

Taq DNA Polymerase (with dNTP)

P101-d

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 | 100 U | 1,000 U | 5,000U | 10,000U |
|---|-------|----------|------------|-------------|
| 10 × Taq Buffer (Mg ²⁺ plus) | 1 ml | 4 × 1 ml | | |
| Taq DNA Polymerase (2.5 U/μl) | 40 μl | 400 μl | 5 × 1,000U | 10 × 1,000U |
| dNTP Mix (10 mM each) | / | 600 μl | | |

储存条件

-20°C 保存，于 -20 ~ 0°C 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°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)。

质量控制

核酸外切酶残留检测：20 U 本品和 0.6 μg λ-Hind III 在 74°C 下孵育 1 小时，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°C 温育 4 h，DNA 的电泳谱带无变化。

RNase 残留检测：20U 本品和 1 μg Hela 细胞总 RNA 在 37°C 下孵育 30min，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

| | |
|--|---------------|
| 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:

| | |
|---------------|---------------|
| 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

| | | |
|-------|------------|-----------------|
| 94°C | 5 min(预变性) | |
| 94°C | 30 sec | 30-35 cycles |
| 55°C* | 30 sec | |
| 72°C | 60 sec/kb | |
| 72°C | 7min(彻底延伸) | |

* 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。