-20℃保存。

使用前请将 Extraction Buffer 提取液溶解至室温，确认溶液中无沉淀物。

B. PCR 反应液配制

试剂	使用量	终浓度
2×MightyAmp Buffer	25 μl	1×
Primer 1	15 pmol	0.3 μM
Primer 2	15 pmol	0.3 μM
Extraction Buffer 提取液 ^{*4}	≤2.5 μl	
MightyAmp DNA Polymerase	1 μl	1.25 U/50 μl
灭菌水	Up to 50 μl	
Total	50 μl	

* 4 Extraction Buffer 提取液必须达到室温后再使用。建议 Extraction Buffer 提取液的添加量在反应体系的 1/20 以下。其他试剂使用前请置于冰上。

C. 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℃。

[3 Step PCR]

98℃ 2 min ^{*5}

↓

98℃ 10 sec

60℃ 15 sec

68℃ 1 min/kb

} 30~40 Cycles

or

[2 Step PCR]

98℃ 2 min ^{*5}

↓

98℃ 10 sec

68℃ 1 min/kb

} 30~40 Cycles

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

D. PCR 扩增产物的电泳

◆ 电泳前将 5 × Loading Dye 和 PCR 产物按照 1: 4 比例混合。

◆ 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。

● PCR 扩增产物的末端构造

使用 MightyAmp DNA Polymerase 扩增得到的 PCR 产物 3' 端几乎都附有一个“A”碱基，可直接克隆于 T-Vector (pMD20: Code No. 3270, pMD19 (Simple): Code No. 3271, etc.) 中。使用 Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)对 PCR 产物进行末端平滑化和磷酸化后，可克隆于平滑末端载体中。

● 使用 MightyAmp Genotyping Kit 的实验例

以下是使用本制品从各种生体中提取 DNA 后进行 PCR 反应的实验例。

1. 小鼠尾的 DNA 提取及 PCR 扩增。

<方法>

取小鼠尾前端约 2 mm，按照【从组织材料中提取 DNA】提取后离心，取不同量上清加入到 50 μ l 的 PCR

反应体系中，进行小鼠 *Ywhaz* 基因(1 kb)的 PCR 扩增。PCR 产物各取 4 μ l 加入 1 μ l 的 5 $\times$ Loading Dye 混合后进行电泳。

