

Version 1

Cat No. AG11511

# *Exp Taq* DNA 聚合酶 ( 含 GC Buffer )

## *Exp Taq* DNA Polymerase with GC Buffer

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



## ➤ 产品概述

本制品是专门针对高 GC 含量模板设计的 PCR 扩增产品，对 DNA Polymerase、反应 buffer 进行优化，非常适合于富含 GC 序列或含有重复序列的基因组 DNA 和 cDNA 模板的扩增；同时，制品具有错配率低以及扩增性能强的特点。使用本制品扩增得到的大部分 PCR 产物 3' 端带有一个 A 碱基，可直接克隆于 T 载体。

为了获得更好的扩增效果，本制品配有两种反应 Buffer：2X GC buffer I 与 2X GC buffer II；一般情况下建议先使用 2X GC buffer I 进行 PCR 扩增，如果不能得到理想的结果，可再使用 2X GC buffer II 进行尝试。

## ➤ 产品组成

组分名称	AG11511 ( 50 rxns / 50 $\mu$ l )
<i>Exp Taq</i> DNA Polymerase ( 5 U / $\mu$ l )	25 $\mu$ l
2X GC buffer I	625 $\mu$ l x 2 pc
2X GC buffer II	625 $\mu$ l x 2 pc
dNTP Mix (10 mM each )	100 $\mu$ l

## ➤ 保存

保存温度：-20°C

运输温度：干冰或者-20°C冰袋运输

## ➤ 活性定义

在 74°C、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 脱氧核苷酸摄入到酸不溶物质所需的酶活性定义为 1 个活性单位 ( U )。

## ➤ 产品优势

1. 本制品是专门针对高 GC 含量模板设计的 PCR 扩增产品 DNA Polymerase、反应 buffer 都经过优化，非常适合于复杂结构，富含 GC 序列或含有重复序列的基因组 DNA 和 cDNA 模板扩增。
2. 大部分 PCR 产物 3' 端带有一个 A 碱基，可直接克隆于 T 载体。
3. 扩增不同类型模板的高 GC 基因均具有良好的性能。

## ➤ 实验原理

## PCR 扩增原理

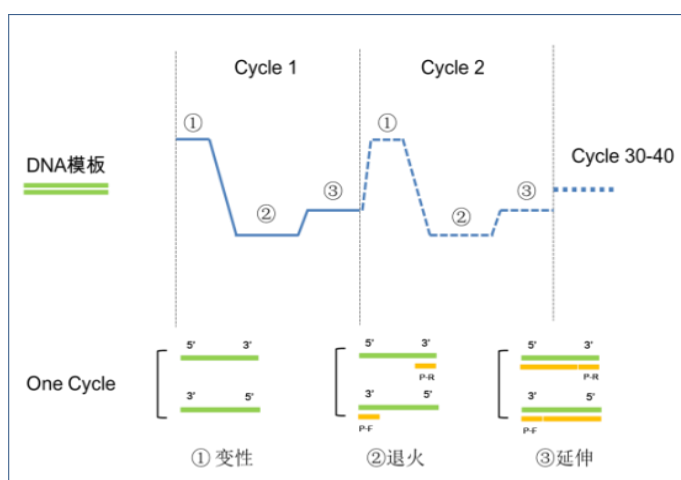
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

扩增详情如下，一般将步骤①②③称为一个循环，每次进行 DNA 扩增时以此循环 30-40 次。进行 PCR 扩增时，可根据引物的不同调整退火温度，进而获得最优 PCR 扩增反应条件。

步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

步骤②：引物与单链 DNA 进行退火；

步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下进行延伸，与单链 DNA 形成互补链；



## ➤ 使用注意事项

1. 产品中 *Exp Taq* DNA Polymerase 甘油浓度较高，使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部，减少损失，并用移液枪轻柔吸打混匀，过程中尽量避免起泡，然后再进行使用。
2. 反应体系需要在冰上配制，配制完后放进 PCR 仪中进行反应。
3. 试剂盒中的各组分均需要在 -20°C 保存，使用前于冰上溶解后，轻柔混匀后再进行使用。

## ➤ 实验前准备

### 1. 试剂 & 耗材：

Primer、DNA 模板、PCR 管、枪头、冰浴或冰盒。

### 2. 仪器：

PCR 仪、移液器、旋涡振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪。

## ➤ 操作方法

### 1. 配制 PCR 反应液

- 1) 首先按照下表所示配制 PCR 反应液。反应体系需要在冰上配制。
- 2) 将配制好的溶液轻轻的涡旋振荡混匀。

**反应体系 ( 50  $\mu$  l )**

组分名称	反应终浓度	50 $\mu$ l 体系
<i>Exp Taq</i> DNA Polymerase ( 5 U / $\mu$ l )	2.5 U	0.5 $\mu$ l
2X GC buffer I or II <sup>1</sup>	1 X	25 $\mu$ l
dNTP Mix ( 10 mM each )	0.4 mM	2 $\mu$ l
Template	< 1 $\mu$ g	-
Primer F ( 10 $\mu$ M ) <sup>2</sup>	0.2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Primer R ( 10 $\mu$ M ) <sup>2</sup>	0.2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
RNase free water	-	Up to 50 $\mu$ l

