

PCR Kit with Taq

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|-------|------------------|--------|
| D7233 | PCR Kit with Taq | 2000 次 |

产品简介:

- 本PCR试剂盒带有Taq DNA Polymerase、PCR buffer、dNTP和上样缓冲液，自备模板和引物即可进行PCR反应，适用于普通的PCR或RT-PCR定性或定量检测，也可以用于不太长的DNA片段的克隆。
- Taq DNA Polymerase简称Taq酶或Taq，是最常用的DNA聚合酶之一。
- Taq DNA Polymerase是一种来源于嗜热菌*Thermus aquaticus*的高度热稳定的DNA聚合酶，95℃孵育时的半衰期大于40分钟。Taq酶的分子量为94 kDa。Taq酶可以催化5'至3'方向的依赖于DNA模板的脱氧核苷酸的聚合。Taq酶没有3'至5'的外切酶活性，有非常低的5'至3'外切酶活性。由于Taq酶没有3'至5'的外切酶活性，因此在DNA聚合过程中相当于核苷酸转移酶的作用，最终会导致PCR产物的3'末端会产生3'-dA overhangs，即产生带一个A的3'粘端。本Taq DNA Polymerase为recombinant Taq DNA Polymerase，通过大肠杆菌表达纯化获得，和纯化获得的天然Taq DNA Polymerase在各方面的性质相同。
- **活性定义:** One unit of the enzyme catalyzes the incorporation of 10 nmol of deoxyribonucleotides into a polynucleotide fraction (adsorbed on DE-81) in 30 min at 70℃. Enzyme activity is assayed in the following mixture: 67 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25℃), 6.7 mM MgCl₂, 1 mM 2-mercaptoethanol, 50 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA, 0.75 mM activated calf thymus DNA, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 MBq/ml [³H]dTTP。
- **纯度:** 不含DNA内切酶、外切酶和磷酸酯酶，不含RNA酶，满足常规PCR反应要求。
- **酶储存溶液:** 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 100 mM KCl, 0.5% (v/v) Nonidet P40, 0.5% (v/v) Tween 20 and 50% (v/v) glycerol。
- **10×PCR Buffer (with Mg²⁺):** 100 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25℃), 500 mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.8% (v/v) Nonidet P40。
- **失活或抑制:** 酚氯仿抽提可以使Taq酶失活，加入脱氧胆酸钠至0.06%，SDS至0.01%，或sarkosyl至0.02%均可以抑制Taq酶。
- 试剂盒带有dNTP，该dNTP为dATP、dCTP、dGTP和dTTP的混合物，每种浓度均为2.5mM。
- 本试剂盒用于50微升的PCR反应体系，足够用于800个反应，用于20微升的PCR反应体系，足够用于2000个反应。

包装清单:

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|---------|--|---------|
| D7233-1 | Taq DNA Polymerase (5U/μl) | 1000U |
| D7233-2 | 10×PCR Buffer (with Mg ²⁺) | 1ml×4 |
| D7233-3 | dNTP (2.5mM each) | 0.8ml×4 |
| D7233-4 | 6×DNA Loading Buffer | 1ml×2 |
| — | 说明书 | 1份 |

保存条件:

-20℃保存。

注意事项:

- 由于PCR反应非常灵敏可以扩增目的基因序列超过1000万倍，在使用Taq酶时请注意避免微量待扩增DNA的污染，并尽量考虑设置不加模板的空白对照以确认是否有待扩增DNA的污染。
- Taq DNA polymerase在PCR过程中每循环的出错几率约为2.2×10⁻⁵，对于大于1kb的DNA片段的克隆推荐使用出错几率更低的DNA聚合酶，例如Pfu DNA polymerase、BeyoTaq DNA polymerase等。对于普通的PCR或RT-PCR定性检测或定量检测，Taq DNA polymerase是最佳选择。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. PCR反应体系的设置:

- 溶解并混匀PCR反应所需的各种溶液。将Taq DNA Polymerase置于冰浴上或冰盒内。
- 参考下表在冰浴上设置PCR反应(如果有多个类似的PCR反应，可以先配制大体积的包含水、buffer、dNTP和Taq酶的

混合物，然后分装到各PCR反应管内。根据情况，有时混合物中可以包括引物)：

| 试剂 | 最终浓度 | 体积 | 体积 |
|---|------------------|-------------------|------------------|
| 双蒸水或MilliQ水 | - | (36.75-x) μ l | (14.7-y) μ l |
| 10 \times PCR Buffer (with Mg ²⁺) | 1 \times | 5 μ l | 2 μ l |
| dNTP (2.5mM each) | 0.2mM each | 4 μ l | 1.6 μ l |
| 模板DNA | 10pg-1 μ g* | x μ l | y μ l |
| 引物混合物(10 μ M each) | 0.8 μ M | 4 μ l | 1.6 μ l |
| Taq DNA Polymerase (5U/ μ l) | 1.25U/50 μ l | 0.25 μ l | 0.1 μ l |
| 总体积 | - | 50 μ l | 20 μ l |

