



产品描述

在长片段 PCR 过程中, Taq 酶由于缺乏 3' → 5' 外切酶活性(校对活性), 不能切除掺入的错配核苷酸, 因此会在错配处停滞, 导致扩增延宕。LonFrag™ Taq DNA Polymerase 由 Taq DNA Polymerase 与一种含有校对活性的蛋白按特定比例混合而成, 极大提高了扩增效率, 并且将保真度提高至 Taq 酶的 6 倍。配合优化的缓冲体系, LonFrag™ Taq DNA Polymerase 可高效扩增超过 20 kb 的基因组、cDNA 片段, 并且对于低拷贝、低纯度、以及不同 GC 含量的模板都具有很高的成功率。无论是首次进行 PCR 实验, 还是挑战高难度的扩增, LonFrag™ Taq DNA Polymerase 都是您最可靠的选择。PCR 产物的 3' 端带 A, 可克隆至 T 载体, 并适用于 ClonMan™ 快速克隆试剂盒 (PN101/PN111/PN112 等)。含染料的 2×LonFrag Taq PCR Master Mix, 只需加入引物和模板即可进行扩增, 提高了通量和结果的重现性。不用对反应进行优化, 即可获得与独立组分形式的 LonFrag™ Taq DNA Polymerase 一样好的结果, 并且扩增结束后即可直接进行电泳。

产品应用

用于DNA片段的PCR扩增、DNA标记、引物延伸、序列测定、DNA平末端加A等, 产物可直接用于TA克隆。

产品组成

组份	PC501-01 250U	PC501-02 1000U	PC501-03 3000U
LonFrag Taq DNA Polymerase (5U/μl)	50 μl	200 μl	
10×LonFrag Taq Buffer (2.5mM Mg ²⁺ Plus)	0.5 ml	2×1 ml	PC501-02×3

产品储存

-20℃保存。

单位定义

用活化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物, 74℃ 30 分钟内, 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)。

质量控制

核酸外切酶残留检测：20 μl 本品和 0.6 μg λ -Hind III 在 37℃下孵育 16 小时, DNA 的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测：20 μl 本品和 0.6 μg Supercoiled pBR322 DNA 在 37℃下孵育 4 小时, DNA 的电泳谱带不发生变化。

功能检测：

1. 以 10ng 人基因组 DNA 为模板, 可以很好的扩增长度为 18 kb 的目的片段。
2. 以 10ng 棉花基因组 DNA 为模板, 可以很好的扩增长度为 21 kb 的目的片段。
3. 以 1ng λ DNA 为模板, 可以很好的扩增长度为 35 kb 的目的片段。
4. 以 50ng HeLa 细胞总 RNA 对应的 cDNA 为模板, 可以很好的扩增长度为 12 kb 的目的片段。
5. 以 10ng 人基因组 DNA 为模板, 并加入 5×PCR Enhancer, 可以很好的扩增长度为 4.2kb 的目的片段 (GC 含量为 65%)。

应用实例

1. 反应体系配置

ddH ₂ O	to 50μl
10×LonFrag Taq Buffer (Mg ²⁺ Plus)	5 μl
25 mM MgCl ₂ ①	optional
dNTP Mixture (10mM each)	1 μl
5 × PCR Enhancer ②	optional
Template③	optional
Primer 1 (10 μM)	2 μl
Primer 2 (10 μM)	2 μl
LonFrag Taq DNA Polymerase (5U/μl) ④	0.5 μl

①. 体系中已含有终浓度为 2 mM 的 Mg²⁺, 对于大多数由本酶催化的 PCR 反应来说是最优浓度; 如有需要, 可用 25 mM MgCl₂ 以 0.2-0.5 mM 为间隔向上摸索 Mg²⁺ 最佳使用浓度。

②. 推荐仅当扩增片段 GC 含量 > 60% 且优化条件也无法正常扩增时使用, 可能会降低保真度。(Protein#PC701)

③. 不同模板最佳反应浓度有所不同, 下表为 50 μl 反应体系推荐模板使用量:

人基因组 DNA	10 ~ 200 ng
大肠杆菌基因组DNA	1 ~ 100 ng
λ DNA	0.1 ~ 10 ng
质粒 DNA	0.1 ~ 10 ng

④. 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。

2. PCR 反应循环的设置

目的片段 < 5 kb

94°C	5 min (预变性)	} 30 ~ 35 cycles
94°C	30 sec	
55°C*	30 sec	
72°C	60 sec/kb	
72°C	7 min (彻底延伸)	

* 退火温度需要根据引物退火温度调整, 一般设置成低于引物退火温度 1-2°C 即可。

目的片段 > 5 kb

94°C	1 ~ 3 min (预变性)	} 30 ~ 35 cycles
94°C	10 sec	
68°C*	30 ~ 60 sec/kb	
68°C	7 min (彻底延伸)	

* 对于 > 5 kb 的片段, 推荐使用长引物, T_m 值在 68-70°C, 把退火/延伸温度合并为 68°C。这样可以显著提高扩增特异性。延长延伸时间有助于提高扩增产量。

引物设计注意事项

1. 引物 3' 端最后一个碱基选择 C 或 G;
2. 引物 3' 端最后 8 个碱基应避免出现连续错配;
3. 引物 3' 端尽量避免出现发夹结构;
4. 引物 T_m 值控制在 55°C-65°C 之间;
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 GC 含量控制在 40%-60% 之间;
7. 正向引物和反向引物 T_m 值以及 GC 含量尽可能一致。