

版本号: M16B01V1.0



TEL: 400-999-6126

WEB: www.abclonal.com.cn

# Taq DNA Polymerase (Mg<sup>2+</sup> Plus Buffer)

目录号: RK20600

规格: 1,000 U / 5,000 U / 10,000 U

浓度: 5,000 U/mL

Taq DNA Polymerase (5,000 U/mL)	RM20310
10X PCR Reaction Buffer, Mg <sup>2+</sup> plus	RM20101

产品组成:

## 产品说明

Taq DNA 聚合酶是重组表达的热稳定聚合酶, 具有 5'-3' 聚合酶活性、5'-3' 核酸外切酶活性和 5' 分叉 DNA 单链内切酶活性。本产品可以适用于多种模板, 对 dUTP、dITP 和荧光标记的核苷酸也有很好的耐受。

## 产品来源

*Thermus aquaticus* YT-1 的 Taq DNA 聚合酶基因在大肠杆菌中诱导表达并分离纯化得到。

## 活性定义

1 活性单位(U)指在 75°C 30 min 内, 将 10 nmol 脱氧核苷酸掺入到酸不溶性物质所需的酶量。

## 反应条件

1X PCR Reaction Buffer, Mg<sup>2+</sup> plus

## 1X PCR Reaction Buffer, Mg<sup>2+</sup> plus 组成

20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100, pH 8.8 @ 25°C

## 保存温度

-20°C

## 酶存储液

10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.5% Tween 20, 0.5% NP-40, 50% Glycerol, pH 7.4 @ 25°C

## 理论分子量

94 kD

## 5'-3' 核酸外切酶活性

有

## 3'-5' 核酸外切酶活性

无

## 产物末端

3' 含有单 dA 核苷酸突出末端

## 出错率

约 285 X 10<sup>-6</sup> 碱基

## 操作说明

### 推荐的 PCR 反应

推荐冰上配制反应体系, 然后将该体系快速转移至已预热到 98°C 的 PCR 仪中。

组分	加入量 (25 μL 体系)	加入量 (50 μL 体系)
ddH <sub>2</sub> O	to 25 μL	to 50 μL
10X PCR Buffer	2.5 μL	5 μL
10 mM dNTPs	0.5 μL	1 μL
上游引物 (10 μM)	0.5 μL	1 μL
下游引物 (10 μM)	0.5 μL	1 μL
模板 DNA	Variable	Variable
Taq DNA Polymerase	0.125 μL	0.25 μL

### 推荐的反应体系 (以 25 和 50 μL 反应体系为例)

注: 温和混匀反应体系, 如有必要可以通过短暂快速离心将试剂收集到管底。若使用无热盖的 PCR 仪, 可以在反应体系表面覆盖一层矿物油防止溶液蒸发。

### 推荐的 PCR 反应程序

温度	时间	循环数
95°C	30 s	1
95°C	15-30 s	
45-68°C	15-60 s	30
68°C	1 kb/min	
68°C	5 min	1
4-10°C	∞	

# PCR 基本原则

## 1. 模板

使用高质量纯化的 DNA 模板可以增加 PCR 的成功率。

推荐的 DNA 模板量 (50  $\mu$ L 反应体系)

DNA 类型	模板量
基因组 DNA	1 ng-1 $\mu$ g
质粒或病毒 DNA	1 pg-1 ng

## 2. 引物

寡核苷酸引物长度通常在 20-40 nt 之间, 理想的 GC 含量为 40-60%。可以使用软件 (例如 Primer 3) 设计和分析引物。PCR 反应体系中每条引物的终浓度可以在 0.05-1  $\mu$ M 范围内调整, 一般使用浓度在 0.1-0.5  $\mu$ M 之间。

## 3. Mg<sup>2+</sup>和添加剂

在 *Taq* DNA 聚合酶的大部分 PCR 反应体系中, 最优的 Mg<sup>2+</sup>浓度应在 1.5-2.0 mM 范围之内。对于一些扩增困难的样本, 例如高 GC 的 DNA 样本, 可能需要在 PCR 反应体系中加入添加剂, 例如 DMSO 或甲酰胺等。

## 4. dNTPs

PCR 反应体系中 dNTPs 一般是四种终浓度为 200  $\mu$ M 的脱氧核苷酸混合物。

## 5. *Taq* DNA 聚合酶浓度

在 PCR 反应体系中一般推荐 *Taq* DNA 聚合酶浓度是 25 U/mL (即 1.25 U/50  $\mu$ L)。但在某些特定的应用中, 最优的 *Taq* DNA 聚合酶浓度范围可能会在 5-50 U/mL (即 0.25-2.5 U/50  $\mu$ L) 之间。

## 6. 变性

95°C 预变性 30 s 可使大多数纯化的 DNA 模板能充分变性, 对复杂的模板, 例如高 GC 序列, 需要将 95°C 的预变性时间延长到 2-4 min 以充分变性 DNA 模板。对于菌落或菌液 PCR, 推荐 95°C 预变性 5 min 以充分裂解菌体。在扩增循环中, 推荐的变性条件是 95°C 反应 15-30 s。

## 7. 退火

退火时间一般推荐 15-60 s, 退火温度与引物对的 T<sub>m</sub> 值相关, 温度一般设置在 45-68°C 之间。退火温度可以通过 PCR 温度梯度实验进行优化, 一般从 T<sub>m</sub> 值 5°C 以下开始设置温度梯度。

## 8. 延伸

推荐的延伸温度是 68°C, 延伸时间与扩增片段长度有关, 可以按照 1 kb/min 的扩增速度计算扩增时间; 在 PCR 循环结束之后, 需要在 68°C 条件下再延伸 5 min。

## 9. 循环数

一般进行 25-35 个循环即可得到充足的 PCR 产物, 若检测低拷贝基因, 可将循环数增至 45。

## 10. 二步法 PCR

当引物的退火温度大于 68°C 时, 推荐二步法 PCR。

二步法 PCR 反应程序

温度	时间	循环数
95°C	30 s	1
95°C	15-30 s	30
65-68°C	1 kb/min	
65-68°C	5 min	1
4-10°C	$\infty$	

## 11. PCR 产物

使用 *Taq* DNA 聚合酶产生的 PCR 产物 3' 端含有单 dA 核苷酸突出, 因此该 PCR 产物可以用于 dT / dU 末端载体的连接。