

Taq DNA Polymerase

产品描述

Taq DNA 聚合酶是一种热稳定酶，能够在适当的缓冲体系中，基因特异性引物和 dNTPs 存在的情况下根据已解链的模板合成 DNA。我们的产品 Taq DNA Polymerase 是一种重组酶，分子量约为 94 kDa。

Taq DNA 聚合酶具有 5'→3'DNA 聚合酶的能力和微弱的 5'→3'核酸外切酶的能力，但没有 3'→5'外切酶的能力，这意味着在 3'末端会出现 dA 突出。利用该特性，可以将 dA 添加到平端的 3'末端，用于 TA 克隆。

在 PCR 反应中，Taq DNA 聚合酶的延伸率约为 1-2 min/kb，取决于基因组的复杂度，对于大多数模板，1 min/kb 就足够了。

如果模板具有更多的二级结构，更高的 GC 含量或长度超过 5 kb，您可能需要更多优化，或者您可以使用我们的产品 hyPerFusion™ high-fidelity DNA polymerase (Cat. No. K1032)。如果需要对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，可以使用我们的产品 SYBR Safe DNA Gel Stain (Cat. No. A8743)。

产品组分及储存条件

Components	1000 U	5000 U
Taq DNA Polymerase	200 µl	1 ml
5X PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	4 × 1 ml	20 × 1 ml

将所有组分存放在-20°C。

配置PCR反应体系

- 1) 完全解冻各个组分，在使用前混合并短暂离心。
- 2) 如下表配置您的PCR反应体系，或使用您自己的体系和条件（我们建议在冰上配置所有反应组分）。

Components	20 µl Reaction	50 µl Reaction	Final Concentration
5X PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	4 µl	10 µl	1X
2.5 mM dNTP Mix	1.6 µl	4 µl	200 µM each
10 µM forward primer	0.8 µl	2 µl	0.4 µM
10 µM reverse primer	0.8 µl	2 µl	0.4 µM
Template DNA	varies	varies	1-500 ng
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0.2 µl	0.5 µl	/
ddH ₂ O	Add to 20 µl	Add to 50 µl	/

***Note:**

- 对于较长的模板，可以提高 Taq 酶的用量。
- 模板可以是 cDNA，gDNA 或 λDNA。
- 对于多个反应，可以准备所有反应共有的组分混合物，以尽量减少移液误差，将适当的体积分配到每个管中。然后将不同的部分比如模板 DNA 或引物分别添加到管中。

3) 将反应管混合并短暂离心，设定反应后快速转移到PCR仪。

PCR循环条件

在 PCR 仪中进行如下反应：

Procedure	Temperature	Time	Cycles
Initial Denaturation	94°C	3 min	1 cycle
Denaturation	94°C	30 s	25-35 cycles
Annealing (请根据您的自身引物的 T _m 设置)	~55°C	30 s	
Extension	72°C	1 min/kb	
Final extension	72°C	5min	1 cycle
Hold	4°C	+∞	1 cycle

***Note:**

- 您可以使用从 T_m（两个 T_m 中较低的一个）减去 3-5°C 来确定退火温度。以下是简略的计算公式：
当引物短于 20 bp 时， $T_m (^{\circ}\text{C}) = 4 (G + C) + 2 (A + T)$ 。
当引物长于 20 bp 时， $T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 0.41 * (\text{GC 的} \%) - (675 / \text{长度})$
您也可以使用温度梯度来确定退火温度。
- 欲使用“热启动”方法，在 94°C 初始变性后，将反应保持在 80°C，在每个反应中加入 Taq DNA 聚合酶。然后，进入 3 步循环的程序。
- 对于一些高度复杂的基因组 DNA 或 cDNA 模板，延伸时间可以增加至 90 s/kb。

电泳

如果您需要对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳，可以使用我们的产品SYBR Safe DNA Gel Stain (Cat. No. A8743)。您可以立即将PCR产品用于下游应用，或将其储存在-20°C。

注意事项

- 1) PCR反应应在无杂质DNA污染的环境中进行。建议使用“干净”的专用自动移液枪和喷雾阻挡枪头。始终保持阳性/阴性对照DNA或其他模板与其他组分分开。使用的PCR管应不含核酸酶。
- 2) 所使用的寡核苷酸引物的长度通常为20-40个核苷酸，理想地引物具有约40-60%的GC含量。反应中每种引物的最终浓度可以是0.05-1 μM，通常使用0.1-0.5 μM。
- 3) Mg²⁺已添加到缓冲液中，不需要重复添加Mg²⁺。如果存在螯合剂（例如EDTA），则可能需要额外增加Mg²⁺。
- 4) 对于一些困难模板的扩增，如富含GC的序列，可以用添加剂如DMSO或甲酰胺来改善。
- 5) 对于诸如富含GC序列的困难模板，建议在PCR循环之前进行更长的初始变性，例如在95°C下5 min，以使模板完全变性。如使用菌落PCR，建议在95°C下进行最初的5 min变性。
- 6) 退火时间可以在15-60 s之间。退火温度基于引物的T_m，通常为45-72°C。退火温度可以通过进行温度梯度PCR来优化，例如，从比计算的T_m低5°C开始设置。
- 7) 建议的延伸温度为72°C。延伸时间通常为每1 min/kb。
- 8) 通常25-35个循环足够产生产物。低拷贝数目标可能需要多达45个循环。但太多的循环会导致非特异的条带。
- 9) 当引物的退火温度高于72°C时，建议采用两步法。

Procedure	Temperature	Time	Cycles
Initial Denaturation	94°C	3 min	1 cycle
Denaturation	94°C	30 s	variable
Extension	72°C	1 min/kb	
Final Extension	72°C	5 min	1 cycle
Hold	4°C	+∞	1 cycle

- 10) 由Taq DNA聚合酶产生的PCR产物在3'末端含有dA突出；因此，PCR产物可以连接到dT/dU-突出的载体上。

APEX BIO Technology

www.apexbt.com

7505 Fannin street, Suite 410, Houston, TX 77054.

Tel: +1-832-696-8203 | Fax: +1-832-641-3177 | Email: info@apexbt.com