



Long Taq DNA Polymerase

目录号: PC08

目录编号	包装单位
PC0801	250U
PC0802	500U
PC0803	3000U

北京艾德莱科技发展有限公司

订购产品: 8610 82796972

技术支持: 8610 82796972

E-mail: info@aidlab.cn

实验室使用, 仅用于体外

❖ 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、DNA平末端加A等, 产物可直接用于TA克隆。

❖ 产品组成、储存、浓度:

组成	PC0801	PC0802	PC0803
Long Taq DNA Polymerase	250U	500U	3000U
10×Long Taq Buffer (2.5mM Mg ²⁺ Plus)	1ml	1ml	6×1ml

储存: -20 °C 保存。浓度: 5U/μl

❖ 产品介绍:

一般 PCR 法具有一定的局限性, 特别是难以扩增 5 kb 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 用 DNA 聚合酶、PCR 用 Buffer、PCR 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 为模板高效进行 PCR 反应。在人的染色体上可以扩增长度可达 27 kb 的 DNA 片段, 而以 λ DNA 为模板则可以扩增出高达 40 kb 的片段。

❖ 举例说明:

按下列组份配制 50 μl PCR 反应液

Long Taq (5 U/μl)	0.5 -1 μl
10×Long PCR Buffer (Mg ²⁺ Plus)	5 μl
dNTP Mixture (各2.5 mM)	8 μl
模板DNA 2.5ng (λ phage) 或者0.5 μg(Human) 噬菌体 (0.1-5ng), 人基因组(0.1-1 μg)	? μl
引物 1 (20 μM)	0.5-1 μl
引物 2 (20 μM)	0.5-1 μl
灭菌纯水	up to 50 μl



Long Taq DNA Polymerase

目录号: PC08

目录编号	包装单位
PC0801	250U
PC0802	500U
PC0803	3000U

北京艾德莱科技发展有限公司

订购产品: 8610 82796972

技术支持: 8610 82796972

E-mail: info@aidlab.cn

实验室使用, 仅用于体外

❖ 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、DNA平末端加A等, 产物可直接用于TA克隆。

❖ 产品组成、储存、浓度:

组成	PC0801	PC0802	PC0803
Long Taq DNA Polymerase	250U	500U	3000U
10×Long Taq Buffer (2.5mM Mg ²⁺ Plus)	1ml	1ml	6×1ml

储存: -20 °C 保存。浓度: 5U/μl

❖ 产品介绍:

一般 PCR 法具有一定的局限性, 特别是难以扩增 5 kb 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 用 DNA 聚合酶、PCR 用 Buffer、PCR 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 为模板高效进行 PCR 反应。在人的染色体上可以扩增长度可达 27 kb 的 DNA 片段, 而以 λ DNA 为模板则可以扩增出高达 40 kb 的片段。

❖ 举例说明:

按下列组份配制 50 μl PCR 反应液

Long Taq (5 U/μl)	0.5 -1 μl
10 × Long PCR Buffer (Mg ²⁺ Plus)	5 μl
dNTP Mixture (各2.5 mM)	8 μl
模板DNA 2.5ng (λ phage) 或者0.5 μg(Human) 噬菌体 (0.1-5ng), 人基因组(0.1-1 μg)	? μl
引物 1 (20 μM)	0.5-1 μl
引物 2 (20 μM)	0.5-1 μl
灭菌纯水	up to 50 μl

❖ **建议循环条件:**

步骤	温度	时间	循环数目
预变性	94°C	1-2分钟	1
变性	94°C	10-20秒	10
退火	65°C(视引物而定)	30秒	
延伸	68°C	45-60秒/kb*	15-20
变性	94°C	10-20秒	
退火	65°C(视引物而定)	30秒	1
延伸	68°C	45-60秒/kb+1-20秒“自动延长”/循环*	
最后延伸	68°C	10分钟	

*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

❖ **建议循环条件:**

步骤	温度	时间	循环数目
预变性	94°C	1-2分钟	1
变性	94°C	10-20秒	10
退火	65°C(视引物而定)	30秒	
延伸	68°C	45-60秒/kb*	15-20
变性	94°C	10-20秒	
退火	65°C(视引物而定)	30秒	1
延伸	68°C	45-60秒/kb+1-20秒“自动延长”/循环*	
最后延伸	68°C	10分钟	

*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:**

- 10×Long Taq Buffer pH 值较高, 可能会形成[Mg(OH)₂]沉淀, 使用前要充分溶解, 并用 Vortex 保证可能的沉淀重新溶解, 或者 37°C 温育 5 分钟, 然后 Vortex 充分混匀。
- 扩增长片段强烈推荐 0.2 μl 薄壁管。其他试管未经测试。较厚的试管在 92°C 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°C 下进行 2 分钟 (GC 含量高可延长至 5 分钟)。在循环过程中尽可能缩短变性时间 (92~94°C 下进行 10-15 秒), 除非模板中富含 GC, 则 95°C 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 12 kb 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。

❖ **注意事项:**

- 10×Long Taq Buffer pH 值较高, 可能会形成[Mg(OH)₂]沉淀, 使用前要充分溶解, 并用 Vortex 保证可能的沉淀重新溶解, 或者 37°C 温育 5 分钟, 然后 Vortex 充分混匀。
- 扩增长片段强烈推荐 0.2 μl 薄壁管。其他试管未经测试。较厚的试管在 92°C 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°C 下进行 2 分钟 (GC 含量高可延长至 5 分钟)。在循环过程中尽可能缩短变性时间 (92~94°C 下进行 10-15 秒), 除非模板中富含 GC, 则 95°C 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 12 kb 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。

- 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 到终浓度 1%-8%, 最常用 2% (<30kb) 或者 4% (>30kb) 往往会改善扩增效果。
- 扩增长片段, 引物一般终浓度为 0.3-1 μM, 长度最好为 27-36bp; 退火温度一般在 65°C-70°C, 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。
- 模板一般使用 0.01-2.5ng (λ phage) 或者 0.1-1 μg (Human)
- 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 Mg²⁺的浓度是必需的。如果含有较高 EDTA 或者螯合剂, 则应该提高 Mg²⁺; 如果要增加 dNTP 浓度, 相应也要增加 Mg²⁺浓度。

- 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 到终浓度 1%-8%, 最常用 2% (<30kb) 或者 4% (>30kb) 往往会改善扩增效果。
- 扩增长片段, 引物一般终浓度为 0.3-1 μM, 长度最好为 27-36bp; 退火温度一般在 65°C-70°C, 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。
- 模板一般使用 0.01-2.5ng (λ phage) 或者 0.1-1 μg (Human)
- 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 Mg²⁺的浓度是必需的。如果含有较高 EDTA 或者螯合剂, 则应该提高 Mg²⁺; 如果要增加 dNTP 浓度, 相应也要增加 Mg²⁺浓度。