\*1: 本制品配有 2 种 Buffer, 推荐先使用 2X GC buffer I; 如得不到很好地扩增, 可使用 2X GC buffer II 进行尝试。

\*2: 通常引物终浓度为 0.2  $\mu$  M 可以得到较好的结果, 也可根据具体实验情况在 0.2 ~ 1.0  $\mu$  M 范围内调整引物浓度。

**2. 反应条件 ( 以三步法 PCR 反应程序为例<sup>1</sup> )**

将加好样的 Tube 放置于 PCR 仪中, 然后按照下表条件进行 PCR 反应:

步骤	温度	时间	循环数
预变性 <sup>2</sup>	94°C	1 min	1
变性 <sup>3</sup>	94°C	30 sec	} 30-35
退火 <sup>4</sup>	55°C	30 sec	
延伸	72°C	1 min / kb	
最终延伸	72°C	2 min	1

\*1: 当引物 T<sub>m</sub> 值较高或者 3 Step PCR 扩增结果不好, 也可尝试 2 Step PCR 扩增 ( 两步法程序可参考附录 ) 。

\*2: 预变性条件 94°C 1min 可获得比较好的结果, 对于特别复杂的模板, 如扩增结果不理想, 可调整预变性时间 1-5 min。

\*3: 变性条件的设定可根据设备进行调整, 一般 94°C 20-30 sec, 98°C 5-10 sec。

\*4: 退火温度主要取决于上下游引物的 T<sub>m</sub> 值, 通常可按照 T<sub>m</sub>  $\pm$  5°C 设定。

**3. 结果检测**

反应结束后, 取适量反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

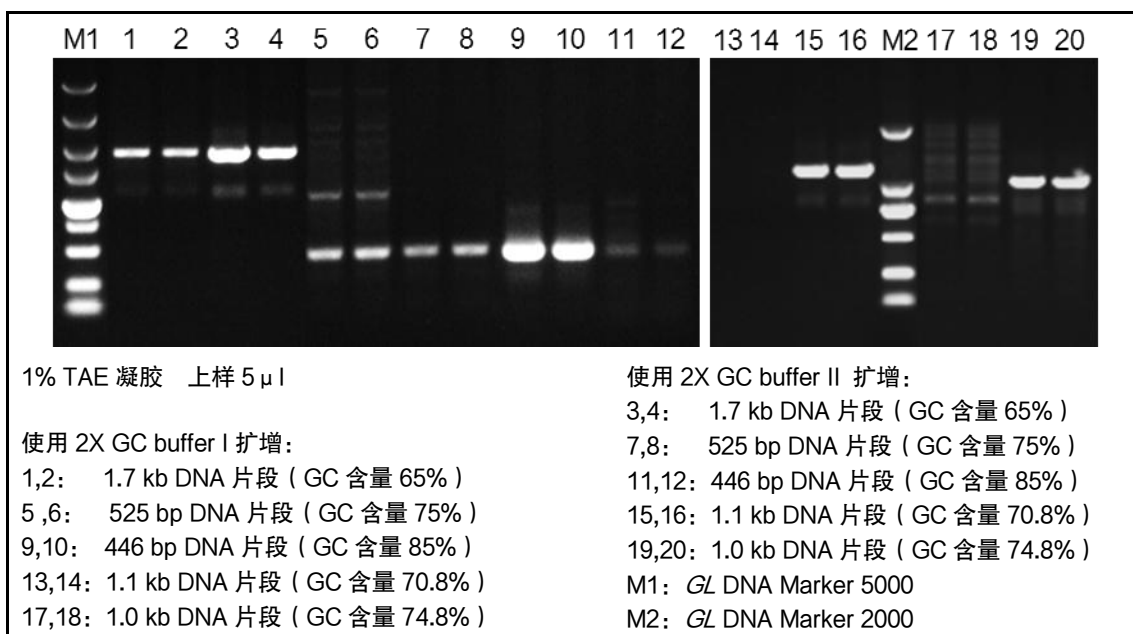
➤ **实验例**

1. 以 Human gDNA 为模板，分别采用本试剂盒的 2X GC buffer I 和 2X GC buffer II 扩增不同 GC 含量的 DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	30 sec	}
60°C	30 sec	
72°C	1 min / kb	
72°C	2 min	1

