



# Long Taq DNA Polymerase

## 产品信息:

组成	AT107-01
Long Taq DNA Polymerase (5U/μl)	500U
5×Long Taq Buffer (2.5mM Mg <sup>2+</sup> Plus)	1ml

**储存条件:** -20℃保存

## 制品说明:

一般 PCR 法具有一定的局限性，特别是难以扩增 5kb 以上的长链 DNA，这严重限制了 PCR 法的推广和应用。通过改变 PCR 过程中的 DNA 聚合酶、Buffer、扩增条件等，使长链 DNA 的扩增成为可能，这就是 LA (Long and Accurate) PCR 技术。本试剂盒所用的 Long Taq 是 Taq 聚合酶和有校正功能的聚合酶的混合酶，这种混合酶可以染色体和其它细胞器的 DNA 为模板进行高效 PCR 反应。以人的染色体上为模板可以扩增 27kb 的 DNA 片段，而以 λDNA 为模板则可以扩增出高达 40kb 的片段。

## 活性单位:

1 单位 (U) Long Taq DNA Polymerase 活性定义为在 74℃、30 分钟内，以活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板引物，将 10 nmol 脱氧核苷酸掺入到酸不溶物质所需的酶量。

## 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 方法检测无宿主残余 DNA，能有效地扩增人基因组中的单拷贝基因；室温存放一周，无明显活性改变。

## 酶贮存缓冲液:

20mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 100 mM KCl, Stabilizers, 50% glycerol.

## 5×Long Taq Buffer (2.5mM Mg<sup>2+</sup> Plus):

100 mM Tris-HCl (pH 8.4), 100 mM KCl, 50 mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 其他成分。

## 适用范围:

一般用于 DNA 片段的 PCR 扩增、DNA 标记、引物延伸、序列测定、PCR 产物为部分末端加 A，产物可直接用于 TA 克隆但仍建议加 A 后进行连接提高效率。

**建议的 PCR 条件:** (以 50 μl 反应体系为例)

Template	<0.5μg
Forward Primer (10μM)	1μl
Reverse Primer (10μM)	1μl
5×Long Taq Buffer (2.5mM Mg <sup>2+</sup> Plus)	5μl
dNTP Mixture(各 2.5mM)	4μl
Long Taq DNA polymerase(5U/μl)	0.5~1μl
dH <sub>2</sub> O	up to 50μl

## PCR 反应循环的设置:

94℃:	2-5 min	
94℃:	30 sec	
Ta:	30 sec	30 cycles
72℃:	1 min/1-2kb	
72℃:	10 min	

扩增大片段尤其是20kb以上的片段我们建议15-30循环时每个循环的延伸时间要增加10-15秒“自动延长”时间，如果PCR仪器没有“自动延长”功能，那么设定延伸时间时候建议在原有基础上增加1-4分钟。

PCR片段长度 (kb)	延伸时间 (分钟)	自动延长/循环 (秒)
3	2	1
6	4	2
10	7	5
15	10	5
20	14	10
25	17	10
30	20	15
35	24	15
40	27	20
45	30	20

**注意事项:**

- 1.5×Long Taq Buffer pH 值较高，可能会形成 Mg(OH)<sub>2</sub> 沉淀，使用前要充分溶解，并 Votex 保证沉淀重新溶解，或者 37℃ 温育 5 分钟，然后 Votex 充分混匀。
2. 扩增长片段强烈推荐 使用 0.2μl 薄壁管。其他试管未经测试。较厚的试管在 92℃ 时不能有效地使模板变性。变性时，尽可能缩短变性时间，降低变性温度。第一步变性在 92~94℃ 下进行 2 分钟（GC 含量高可延长时间达 5 分钟）。在循环过程中尽可能缩短变性时间（92~94℃ 下进行 10-15 秒），除非模板中富含 GC，则 95℃ 下变性 30 秒。这可以防止 DNA 脱嘌呤和链断裂，对于所需扩增的基因组 DNA 片段终长度超过 12kb 时，应该尽可能的降低变性温度和时间。变性需要的时间在不同的 PCR 仪器上稍有不同。
3. 如果扩增模板 GC 含量高或者扩增片段比较长，可在反应混合物中加入 DMSO 至终浓度 1%-8%，最常用 2% (<30kb) 或者 4% (>30kb) 往往会改善扩增效果。
4. 扩增长片段，引物一般终浓度为 0.3-1μM，长度最好为 27-36bp；退火温度一般在 65℃-70℃，此时退火温度和延伸温度基本一致，可将退火延伸在同一个温度进行，使用 2 阶段扩增法。当然如果设计的引物在 20bp 左右，则还是使用传统 3 阶段扩增法为好。
5. 模板一般使用 0.01-2.5ng (λDNA) 或者 0.1-1μg(Human)
6. 1×Long Taq Buffer 中镁离子浓度为 2.5mM，建议 dNTP 浓度为 400mM，然而要得到最佳结果，优化 Mg<sup>2+</sup> 的浓度是必需的。如果含有较高 EDTA 或者螯合剂，则应该提高 Mg<sup>2+</sup>；如果要增加 dNTP 浓度，相应也要增加 Mg<sup>2+</sup> 浓度。