Taq 直扩酶

【产品名称】：Taq 直扩酶

【货号】：　　TZ100S

【包装规格】：　100ul(5U/ul)

【说明】

Direct Taq DNA Polymerase 是经过基因工程改造后的聚合酶，它具有耐受血液及其它抑制物特点，特别适合扩增复杂程度高的环境样品如：土壤、血液、植物、动物、海洋、分泌物、痰液、根系、脂肪、滩涂、环境微生物检测及二代测序等。它具有 5'→3'聚合酶活性，但没有 5'→3'外切酶活性，没有 3'→5'外切酶活性，不适合用水解探针法，可用染料法做荧光定量 PCR 或杂交探针法。扩增产物具有 3'-dA，可直接用于 TA 克隆。该酶来自重组 E.coli. BL21 菌株纯化而得，无 RNA 聚合酶、DNase 和 RNase 污染。

【组成】

名称	数量
Taq 直扩酶(5 U/μl)	100ul
10X Taq Buffer	1ml

【储存条件及有效期】

-20℃及以下，有效期 24 个月。

【使用方法】

1. 各类型样品的处理

1.1 **组织**：迅速剪碎新鲜组织（包括植物、动物）标本（或液氮保存的组织标本），每 50～100mg 组织加入 1ml 无菌超纯水（组织块体积不要超过水体积的 10%），用震荡匀浆器将组织匀浆，直至组织块溶化。4℃12000g 离心 5 分钟，取上清稀释 2 到 4 倍后作为模板。50μl 的 PCR 体系加入 1-5ul 模板。

1.2. **全血**：作为 PCR 模板的抗凝血用量一般为 PCR 反应体系总体积的 1-20%，建议起始使用量为 5%。如果 PCR 反应用于检测基因组的 DNA 片段，可以适当减少抗凝血用量；如果用于检测血液样品中某种病毒或细菌等微生物的目的 DNA 片段，建议使用 50μl 的 PCR

体系，并使用较大的模板血量。对于干血斑样品，20μl 和 50μl 的 PCR 体系中分别推荐使用约 0.8 平方毫米和 2 平方毫米的干血斑。

1.3. **土壤：**取 500mg 土壤样品（注意：如果样本是悬浊液，可 13,300rpm（17,000×g）离心 1min，收集沉淀后再称取 500mg）加入 1ml 无菌超纯水，用震荡匀浆器匀浆，4℃12000g 离心 5 分钟，取上清稀释 2 到 4 倍后作为模板。50μl 的 PCR 体系加入 1-5ul 模板。

1.4 如果直扩效果不好时，建议用相应的 DNA 提取试剂盒提取 DNA 后，再用直扩酶扩增。

2.PCR 反应配制：(注：10mM dNTPs、ddH2O 需要另外订购或自备)

各相应组分在冰上解冻，在冰下按以下顺序配制反应混合液。

10X Taq Buffer	5ul	
dNTPs (10mM,自备)	1ul	终浓度 0.2mM
上下游引物(25pmol/ul)	各 1ul	终浓度 0.5-1pmol/ul
Taq 直扩酶(5 U/μl)	0.5ul	终浓度 2.5U/50ul
DNA 模板	1-5 ul	如果 DNA 较浓，可以 1:2-1:4 稀释使用
ddH2O(自备)	X ul	
合计：	50ul	

注：如果做染料法，还需要加入适量的荧光染料如 sybr greeI 或 eva green。

3.参考扩增程序：

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	5 min	1
变性	95℃	15 sec	35--40
退火/延伸	50-65℃	20 sec	
延伸	72℃	1 min/kb	
终延伸	72℃	5-10 min	1

【注】：退火/延伸温度、终延伸时间可根据引物退火温度和扩增大小适当调整。

【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. 待扩增片段 GC 含量偏高。向 PCR 体系中尝试加入适合扩增高 GC 含量 DNA 片段的 GC-rich PCR Buffer，并相应地根据其要求或说明调整 PCR 反应参数的设置。

c. 目的片段过长。对于过长的目的片段的扩增，需要适当优化引物和 PCR 反应参数。

d. 引物的二级结构、引物二聚体或引物偏短会导致退火效果不佳。此时可以采用 Touch down 等方法进行退火，通常采用 从 65ºC 逐步缓慢降温到 55ºC 或 50ºC 的方法，使退火更加充分。

e. 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。

f. 延伸时间不足。可按照每 1kb 片段延伸 2 分钟进行设置，对于较难扩增的片段可以设置为每 1kb 片段延伸 3-4 分钟。

g. 在不同 PCR 仪上进行 PCR 反应，避免有时 PCR 仪出现问题。

h. 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 30-40。

i. 模板用量偏少，可以在耐血体积范围内适当加大样品用量，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。

j. 对 PCR 引物进行脱盐甚至 PAGE 胶或 HPLC 纯化。

k. 使用高质量的 dNTP 混合物。

l. 适当增加 Direct Taq DNA Polymerase 的用量。

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对于实验结果的判断有很大帮助。

o. 确保没有漏加任何 PCR 组分。

2. 杂带较多或条带弥散

a. 退火温度提高 2-5ºC。

b. 减少样品的用量。

c. 在室温配制 PCR 体系容易产生非特异性条带。推荐在冰浴上配制 PCR 反应体系。

d. 适当减少 Direct Taq DNA Polymerase 的用量，加入适合扩增高 GC 含量 DNA 片段的 GC-rich PCR Buffer。

e. 适当缩短延伸时间。

上海闪晶生物科技有限公司

地址：上海市松江区新桥镇民强路 289 号 6 号门 2 楼

邮编：201612

联系：市场部

电话：021-54460832　800-988-1995