

产品简介

本产品由克隆有 *Thermus aquaticus* DNA Polymerase 基因的大肠杆菌表达并经过多步纯化精制得到，不含核酸内切酶、核酸外切酶以及细菌 DNA。Taq DNA Polymerase 具有 5'→3'聚合酶活性和 5'→3'外切酶活性，但无 3'→5'外切酶活性。PCR 产物的 3'端带 A，可克隆至 T 载体，并适用于本公司 CloneUFO®快速克隆试剂盒。

产品组成

组分	P101 (100 U)	P101 (1,000 U)	P101 (5,000U)	P101 (10,000U)
10 × Taq Buffer (Mg ²⁺ plus)	1 ml	4 × 1 ml	5 × 1,000U	10 × 1,000U
Taq DNA Polymerase (2.5 U/μl)	40 μl	400 μl		

储存条件

-20℃保存，于-20~0℃运输。▲避免反复冻融。

单位定义

用活化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物，74℃ 30 min 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)。

质量控制

核酸外切酶残留检测：

20 U 本品和 0.6 μg λ-HindIII 在 74℃ 下孵育 1 h，DNA 的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测：

20 μl 反应体系，10 U 本品和 1 μg λDNA，37℃ 温育 4 h，DNA 的电泳谱带无变化。

RNase 残留检测：

20 U 本品和 1 μg Hela 细胞总 RNA 在 37℃ 下孵育 30 min，RNA 的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌残留 DNA 残留检测：

50 μl 体系中，以 ddH₂O 为模板，扩增 *E. coli* 16 s rDNA 基因。30 个循环后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，染色，无扩增条带。

功能检测：

以 10 ng λDNA 为模板扩增 30 个循环，1% 琼脂糖凝胶电泳，染色，可见各自单一的目的条带。

实验方案

1. 反应体系配制：

组分	用量
ddH ₂ O	to 50 μ l
10 \times Taq Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
25 mM MgCl ₂ * ¹	optional
dNTP Mix (10 mM each)	1 μ l
5 \times PCR Enhancer* ²	optional
模板 DNA* ³	optional
引物 1 (10 μ M)	2 μ l
引物 2 (10 μ M)	2 μ l
Taq DNA Polymerase (2.5 U/ μ l)	1 μ l

*1 对于大多数 PCR 反应, Mg²⁺最佳终浓度为 1.5 ~ 2 mM。体系中已含有终浓度为 2 mM 的 Mg²⁺, 如有需要, 可用 25 mM MgCl₂ 以 0.2 ~ 0.5 mM 为间隔向上摸索 Mg²⁺最佳使用浓度。

*2 推荐仅当扩增片段 GC 含量 > 60% 且优化条件也无法正常扩增时使用; 可能会降低保真度。

*3 不同模板最佳反应浓度有所不同, 下表为 50 μ l 反应体系推荐模板使用量:

模板种类	使用量
人基因组 DNA	0.1 ~ 1 μ g
大肠杆菌基因组 DNA	10 ~ 100 ng
λ DNA	0.5 ~ 10 ng
质粒 DNA	0.1 ~ 10 ng

*4 酶量可在 0.5 ~ 1.5 μ l 之间调整。加大酶量在通常情况下可以提高扩增产量, 但有可能使特异性下降。

2. PCR 反应条件设置：

步骤	温度	时间	阶段	循环数
预变性	94°C	5 min	Stage 1	Reps: 1
变性	94°C	30 sec		
退火	55°C*	30 sec	Stage 2	Reps: 25 ~ 35
延伸	72°C	60 sec/kb		
彻底延伸	72°C	7 min	Stage 3	Reps: 1

* 退火温度需要根据引物退火温度调整, 一般设置成低于引物退火温度 1 ~ 2°C 即可。

引物设计注意事项

1. 引物 3' 端最后一个碱基选择 C 或 G;
2. 引物 3' 端最后 8 个碱基应避免出现连续错配;
3. 引物 3' 端尽量避免出现发夹结构;
4. 引物 T_m 值控制在 55°C ~ 65°C 之间;
5. 引物额外附加序列, 即与模板非配对序列, 不应参与引物 T_m 值计算;
6. 引物 GC 含量控制在 40% ~ 60% 之间;
7. 正向引物和反向引物 T_m 值以及 GC 含量尽可能一致。