<结果>

使用 MightyAmp Genotyping Kit 可以简便地从小鼠尾中提取 DNA 进行 PCR 扩增，可以得到很好的扩增效果。

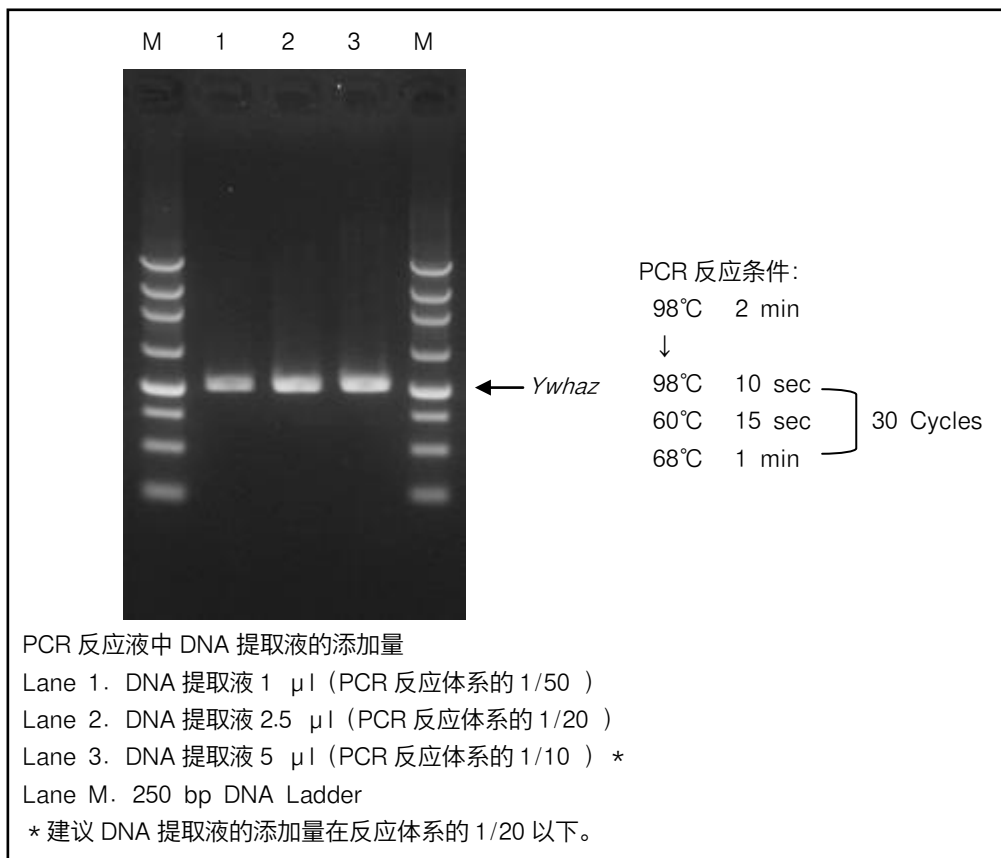


图 1. 小鼠尾的 PCR 扩增结果

2. 植物叶片的 DNA 提取及 PCR 扩增

<方法>

用直径 2 mm 的打孔机取西红柿的叶片，按照【从组织材料中提取 DNA】提取后离心，取不同量上清加入到 50 μ l 的 PCR 反应体系中，进行西红柿 *cox1* 基因 (1 kb) 的 PCR 扩增。PCR 产物各取 4 μ l 加入 1 μ l 的 5 $\times$ Loading Dye 混合后进行电泳。

<结果>

使用 MightyAmp Genotyping Kit 可以简便地从西红柿叶片中提取 DNA 进行 PCR 扩增，可以得到很好的扩增效果。

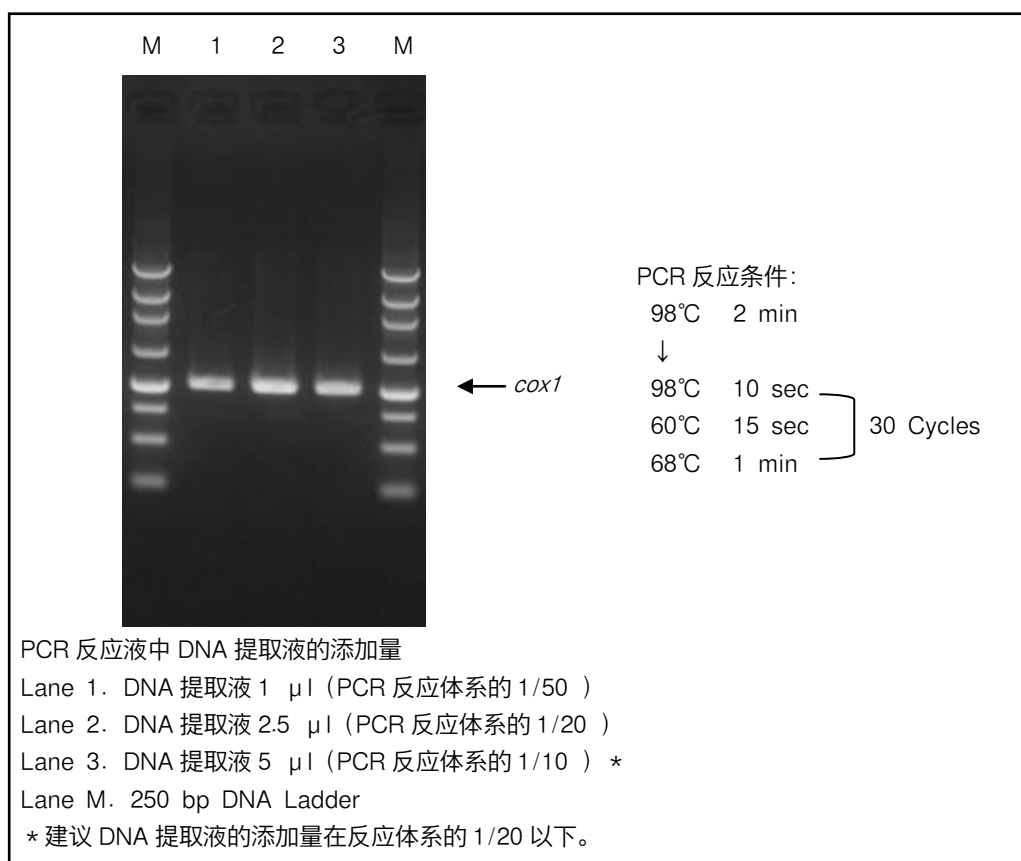


图 2. 西红柿叶片的 PCR 扩增结果

● Troubleshooting

现象	问题点	对策
无扩增产物或 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2°C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 Cycles。
	样品过量或提取方法的问题	增加或减少DNA提取液量。 增加或减少组织样品量。
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 Cycles范围内进行研讨。

● 关联产品

MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 (Code No. R076A/B)
MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.2 (Code No. R071A/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/B)
PrimeGel™ Agarose PCR–Sieve (Code No. 5810A)
T–Vector pMD20 (Code No. 3270)
T–Vector pMD19 (Simple) (Code No. 3271)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)

MightyAmp, Thermal Cycler Dice, and PrimeGel 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: <http://www.takarabiomed.com.cn>

v201808Da