电泳结果如下图所示:

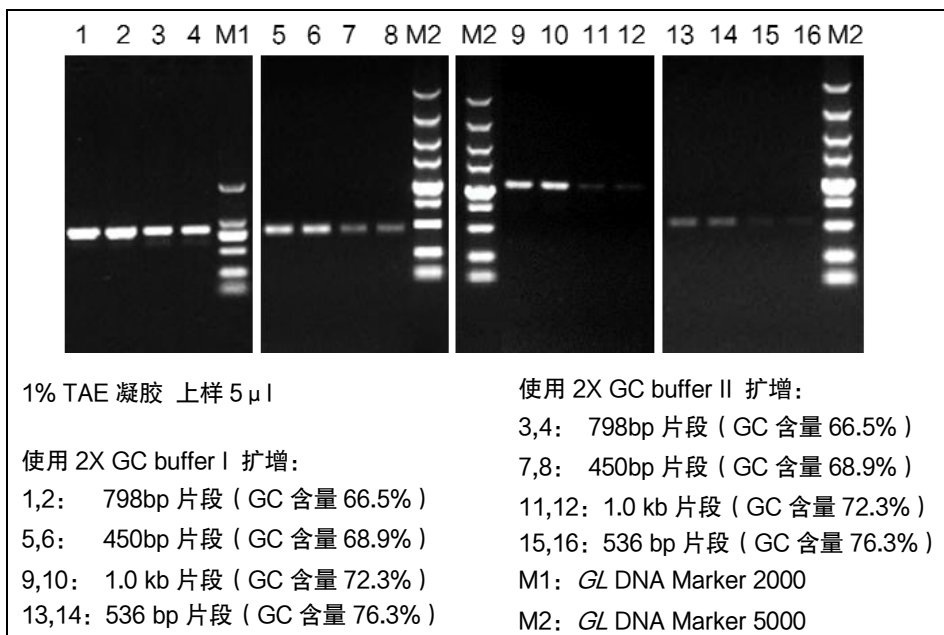


2. 以小鼠 gDNA 为模板，分别采用本试剂盒的 2X GC buffer I 和 2X GC buffer II 扩增不同 GC 含量的 DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	30 sec	}
60°C	30 sec	
72°C	1 min / kb	
72°C	2 min	1

电泳结果如下图所示：

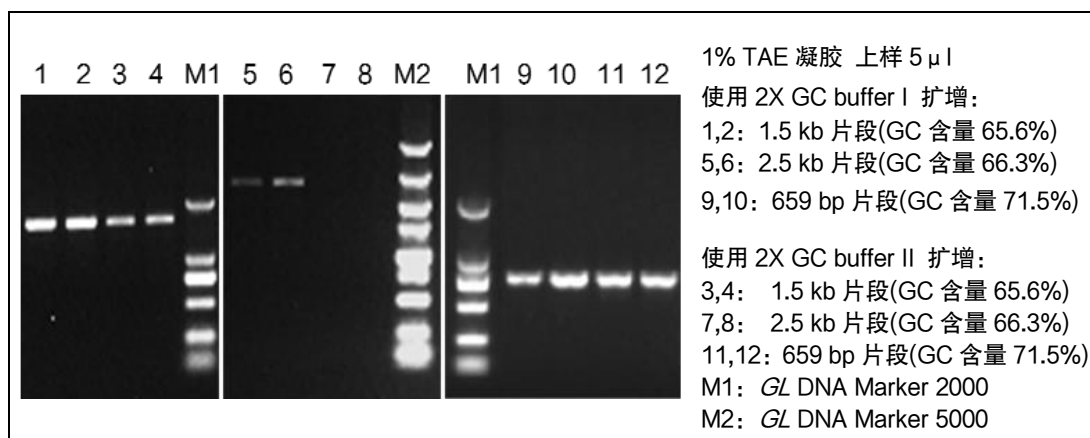


3. 以猪 gDNA 为模板，分别采用本试剂盒的 2X GC buffer I 和 2X GC buffer II 扩增不同 GC 含量的 DNA 片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	30 sec	} 30
60°C	30 sec	
72°C	1 min / kb	
72°C	2 min	1

