

Taq DNA Polymerase for PAGE

P103

Version 21.2



产品概述

本产品由克隆有 *Thermus aquaticus* DNA Polymerase 基因的大肠杆菌表达并经过多步纯化精制得到，不含核酸内切酶、核酸外切酶以及细菌DNA。Taq DNA Polymerase 具有5'→3'聚合酶活性和5'→3'外切酶活性，但无3'→5'外切酶活性。PCR产物的3'端带A，可克隆至T载体，并适用于ClonExpress和拓扑克隆试剂盒 (Vazyme #C112/C113/C115/C601)。本产品附带的10 × Taq Buffer for PAGE经过特殊优化，PCR产物适合于进行聚丙烯酰胺凝胶电泳及琼脂糖电泳检测。

产品组分

组分	P103-d1 (2,500 U)	P103-02 (10,000 U)	P103-d2 (10,000 U)
10 × Taq Buffer for PAGE (Mg ²⁺ plus)	5 × 1 ml	20 × 1 ml	20 × 1 ml
dNTP Mix (10 mM each)	1 ml	--	4 × 1 ml
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	500 μl	4 × 500 μl	4 × 500 μl
6 × DNA Loading Buffer	1 ml	4 × 1 ml	4 × 1 ml

保存条件

-30 ~ -15°C 保存，≤0°C 运输。

适用范围

本产品广泛适用于动物、植物以及微生物等DNA的扩增反应。

单位定义

用活化的大马哈鱼精子DNA作为模板/引物，74°C 30 min内，摄入10 nmol的全核苷酸为酸性不溶物的活性定义为1个活性单位 (U)。

注意事项

操作注意事项

由于Taq DNA Polymerase在室温下也有一定的反应活性，PCR反应体系请在冰上进行配制，之后再置于PCR仪上进行反应。这样可以减少在反应准备阶段发生的非特异扩增，有助于得到高特异性的扩增结果。

引物设计

1. 引物3'端最后一个碱基最好为G或者C；
2. 引物3'端最后8个碱基应避免出现连续错配；
3. 引物3'端应避免出现发夹结构；
4. 正向引物和反向引物的T_m值相差不超过1°C为佳，T_m值调整至55 ~ 65°C为佳(引物T_m值推荐使用Primer Premier 5进行计算)；
5. 引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物T_m值计算；
6. 引物的GC含量控制在40% - 60%之间；
7. 引物A、G、C、T整体分布要尽量均匀，避免使用GC或者AT含量高的区域。
8. 避开引物内部或者两条引物之间有5个碱基以上的互补序列，两条引物的3'端避免有3个碱基以上的互补序列；
9. 引物设计完毕请使用NCBI BLAST功能检索引物特异性，以避免非特异性扩增产生。

实验流程

反应体系

ddH ₂ O	To 50 µl
10 × Taq Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 µl
dNTP Mix (10 mM each)	1 µl
Primer1 (10 µM)	2 µl
Primer2 (10 µM)	2 µl
Template DNA ^a	x µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl) ^b	0.5 µl

▲当扩增片段GC含量>60%且优化条件无法正常扩增时，推荐使用PCR Enhancer (Vazyme #P021) 来优化PCR反应。

a. 不同模板最佳反应浓度不同，下表为50 µl反应体系推荐模板使用量：

动植物基因组DNA	0.1 - 1 µg
大肠杆菌基因组DNA	10 - 100 ng
cDNA	1 - 5 µl (不超过PCR反应总体积的1/10)
质粒DNA	0.1 - 10 ng
λDNA	0.5 - 10 ng

b. 酶量可在0.25 - 1 µl之间调整。加大酶量在通常情况下可以提高扩增产量，但有可能使特异性下降。

反应程序

95°C	3 min (预变性) ^a	}	30 - 35 cycles
95°C	15 sec		
60°C ^b	15 sec		
72°C	60 sec/kb		
72°C	5 min (彻底延伸)		

a. 该预变性条件适合绝大多数扩增反应，可根据模板结构复杂程度修改。如模板结构复杂，可将预变性时间延长至5 - 10 min以提高预变性效果；

b. 退火温度需要根据引物的T_m值进行调整，一般设置成低于引物T_m值3 ~ 5°C即可；对于复杂模板，需要调节退火温度和延长延伸时间来实现高效扩增。

常见问题与解决方案

	无产物或产物量少	有杂带或弥散条带
引物	优化引物设计	优化引物设计
退火温度	设置退火温度梯度，找到合适的退火温度	尝试提高退火温度，可间隔2°C设置温度至65°C
引物浓度	适当提高引物浓度	降低引物浓度至终浓度为0.2 µM
延伸时间	适当增加延伸时间	有大于目标条带的杂带时可减少延伸时间
循环数	增加循环数至35 - 40个循环	减少循环数至25 - 30个循环
模板纯度	使用高纯度模板	使用高纯度模板
模板使用量	粗提样品可能需要减少使用量；其他样品 使用量参照反应体系推荐量并适量增加	使用量参照反应体系推荐量调整

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。