

## Taq DNA Polymerase

### 产品组成

|                                    |         |         |
|------------------------------------|---------|---------|
| Cat. No.                           | 8004050 | 8004250 |
| Taq DNA Polymerase (5U/μl)         | 50 μl   | 250 μl  |
| 10 × PCR Buffer(Mg <sup>2+</sup> ) | 0.5 ml  | 1 ml ×3 |
| ddH <sub>2</sub> O                 | 1 ml    | 1 ml ×3 |
| 说明书                                | 1 份     | 1 份     |

### 产品储存与有效期

- 20℃保存有效期为两年以上。

### 技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: [technical@simgen.cn](mailto:technical@simgen.cn), 电话：400-0099-857。

### 产品介绍

Taq DNA Polymerase 是从含 *Thermus aquaticus* DNA Polymerase 基因的重组 E.coli 菌株中分离纯化的热稳定蛋白，分子量约 90 KD。具有 5'→3'聚合酶活性和双链特异性的 5'→3'外切酶活性，无 3'→5'外切酶活性。

Taq DNA Polymerase PCR 产物为 3'单个 A 粘末端，可直接与 TA 载体连接。

### 单位定义

74℃，30min，使 10 nm dNTP 掺入酸不溶性沉淀物所需要的酶量定义为 1 个活力单位。

活性检测条件：50 mM Tris-HCl (pH 9.0, 25℃), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM each dNTPs(包括 [3H]-Dttp), 200 μg/ml 活化的小牛胸腺 DNA 和 0.1 mg/ml BSA。

### 质量控制

SDS-PAGE 检测纯度大于 99%。经检测无外源核酸酶活性，PCR 方法检测无宿主 DNA 残留，能有效扩增人类基因组中的单拷贝基因。

### PCR 体系成分

- 模板 DNA 的纯度：很多残留的核酸提取试剂会影响 PCR 反应，包括蛋白酶、蛋白变性剂(比如 SDS、胍盐)、高浓度盐(KAc、NaAc、辛酸钠等)和高浓度 EDTA 等。纯度不高的模板（比如煮沸法获取的模板）用量请勿超过 PCR 反应体系的 1/10（比如 50 μl 反应体系中加入模板的体积不应超过 5 μl）。如果模板 DNA 纯度太差，可使用新景（Simgen）DNA 纯化试剂盒（Cat. No.2101050）对模板 DNA 进行纯化及浓缩。经新景（Simgen）DNA 纯化试剂盒纯化后的模板使用量可多至 PCR 反应体系体积的 1/2。
- 模板 DNA 用量：极微量的 DNA 也可以作为 PCR 模板，但为保证反应的稳定性，50 μl 体系建议使用 104 拷贝以上的靶序列作为模板。模板 DNA 的推荐使用量：

人基因组 DNA：0.05 μg~0.5 μg/50 μl PCR反应体系

大肠杆菌基因组 DNA：10 ng~100 ng/50 μl PCR反应体系

λ DNA：0.5 ng~5 ng/50 μl PCR反应体系

质粒DNA：0.1 ng ~ 10 ng/50 μl PCR反应体系

如需用扩增产物作为模板再扩增，应至少将扩增产物稀释 1,000 至 10,000 倍后再作为模板使用，否则可能会出现涂抹条带或无特异性条带。

- 引物浓度：一般每条引物配制的浓度为 10 μM (50×)，工作浓度为 0.2 μM。引物过量可能会出现非特异性扩增，引物过少则可能会降低扩增效率。

## PCR 参数设置

1. 预变性：一般预变性为 94℃，1~5 min。变性温度过高或时间过长都会损失 Taq 酶的活性。
2. 退火：退火温度是 PCR 的关键，温度过高可能降低产量，温度过低可能会产生引物二聚体或非特异性扩增。初次尝试 PCR 扩增建议尝试低于 Tm 5℃ (如果两条引物 Tm 不同，参考较低的 Tm) 作为退火温度。一般引物合成公司会提供所合成引物的 Tm，也可以根据此公式估算引物 Tm： $Tm = 2^{\circ}C \times (A+T) + 4^{\circ}C \times (G+C)$ 。最佳退火温度需要进行梯度 PCR 确定。
3. 延伸：延伸温度通常为 72℃，延伸时间长短取决于目的 DNA 片段长度，以 1 kb/min 计算所需延伸时间，时间过长可能会导致非特异性增加。循环结束后，继续延伸 5~10 min，以获得完整的双链产物。
4. 循环数：一般使用 25~35 个循环，低拷贝模板可适当增加循环数。但过多的循环数可能会增加非特异性扩增，却不会增加特异性产物。

## 使用方法

1. 将 10×PCR Buffer、dNTPs、ddH<sub>2</sub>O、模板 DNA 和引物室温解冻，置于冰上。
2. 将解冻后的各个组分上下翻转混合均匀，按下表依次加入各组分分配制成 PCR 反应体系：

|                    |             |
|--------------------|-------------|
| ddH <sub>2</sub> O | (41.5-n) μl |
| 10×PCR Buffer      | 5 μl        |
| Primer 1 (10 μM)   | 1 μl        |
| Primer 2 (10 μM)   | 1 μl        |
| dNTPs (10 mM each) | 1 μl        |
| Taq DNA Polymerase | 0.5 μl      |
| 模板                 | n μl        |
| Total              | 50 μl       |

注意：

- 10×PCR Buffer 使用前必须充分混合均匀，否则将影响 PCR 效果。
- 上述例子为 50 μl 反应体系所加的组分，如果需要其他体积的反应体系，请按比例增减各组分。

3. 手指轻弹 PCR 反应管充分混匀，低速离心数秒使溶液沉降到管底。
4. PCR 反应循环设置举例

94℃ 3 min

94℃ 30 sec  
 ※55℃ 30 sec  
 § 72℃ 1 min

} 30 Cycles

72℃ 5 min

※以实际最佳退火温度为准。

§ 以 1 kb/min 计算。

5. 结果检测：取 5-10 μl 扩增产物直接进行琼脂糖电泳检测。

\* 琼脂糖凝胶浓度与线形 DNA 最佳分辨范围的关系：

| 琼脂糖浓度 | 最佳线形 DNA 分辨范围 |
|-------|---------------|
| 0.5%  | 1,000~30,000  |
| 0.7%  | 800~12,000    |
| 1.0%  | 500~10,000    |
| 1.2%  | 400~7,000     |
| 1.5%  | 200~3,000     |
| 2.0%  | 50~2,000      |