



**ELK Biotechnology**

For research use only.

## Taq DNA Polymerase(5U/ $\mu$ L)

货号	规格	储藏/有效期
EQ005-01	50 $\mu$ l	-20C°/两年
EQ005-02	200 $\mu$ l	-20C°/两年

### 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 90KD。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。

### 试剂组成

组分	EQ005-01	EQ005-02
Taq DNA Polymerase (5U/ $\mu$ l )	50 $\mu$ l	200 $\mu$ l
10 × PCR Buffer(Mg <sup>2+</sup> )	0.5 ml	1 ml ×3
ddH <sub>2</sub> O	1 ml	1 ml ×3
说明书	1 份	1 份

#### 单位定义

74°C, 30min, 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°C), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM each dNTPs(包括[3H]-Dttp), 200  $\mu$ g/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  $\mu$ l 反应体系中加入模板的体积不应超过 5 $\mu$ l)。如果模板 DNA 纯度太差, 可使用我们的PCR产物回收试剂盒(Cat. No.EP005)对模板 DNA 进行纯化及浓缩。经我们的PCR产物回收试剂盒纯化后的模板使用量可多至PCR 反应体系体积的 1/2。



## ELK Biotechnology

### For research use only.

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 $\mu$ l 体系建议使用 10<sup>4</sup>拷贝以上的靶序列作为模板。模板 DNA 的推荐使用量:

人基因组DNA	0.05 $\mu$ g~0.5 $\mu$ g/50 $\mu$ lPCR反应体系
大肠杆菌基因组DNA	10ng~100ng/50 $\mu$ lPCR反应体系
$\lambda$ DNA	0.5ng~5ng/50 $\mu$ lPCR反应体系
质粒DNA	0.1ng~10ng/50 $\mu$ lPCR反应体系

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  $\mu$ M (50 $\times$ ), 工作浓度为 0.2  $\mu$ M。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 $^{\circ}$ C, 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  $T_m$  5 $^{\circ}$ C (如果两条引物  $T_m$  不同, 参考较低的  $T_m$ )作为退火温度。一般引物合成公司会提供所合成引物的  $T_m$ , 也可以根据此公式估算引物  $T_m$ :  $T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$ 。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 $^{\circ}$ C, 延伸时间长短取决于目的DNA 片段长度, 以 1kb/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 5~10min, 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。



## ELK Biotechnology

For research use only.

### 使用方法

- 1.将 10×PCR Buffer、dNTPs、ddH<sub>2</sub>O、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：

组分	体积 (μL)
10×PCR Buffer	5
引物1 (10 μM)	1
引物2 (10 μM)	1
Taq DNA Polymerase	0.5
模板DNA	n
ddH <sub>2</sub> O	up to 50

\*注：1) 10×PCR Buffer 使用前必须充分混合均匀，否则将影响 PCR 效果。

3) Mg<sup>2+</sup>终浓度：体系终浓度为2mM，满足大多数基因片段的扩增。如需调整，可使用 25mM MgCl<sub>2</sub>，在2-5mM终浓度间调整。

2) 聚合酶浓度：推荐使用0.5ul/50ul体系，也可以在0.5-1.0ul/50ul之间进行优化。

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

循环步骤	温度 (°C)	时间	循环数
预变性	94	1-5 min	1x
变性	94	15 sec	25-35x
退火*	50-60	30 sec	
延伸※	72	30 sec	
终延伸	72	10 min	1x

\*以实际最佳退火温度为准。

※ 延伸时间可根据扩增产物长度设计，以1kb/min作为参考。



## ELK Biotechnology

**For research use only.**

5.结果检测：取 5-10  $\mu$ l 扩增产物直接进行琼脂糖电泳检测。

\* 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