*对于不同类型的模板在50 μ l反应体积中推荐用量如下：

哺乳动物基因组DNA：0.1-1 μ g；大肠杆菌基因组DNA：10-100ng；质粒DNA：0.1-10ng。

过多的模板DNA容易导致非特异性的PCR产物。

- c. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底。
 - d. 如果所使用的PCR仪有热盖则省略本步骤。如果PCR仪没有热盖，则在管内滴入一滴矿物油(mineral oil, ST275)。
 - e. 各设置好的PCR反应管置于PCR仪上，开始PCR反应。
2. PCR反应参数的设置可以参考如下示例：

STEP1(起始变性): 94 $^{\circ}$ C 3min

STEP2(变性): 94 $^{\circ}$ C 30sec

STEP3(退火): 55 $^{\circ}$ C 30sec

STEP4(延伸): 72 $^{\circ}$ C 1min

STEP5(循环): Go To STEP2 for 30 cycles

STEP6(最终延伸): 72 $^{\circ}$ C 10min

STEP6(临时保存): 4 $^{\circ}$ C forever

- a. PCR反应的设置需根据模板、引物、PCR产物的长度和GC含量等条件的不同设定不同的PCR反应条件包括温度、时间和循环数等。
- b. STEP4(延伸)的时间设置需根据PCR产物的长度进行设置，通常每kb产物的延伸时间为1分钟。例如PCR产物的长度为1kb，则延伸时间可以设置为1分钟，PCR产物的长度为2kb，则延伸时间可以设置为2分钟，以此类推。
- c. 对于初次进行的PCR，为尽量确保可以扩增出预期的PCR产物，可以把循环数设置为35。对于需进行半定量或定量的PCR反应循环数一定要进行适当优化，使PCR反应没有达到平台期。

常见问题：

1. PCR产物非常少或没有特异性条带。

- a. 引物设计不佳是PCR过程中最常见的问题。请选择适当的引物设计软件进行引物设计，注意引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在加入酶切位点等的引物中，一定要注意加入酶切位点等后整条引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在原有引物效果不佳的情况并且阳性对照引物可以正常工作的情况下，可以考虑更换引物。
- b. 待扩增片断GC含量偏高。GC含量较高的情况下PCR会变得相对比较困难，此时可以使用适合扩增高GC含量DNA片断的GC-rich buffer，并相应地根据GC-rich buffer的要求或说明调整PCR反应参数的设置。
- c. 长片断扩增。尽管Taq DNA polymerase可以扩增最长达8kb的DNA片断，但大多数时候比较适合扩增3kb以下的片断，更长片断的扩增推荐使用其它更适合长片断扩增的DNA聚合酶。
- d. PCR反应设置时在室温进行容易导致非特异性条件。推荐在冰浴上设置PCR反应。
- e. 由于引物存在一定的二级结构或存在一定的引物二聚体，或引物偏短，导致退火效果不佳。此时可以采用Touch down等方法进行退火，通常采用从65 $^{\circ}$ C逐步缓慢降温到55或50 $^{\circ}$ C的方法，使退火更加充分。
- f. 退火温度不佳，需要优化。如果有温度梯度PCR仪，则可以设置退火的温度梯度，摸索退火的最佳温度。如果没有温度梯度PCR仪，则可以通过多次PCR反应摸索最佳的退火温度。
- g. 延伸时间不足。可按照每1kb片断延伸1分钟进行设置，对于较难扩增的片断可以设置为每1kb片断延伸1.5-2分钟。
- h. 待扩增片断GC含量较高或长度较长，变性不够充分。可以调节起始变性条件至95 $^{\circ}$ C 1min甚至95 $^{\circ}$ C 2-4min。
- i. 在不同PCR仪上进行PCR反应，避免有时PCR仪出现问题。
- j. 循环数不足，适当延长PCR的循环数。通常循环数最高不必超过40，常用的循环数范围为25-35。
- k. 模板含量太低，适当加大模板量，或采用巢式PCR(nested PCR)或二次PCR。巢式PCR即为在原先设计的PCR引物内侧再设计一对PCR引物，然后对第一次PCR产物进行稀释后再进行一次PCR扩增，这样一方面可以起到扩增作用，同时也可以从第一次PCR产物中扩增出特异性条带。二次PCR则为比较简单地用原有引物对第一次PCR产物进行稀释后再进行一次PCR扩增，可以起到扩增作用，但不能去除非特异性条带。
- l. 模板中含有抑制PCR反应的物质，可以用适当的DNA纯化方法例如柱纯化等纯化模板DNA。
- m. 当产生较多非特异性条带时，可以适当提高退火温度。
- n. 注意设置适当的阳性对照和阴性对照通常会有很大帮助。