

版本号: M16B01V1.0



# LongerAmp *Taq* 2X PCR

TEL: 400-999-6126

## Master Mix with Dye

WEB: www.abclonal.com.cn

目录: RK20684

规格: 100 RXN / 500 RXN (50  $\mu$ L/RXN)

浓度: 2X

产品组成:

|   |         |
|---|---------|
| LongerAmp <i>Taq</i> 2X PCR Master Mix with Dye | RM20379 |
|---|---------|

### 产品说明

LongerAmp *Taq* 2X PCR Master Mix with Dye 是经过优化的预混液, 包含有 LongerAmp *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、反应缓冲液和稳定剂等。其中 LongerAmp *Taq* DNA 聚合酶是一种独特的 *Taq* Klenow DNA 聚合酶和 Deep Ocean DNA 聚合酶的混合酶。Deep Ocean DNA 聚合酶的 3'-5' 核酸外切酶活性增强了 *Taq* Klenow DNA 聚合酶的保真度和扩增效果。LongerAmp *Taq* DNA 聚合酶的保真度是 *Taq* klenow DNA 聚合酶的两倍。本产品可以从 Lambda DNA 或人类基因组 DNA 模板中扩增出长达 30 kb 的 DNA 产物。本产品也包含用于 DNA 凝胶电泳的商业化示踪染料(二甲苯腈 FF 和柠檬黄)。在 1X TBE 配制的 1% 琼脂糖凝胶中, 二甲苯腈 FF 约与 4 kb 的 DNA 的迁移速率相同, 柠檬黄约与 10 bp 的 DNA 的迁移速率相同。1X 浓度的这两种染料不会影响 PCR 反应和 DNA 电泳条带的迁移。

### 产品应用

- 长片段 PCR
- 菌落/菌液 PCR

### 保存温度

-20°C

### 1X Master Mix 组成

60 mM Tris-SO<sub>4</sub>, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.3 mM dNTPs, 3% Glycerol, 0.06% IGEPAL CA-630, 0.05% Tween 20, pH 9.1 @ 25°C, 200 U/mL LongerAmp *Taq* DNA 聚合酶, 1X Xylene Cyanol, 1X Tartrazine

热失活: 否

5'-3' 核酸外切酶活性: 无

3'-5' 核酸外切酶活性: 有

链置换活性: 弱

产物末端: 3' 含有单 dA 核苷酸突出末端

出错率: 小于 140 X 10<sup>-6</sup> 碱基

### 操作说明

#### 推荐的 PCR 反应

推荐冰上配制反应体系, 然后将该体系快速转移到已经预热到 94°C 的 PCR 仪中。

推荐的反应体系(以 25 和 50  $\mu$ L 反应体系为例)

| 组分   | 加入量<br>(25 $\mu$ L 体系) | 加入量<br>(50 $\mu$ L 体系) | 终浓度                   |
|--|------------------------|------------------------|-----------------------|
| ddH <sub>2</sub> O                                       | to 25 $\mu$ L          | to 50 $\mu$ L          | N/A                   |
| 上游引物<br>(10 $\mu$ M)                                     | 1 $\mu$ L              | 2 $\mu$ L              | 0.4 $\mu$ M           |
| 下游引物<br>(10 $\mu$ M)                                     | 1 $\mu$ L              | 2 $\mu$ L              | 0.4 $\mu$ M           |
| 模板 DNA   | Variable               | Variable               | <1 $\mu$ g/50 $\mu$ L |
| LongerAmp<br><i>Taq</i> 2X PCR<br>Master Mix<br>with Dye | 12.5 $\mu$ L           | 25 $\mu$ L             | 1X                    |

注: 温和混匀反应体系, 如有必要可以通过短暂快速离心将试剂收集到管底。若使用无热盖的 PCR 仪, 可以在反应体系表面覆盖一层矿物油防止溶液蒸发。

推荐的 PCR 反应程序

| 步骤   | 温度      | 时间         | 循环数(Cycles) |
|------|---------|------------|-------------|
| 预变性  | 94°C    | 3 min      | 1           |
| 变性   | 98°C    | 5-10 s     | 30          |
| 退火   | 55-60°C | 20-30 s    |             |
| 延伸   | 65°C    | 1.2 kb/min |             |
| 终延伸  | 65-68°C | 10 min     | 1           |
| Hold | 4-10°C  | $\infty$   |             |

