

## Long Taq DNA 聚合酶

货号: P1061, P1062, P1063, P1064

### 产品简介

Long Taq DNA 聚合酶是专门用于扩增长片段的嗜热 DNA 聚合酶, 其保真性是普通 Taq DNA 聚合酶的 3 倍左右。扩增片段的长度可达 20 kb (简单模板)。在扩增复杂模板 (如 GC-rich 或重复序列) 时, Long Taq DNA 聚合酶的扩增效率显著高于 Taq DNA 聚合酶。因此 Long Taq DNA 聚合酶适合 >5kb 的 DNA 片段及复杂模板的扩增。延伸速度为 20s/kb (70~75°C, 简单模板可达 5s/kb)。扩增产物具有两种末端: 平末端与 3'-dA。

### 产品组成

Component	P1061	P1062	P1063	P1064
	250U	250U	1,000U	1,000U
Long Taq DNA 聚合酶 (5U/μl) <sup>[1]</sup>	50 μl	50 μl	200 μl	200 μl
Long Taq DNA 聚合酶 (2.5U/μl) <sup>[1]</sup>	100 μl	100 μl	400 μl	400 μl
10× Long PCR Buffer I <sup>[2]</sup>	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml × 2	1.25 ml × 2
10× Long PCR Buffer II <sup>[2]</sup>	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml × 2	1.25 ml × 2
6× Loading Buffer <sup>[3]</sup>	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
dNTPs (2.5mM) <sup>[4]</sup>	-	1 ml	-	1 ml × 2
PCR Enhancer <sup>[5]</sup>	500 μl	500 μl	500 μl × 2	500 μl × 2

[1] 提供 5U/μl 和 2.5U/μl 两种活性单位的包装可供选择, 如无特别说明默认 5U/μl。

[2] 10× Long PCR Buffer I 是经典的 Long Taq DNA 聚合酶缓冲液, 扩增长片段特别是 10 kb 以上片段可保证获得最好的扩增效果。10× Long PCR Buffer II 是东盛自主研发的 Long Taq DNA 聚合酶缓冲液, 可以显著的提高酶的灵敏度与保真性, 在扩增低浓度模板时具有明显优势, 但是对长片段 (大于 13kb 片段) 的扩增效果不如 Buffer I。

[3] 6× Loading Buffer, 如有需要可单独购买 (Cat. #: M9041)。

[4] dNTPs 是 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 等摩尔混合物, P1061/P1063 不含 dNTPs, 如有需要请单独购买 (Cat. #: P9011/P9012/P9013)。

[5] PCR Enhancer 主要通过降低 DNA 模板的解链温度, 促进 DNA 模板的有效扩增, 增加 PCR 反应的灵敏度和特异性。可单独订购 (Cat. #: P9041)。

### 活性定义

一个活性单位 (U) 指用活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物, 在 72°C、30 min 内, 摄入 10 nmol 全核苷酸所需的酶量。

### 保存条件

-20°C 保存 2 年。

### 质量控制

纯度检测: 经质量检测, 产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测: PCR 方法检测无宿主残余 DNA, 能有效扩增人基因组中的单拷贝基因。

### 应用举例

#### 1. 配制反应体系

请于冰上配置反应体系, 体系大小与组分用量与添加顺序可调整:

Ordinal	Component	Volume (50 μl reaction volume)	Final concentration (50 μl reaction volume)
optional	PCR Enhancer	4-16 μl	-
1	10× Long PCR Buffer I/ II <sup>[1]</sup>	5 μl	1×
2	dNTPs (2.5mM)	4 μl	0.4 mM
3	upstream primer (10 μM) <sup>[2]</sup>	2 μl	0.4 μM
4	downstream primer (10 μM) <sup>[2]</sup>	2 μl	0.4 μM
5	Long Taq DNA 聚合酶 (5U/μl) <sup>[3]</sup>	0.5 μl	2.5U
6	template DNA <sup>[4]</sup>	1-4 μl	<1μg
7	超纯水 <sup>[5]</sup>	To 50 μl	-
optional	MgCl <sub>2</sub> (MgSO <sub>4</sub> ) <sup>[6]</sup>	Variable	-
optional	PCR Enhancer	4-16 μl	-

