

Long Taq DNA Polymerase

使用说明书

目录号:

目录编号	包装单位
NS006-01	500U
NS006-02	3000U

组成	NS006-01	NS006-02
Long Taq DNA Polymerase	500U	3000U
10× Long Taq Buffer(2.5mM Mg ²⁺)	1mL	6×1mL

产品储存: 4°C运输, -20°C保存, 有效期 24 个月。

产品浓度: 5U/μL

适用范围 一般用于 DNA 片段的 PCR 扩增、DNA 标记、引物延伸、序列测定、DNA 平末端加 A 等, 产物可直接用于 TA 克隆。

制品说明: 一般 PCR 法具有一定的局限性, 特别是难以扩增 5kb 以上的长链 DNA, 这严重限制了 PCR 法的推广和应用。通过改变 PCR 用 DNA 聚合酶、PCR 用 Buffer、PCR 扩增条件等, 使长链 DNA 的扩增成为可能, 这就是 LA(Long and Accurate)PCR 技术。本制品所用的 Long Taq 是 Taq 聚合酶和有校正功能的聚合酶的混合酶, 这种混合酶可以染色体和其它细胞器的 DNA 为模板高效进行 PCR 反应。在人的染色体上可以扩增长度可达 27kb 的 DNA 片段, 而以 λDNA 为模板则可以扩增出高达 40kb 的片段。

举例说明: (按下列组份配制 50μL PCR 反应液)

Components	Volume(50μL)
Long Taq(5U/μL)	0.5-1μL
10× Long PCR Buffer(2.5mM Mg ²⁺)	5μL
dNTP Mixture(各2.5mM)	8μL
模板DNA 2.5ng(λphage)或者.5μg(Human) 噬菌体(0.1-5ng),人基因组(0.1-1μg)	? μL
引物1 (20μM)	0.5-1μL
引物2 (20μM)	0.5-1μL
灭菌纯水	up to 50μL

建议 PCR 循环条件:

步骤	温度	时间	循环数目
预变性	94°C	1-2分钟	1
变性	94°C	10-20秒	10
退火	65°C(视引物而定)	30秒	
延伸	68°C	45-60秒/kb*	
变性	94°C	10-20秒	15-20
退火	65°C(视引物而定)	30秒	
延伸	68°C	45-60秒/kb+1-20秒 “自动延长”/循环*	
最后延伸	68°C	10分钟	1

PCR片段长度(kb)	延伸时间(分钟)	自动延长/循环(秒)
3	2	1
6	4	2
10	7	5
15	10	5
20	14	10
25	17	10
30	20	15
35	24	15
40	27	20
45	30	20

*扩增大片段尤其是 20kb 以上的片段我们建议 15-30 循环时每个循环的延伸时间要增加 10-15 秒“自动延长”时间，如果 PCR 仪器没有“自动延长”功能，那么设定延伸时间时候建议在原有基础上增加 1-4 分钟。

注意事项:

1. 10× Long Taq Buffer pH 值较高，可能会形成[Mg(OH)₂]沉淀，使用前要充分溶解，并 Vortex 保证可能的沉淀重新溶解，或者 37°C 温育 5 分钟，然后 Vortex 充分混匀。
2. 扩增长片段强烈推荐 使用 0.2μL 薄壁管。其他试管未经测试。较厚的试管在 92°C 时不能有效地使模板变性。变性时，尽可能缩短变性时间，降低变性温度。第一步变性在 92~94°C 下进行 2 分钟(GC 含量高可延长至 5 分钟)。在循环过程中尽可能缩短变性时间(92~94°C 下进行 10-15 秒)，除非模板中富含 GC，则 95°C 下变性 30 秒。这可以防止 DNA 脱嘌呤和链断裂，对于所需扩增的基因组 DNA 片段终长度超过 12kb 时，应该尽可能的降低变性温度和时间。变性需要的时间在不同的 PCR 仪器上稍有不同。
3. 如果扩增模板 GC 含量高或者扩增片段比较长，可在反应混合物中加入 DMSO 到

终浓度 1%-8%，最常用 2%(<30kb)或者 4%(>30kb)往往会改善扩增效果。

4. 扩增长片段，引物一般终浓度为 0.3-1 μ M，长度最好为 27-36bp；退火温度一般在 65°C-70°C，此时退火温度和延伸温度基本一致，可将退火延伸在同一个温度进行，使用 2 阶段扩增法。当然如果设计的引物在 20bp 左右，则还是使用传统 3 阶段扩增法为好。
5. 模板一般使用 0.01-2.5ng(λ phage)或者 0.1-1 μ g(Human)。
6. 1 \times Long Taq Buffer 中镁离子浓度为 2.5mM，建议 dNTP 浓度为 400mM，然而要得到最佳结果，优化 Mg²⁺的浓度是必需的。如果含有较高 EDTA 或者螯合剂，则应该提高 Mg²⁺；如果要增加 dNTP 浓度，相应也要增加 Mg²⁺浓度。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
8. 本制品仅供科研使用，严禁用于临床诊断和药物等用途。

=====

