

Long Taq Kit

货号: P3062

产品简介

本产品是 2×浓缩的 PCR 扩增预混和溶液，含有 Long Taq DNA 聚合酶、dNTP 混合物、缓冲液等 PCR 扩增必需组分（模板与引物除外）。使用时，仅需将反应缓冲液与 Long Taq DNA 聚合酶按比例混合后，在扩增体系中加入模板和引物即可进行 PCR，大大简化操作过程，缩短操作时间，降低污染（加样次数减少）。同时，由于体系内含有优化剂与增强剂，能够显著增强 PCR 扩增的灵敏度。

Long Taq DNA 聚合酶是专门用于扩增长片段的嗜热 DNA 聚合酶，其保真性是普通 Taq DNA 聚合酶的 3 倍左右。扩增片段的长度可达 20 kb（简单模板）。在扩增复杂模板（如 GC-rich 或重复序列）时，Long Taq DNA 聚合酶的扩增效率显著高于 Taq DNA 聚合酶。因此 Long Taq DNA 聚合酶适合 >5kb 的 DNA 片段及复杂模板的扩增。延伸速度为 20s/kb（70~75℃，简单模板可达 5s/kb）。扩增产物具有两种末端：平末端与 3'-dA。

产品组成

Component	P3062
2× Long Reaction Mix	1 ml×5
PCR Enhancer [1]	500 µl×3
Long Taq DNA 聚合酶 (2.5U/µl)	160 µl

本产品分含体系中包含溴酚蓝、不含溴酚蓝两类。体系中包含溴酚蓝的产品，PCR 扩增产物可直接电泳检测。这两类产品的扩增性能无差异。如没特别说明提供体系中包含溴酚蓝的包装。

[1] PCR Enhancer 主要通过降低 DNA 模板的解链温度，促进 DNA 模板的有效扩增，增加 PCR 反应的灵敏度和特异性。可单独订购（Cat. #: P9041）。

活性定义

一个活性单位（U）指用活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物，在 72℃、30 min 内，摄入 10 nmol 全核苷酸所需的酶量。

保存条件

-20℃ 保存 2 年。

质量控制

纯度检测：经质量检测，产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测：PCR 方法检测无宿主残余 DNA，能有效扩增人基因组中的单拷贝基因。

应用举例

1. 配制反应体系

请于冰上配置反应体系，体系大小与组分用量与添加顺序可调整：

Ordinal	Component	Volume (50 µl reaction volume)	Final concentration (50 µl reaction volume)
optional	PCR Enhancer	4-16 µl	-
1	2×Long Reaction Mix	25 µl	1×
2	upstream primer (10 µM) ^[1]	2 µl	0.4 µM
3	downstream primer (10 µM) ^[1]	2 µl	0.4 µM
4	Long Taq DNA 聚合酶 (2.5U/µl) ^[2]	0.5-1 µl	1.25U-2.5U
5	template DNA ^[3]	1-4 µl	<1µg
6	超纯水 ^[4]	To 50 µl	-
optional	MgCl ₂ (MgSO ₄)	Variable	-
optional	PCR Enhancer	4-16 µl	-

[1] 引物终浓度建议范围：0.1-1 µM。特异性差时可降低浓度，效率低时可提高浓度。

[2] 根据目的片段扩增的难易程度调整 DNA 聚合酶的用量。

[3] 不同模板最佳用量不同，部分 DNA 模板建议用量如下表（50 µl 反应体系）。

Template	人类基因组 DNA	λDNA	大肠杆菌基因组 DNA	质粒 DNA
Dosage	0.1µg-1µg	0.5ng-5ng	10ng-100ng	0.1ng-10ng

[4] 可单独订购超纯水（Cat. #: P9021/P9022/P9023）。

[5] 可单独订购 25mM MgCl₂（Cat. #: P9031）。

2. 设定反应程序进行 PCR 反应

Stage	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	94°C	3 min	1
Denaturation	94°C	30 sec	25-35
Annealing	55-68°C ^[1]	30 sec	
Extension	72°C	Variable ^[2]	
Final Extension	72°C	5-10 min	1

[1] 退火温度应根据 Tm 值较低的引物来设。

[2] 延伸时间按 20s/kb 来设最佳（简单模板可达 5s/kb）。

3. 分析结果

反应产物可直接进行琼脂糖凝胶电泳，通过凝胶成像设备观察目的条带的扩增情况。如有需要，可进行割胶回收。

无产物或产物量少的改进措施有：1 调整退火温度；2 减少抑制剂的影响，如提取的基因组 DNA 中含有抑制扩增的成分，需要高倍稀释（1: 10000）后使用；3 采用乙醇沉降洗脱，提高模板 DNA 的纯度；4 使用 PCR 添加剂，如 PCR Enhancer（Cat. #: P9041）、MgCl₂（Cat. #: P9031）等可提高产量。

操作注意事项

1 室温下 Long Taq DNA 聚合酶有一定的活性，为避免发生非特异性扩增，请于冰上配置反应体系，并且最后添加 Long Taq DNA 聚合酶或模板 DNA。

2 Long Taq Kit 的扩增产物有两种末端：平末端和 3'-dA 突出末端。如要进行 TA 克隆，请先进行加 A 反应，以提高克隆效率。（加 A 反应：参考如下体系，72°C，15-30min）

PCR（纯化）产物	1-7 μl
10× Taq Buffer (Mg ²⁺ Plus)	1 μl
dATP	0.2 mM
Taq DNA 聚合酶	5U
超纯水	To 10 μl

3 Long Taq Kit 既可扩增长片段的 DNA，也可扩增小片段（几百 bp）的 DNA。

4 PCR Enhancer 主要在 Long Taq Kit 扩增无结果或扩增效果不好时使用。使用后退火温度需在原温度上降低 2-3°C，否则会降低 PCR 效率，建议使用 Tm 值较高的引物。PCR

Enhancer 能够与所有的耐热 DNA 聚合酶共同作用。

引物设计注意事项

引物长度一般在 15-30 个碱基之间；上下游引物 3'末端避免互补，避免出现 3 个以上重复的 G 或 C，或出现发夹结构，否则会产生非特异性扩增；GC 含量控制在 40-60%，且上下游引物 GC 含量尽量接近；Tm 值控制在 55-65°C 之间，且上下游引物 Tm 值尽量接近，额外附加序列（酶切位点、修饰等）是非模板匹配序列，不参与 Tm 值计算。

本品仅供科学研究使用。