[1] 10× Long PCR Buffer I 和 10× Long PCR Buffer II 均已添加 Mg<sup>2+</sup>。

[2] 引物终浓度建议范围: 0.1-1 μM。特异性差时可降低浓度, 效率低时可提高浓度。

[3] 根据目的片段扩增的难易程度调整 DNA 聚合酶的用量。

[4] 不同模板最佳用量不同, 部分 DNA 模板建议用量如下表 (50 μl 反应体系)。

Template	人类基因组 DNA	λDNA	大肠杆菌基因组 DNA	质粒 DNA
Dosage	0.1μg-1μg	0.5ng-5ng	10ng-100ng	0.1ng-10ng

[5] 可单独订购超纯水 (Cat. #: P9021/P9022/P9023)。

[6] 可单独订购 25mM MgCl<sub>2</sub> (Cat. #: P9031)。

## 2. 设定反应程序进行 PCR 反应

Stage	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	94°C	3 min	1
Denaturation	94°C	30 sec	25-35
Annealing	55-68°C <sup>[1]</sup>	30 sec	
Extension	72°C	Variable <sup>[2]</sup>	
Final Extension	72°C	5-10 min	1

[1] 退火温度应根据 T<sub>m</sub> 值较低的引物来设。

[2] 延伸时间按 20s/kb 来设最佳 (简单模板可达 5s/kb)。

## 3. 分析结果

将产物与 loading buffer 混匀后进行琼脂糖凝胶电泳, 通过凝胶成像设备观察目的条带的扩增情况。如有需要, 可进行割胶回收。

无产物或产物量少的改进措施有: 1 调整退火温度; 2 减少抑制剂的影响, 如提取的基因组 DNA 中含有抑制扩增的成分, 需要高倍稀释 (1: 10000) 后使用; 3 采用乙醇沉降洗脱, 提高模板 DNA 的纯度; 4 使用 PCR 添加剂, 如 PCR Enhancer (Cat. #: P9041)、MgCl<sub>2</sub> (Cat. #: P9031) 等可提高产量。

## 操作注意事项

1 室温下 Long Taq DNA 聚合酶有一定的活性, 为避免发生非特异性扩增, 请于冰上配置反应体系, 并且最后添加 Long Taq DNA 聚合酶或模板 DNA。

2 Long Taq DNA 聚合酶的扩增产物有两种末端: 平末端和 3'-dA 突出末端。如要进行 TA 克隆, 请先进行加 A 反应, 以提高克隆效率。(加 A 反应: 参考如下体系, 72°C, 15-30min)

PCR (纯化) 产物	1-7 μl
10× Taq Buffer ( Mg <sup>2+</sup> Plus)	1 μl
dATP	0.2 mM
Taq DNA 聚合酶	5U
超纯水	To 10 μl

3 Long Taq DNA 聚合酶既可扩增长片段的 DNA, 也可扩增小片段 (几百 bp) 的 DNA。

4 PCR Enhancer 主要在 Long Taq DNA 聚合酶扩增无结果或扩增效果不好时使用。使用后退火温度需在原温度上降低 2-3°C, 否则会降低 PCR 效率, 建议使用 T<sub>m</sub> 值较高的引物。PCR Enhancer 能够与所有的耐热 DNA 聚合酶共同作用。

## 引物设计注意事项

引物长度一般在 15-30 个碱基之间; 上下游引物 3'末端避免互补, 避免出现 3 个以上重复的 G 或 C, 或出现发夹结构, 否则会产生非特异性扩增; GC 含量控制在 40-60%, 且上下游引物 GC 含量尽量接近; T<sub>m</sub> 值控制在 55-65°C 之间, 且上下游引物 T<sub>m</sub> 值尽量接近, 额外附加序列 (酶切位点、修饰等) 是非模板匹配序列, 不参与 T<sub>m</sub> 值计算。