



# Long Taq DNA Polymerase

## 产品信息:

组成	AT107-01
Long Taq DNA Polymerase (5U/μl)	500U
5×Long Taq Buffer (2.5mM Mg <sup>2+</sup> Plus)	1ml

**储存条件:** -20°C保存

## 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 过程中的 DNA 聚合酶、Buffer、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。本试剂盒所用的 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 为模板进行高效 PCR 反应。以人的染色体上为模板可以扩增 27kb 的 DNA 片段,而以 λDNA 为模板则可以扩增出高达 40kb 的片段。

## 活性单位:

1 单位 (U) Long Taq DNA Polymerase 活性定义为在 74°C、30 分钟内,以活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板引物,将 10 nmol 脱氧核苷酸掺入到酸不溶物质所需的酶量。

## 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 方法检测无宿主残余 DNA,能有效地扩增人基因组中的单拷贝基因;室温存放一周,无明显活性改变。

## 酶贮存缓冲液:

20mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 100 mM KCl, Stabilizers, 50% glycerol。

## 5×Long Taq Buffer (2.5mM Mg<sup>2+</sup> Plus):

100 mM Tris-HCl (pH 8.4), 100 mM KCl, 50 mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 其他成分。

## 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、PCR 产物为部分末端加 A,产物可直接用于 TA 克隆但仍建议加 A 后进行连接提高效率。

**建议的 PCR 条件:** (以 50 μl 反应体系为例)

Template	<0.5μg
Forward Primer (10μM)	1μl
Reverse Primer (10μM)	1μl
5×Long Taq Buffer (2.5mM Mg <sup>2+</sup> Plus)	5μl
dNTP Mixture(各 2.5mM)	4μl
Long Taq DNA polymerase(5U/μl)	0.5~1μl
ddH <sub>2</sub> O	up to 50μl

## PCR 反应循环的设置:

94°C:	2-5 min	
94°C:	30 sec	
Ta:	30 sec	30 cycles
72°C:	1 min/1-2kb	
72°C:	10 min	

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。

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

**注意事项:**

1.  $5\times$ 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 Votex 保证沉淀重新溶解, 或者  $37^\circ C$  温育 5 分钟, 然后 Votex 充分混匀。
2. 扩增长片段强烈推荐使用  $0.2\mu l$  薄壁管。其他试管未经测试。较厚的试管在  $92^\circ C$  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  $92\sim 94^\circ C$  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 ( $92\sim 94^\circ C$  下进行 10-15 秒), 除非模板中富含 GC, 则  $95^\circ C$  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 至终浓度 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  $0.3\sim 1\mu M$ , 长度最好为 27-36bp; 退火温度一般在  $65^\circ C\sim 70^\circ C$ , 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  $0.01\sim 2.5ng$  ( $\lambda$ DNA) 或者  $0.1\sim 1\mu g$  (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  $Mg^{2+}$  的浓度是必需的。如果含有较高 EDTA 或者螯合剂, 则应该提高  $Mg^{2+}$ ; 如果要增加 dNTP 浓度, 相应也要增加  $Mg^{2+}$  浓度。