## PCR 基本原则

### 1. 模板

DNA 模板质量是长片段 PCR 扩增成功的关键因素。

推荐加入的 DNA 模板量 (50  $\mu$ L 反应体系)

| DNA 类型    | 模板量                 |                   |
|-----------|---------------------|-------------------|
|           | $\leq 15$ kb Target | $> 15$ kb Target* |
| 基因组 DNA   | 1 ng-500 ng         | 10 ng-1 $\mu$ g   |
| 质粒或病毒 DNA | 1 pg-1 ng           | 10 pg-10 ng       |

\*注: 扩增大于 20 kb 长片段 DNA 的成功率取决于 DNA 模板质量和设计的引物序列。

### 2. 引物

寡核苷酸引物长度通常在 20-40 nt 之间, 理想的 GC 含量为 40-60%。当扩增的片段长度大于 20 kb 时, 理想的引物 GC 含量应该在 50% 以上,  $T_m$  值高于 60°C 且引物长度大于 24 个核苷酸。PCR 反应体系中每条引物的终浓度可以在 0.05-1  $\mu$ M 范围内调整, 一般使用浓度在 0.1-0.5  $\mu$ M 之间。

### 3. $Mg^{2+}$ 和添加剂

LongerAmp Taq DNA 聚合酶的大部分 PCR 反应体系中最优的  $Mg^{2+}$  浓度是 1.5-2.0 mM。1X LongerAmp Taq 反应缓冲液中  $Mg^{2+}$  浓度是 2 mM, 满足绝大多数扩增子的扩增。可以使用  $MgSO_4$  按 0.5 或 1 mM 的增量对体系中  $Mg^{2+}$  浓度进行优化。对于扩增极困难的扩增子, 可以在反应体系中添加 DMSO 或甲酰胺。

### 4. 变性

94°C 预变性 3 min 可使大多数纯化的 DNA 模板充分变性, 但对于复杂的模板或长片段靶标, 在 PCR 循环前需要更高的预变性温度(98°C)以充分变性 DNA 模板。对于菌落/菌液 PCR, 推荐 94°C 预变性 2-5 min 以充分裂解菌体。在扩增循环中, 推荐的变性条件是 98°C 5-10 s。

### 5. 退火

退火时间一般推荐 15-60 s, 退火温度与引物对的  $T_m$  值相关, 退火温度一般设置在 45-65°C 之间。退火温度可以通过温度梯度实验进行优化, 一般从引物  $T_m$  值 5°C 以下开始设置温度梯度。当退火温度超过 60°C 时推荐使用二步法 PCR (详见 #10)。

### 6. 延伸

推荐使用 65°C 的延伸温度, 延伸时间与扩增片段长度有关, 可以按照 1.2 kb/min 的扩增速度计算扩增时间; 在 PCR 循环结束之后, 需要在 65°C 条件下再延伸 10 min。

注: 本产品不适合使用 72°C 延伸。

### 7. 循环数

一般进行 25-35 个循环即可得到充足的 PCR 产物, 若需要检测低拷贝基因, 可以将循环数增至 45。

### 8. 二步法 PCR

当引物退火温度高于 60°C, 推荐二步法 PCR。此外, 当 PCR 产物大于 5 kb 时, 也推荐使用二步法 PCR, 特别是人或 *E. coli* 的基因组。

二步法 PCR 循环条件

| 温度      | 时间         | 循环数 (Cycles) |
|---------|------------|--------------|
| 94°C    | 3 min      | 1            |
| 98°C    | 5-10 s     | 30           |
| 65°C    | 1.2 kb/min |              |
| 65-68°C | 10 min     | 1            |
| 4-10°C  | $\infty$   |              |

### 9. PCR 产物

使用 LongerAmp Taq DNA 聚合酶产生的大部分 PCR 产物 3' 端含有单 dA 核苷酸突出, 因此该产物可以用于 dT / dU 末端载体的连接。

### 10. 优化

对于特定或困难的扩增子, 需要对变性、延伸温度和反应时间进行优化。这种优化对于成功的扩增结果非常重要。