Taq DNA Polymerase 说明书

产品组成

Cat. No.	8004050	8004250
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	50 μl	250 μl
10×PCR Buffer (Mg^{2+})	0.5 ml	1 ml ×3
ddH_2O	1 ml	1 ml ×3
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

－20℃保存，有效期两年。

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, 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℃，30 min，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 $MgCl_2$,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

1. 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，纯化后的模板使用量可多至 PCR 反应体系体积的 1/2。
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 10^4 拷贝以上的靶序列作为模板。模板 DNA 的推荐使用量：

基因组 DNA：	50 ng ~ 500 ng/50 μl PCR 反应体系
λ噬菌体 DNA：	0.5 ng~5 ng/50 μl PCR 反应体系
质粒或病毒 DNA：	0.1 ng ~ 50 ng/50 μl PCR 反应体系
cDNA：	1-5 μl（不超过 PCR 反应总体积的 1/10）

   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。
3. 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，可以在 0.2~1.0 μM 范围内调整引物浓度。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℃×(A+T) + 4℃× (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 (Mg^{2+})、dNTPs、ddH_2O、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配制成 PCR 反应体系：

ddH_2O	(41.5-n) µl
10×PCR Buffer (Mg^{2+})	5 µl
Primer 1（10 µM）	1 µl
Primer 2（10 µM）	1 µl
dNTPs（10 mM each）	1 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0.5 µl
模板	n µl*1
Total	50 µl*2

*1 请仔细阅读"PCR 体系成分"内容，按推荐用量添加模板。

*2 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（请仔细阅读"PCR 参数设置"内容）：

94℃	3 min	
94℃	30 sec	30 Cycles
55℃*1	30 sec	30 Cycles
72℃	1 min*2	30 Cycles
72℃	5 min	

*1 以实际最佳退火温度为准。

*2 以 1 kb/min 计算。

5. 结果检测：取 5-10 µl 扩增产物与 Loading Buffer 混匀后进行琼脂糖凝胶电泳检测。

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