电泳结果如下图所示：

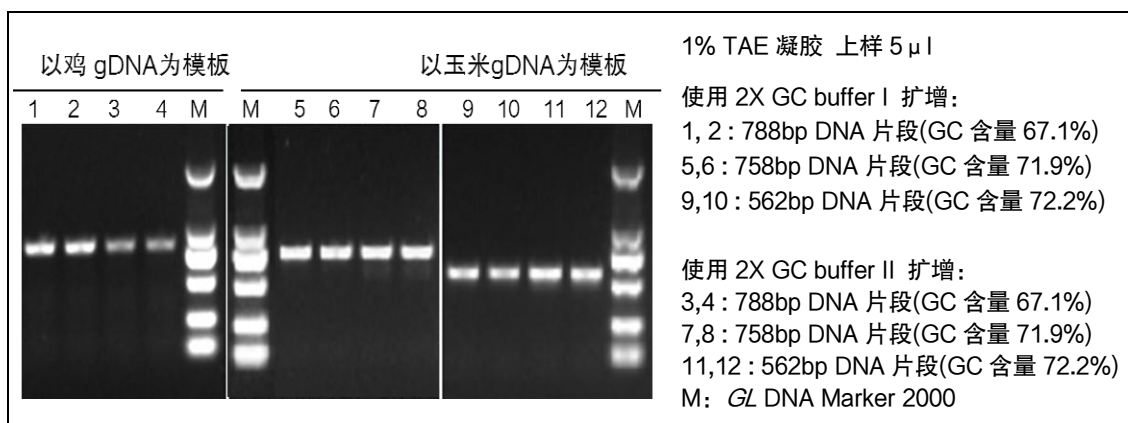


4. 以鸡或玉米 gDNA 为模板，分别采用本试剂盒的 2X GC buffer I 和 2X GC buffer II 扩增不同 GC 含量的 DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	30 sec	} 30
60°C	30 sec	
72°C	1 min / kb	
72°C	2 min	1

电泳结果如下图所示:

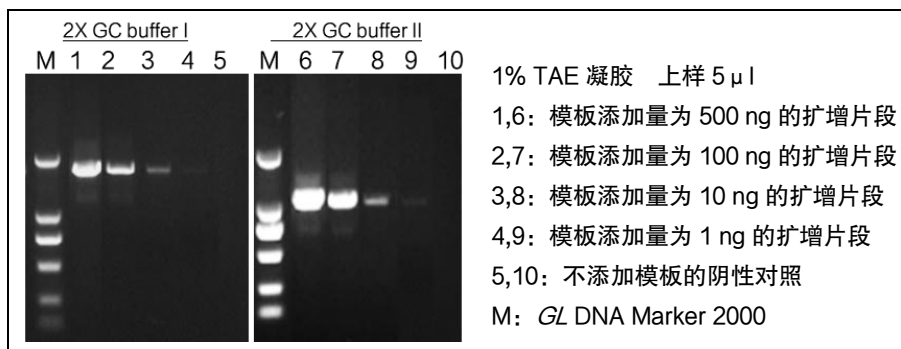


5. 以小鼠 gDNA 为模板，添加不同模板量 ( 500 ng、100 ng、10 ng、1 ng )，分别采用本试剂盒的 2X GC buffer I 扩增 1658 bp DNA 片段 ( GC 含量 65% ) 和 2X GC buffer II 扩增 1166 bp DNA 片段 ( GC 含量 70.8% )，模板量低至 1 ng 时，都可扩增出目的片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
94°C	30 sec	} 30
60°C	30 sec	
72°C	2 min	
72°C	2 min	1

电泳结果如下图所示:



## ➤ 产品注意事项

### 1. 合适的模板

- ❖ 模板加入量降低时，扩增效率降低，扩增特异性升高；模板加入量升高时，扩增效率升高，扩增特异性降低；可根据实际情况调整模板加入量。
- ❖ 模板的纯度及完整性严重影响 PCR 反应，采用高质量高纯度的 DNA 模板，可提高 PCR 反应的成功率，降低外源污染。模板不纯、降解或模板中含有抑制 PCR 反应的物质等，都可能会导致 PCR 反应扩增效率降低，PCR 反应产物产量减少。建议更换模板，重新实验。

### 2. 合适的引物

- ❖ 引物一般是 15-30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40-60% 之间。
- ❖ 建议正反向引物  $T_m$  值在 50-70 $^{\circ}$ C，两引物  $T_m$  值相差不超过 5 $^{\circ}$ C。
- ❖ 引物 A、T、C、G 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
- ❖ 引物 3' 端避免出现发夹结构。减少正反向引物之间的互补序列，最好不要超过 4 个连续互补序列。
- ❖ 合适的引物浓度为 0.2~1.0  $\mu$ M。引物浓度降低时，扩增效率降低，反应特异性升高。引物浓度升高时，扩增效率升高，反应特异性降低。

### 3. dNTPs 浓度

- ❖ 本产品的反应体系中，推荐的 dNTPs 终浓度 400  $\mu$ M。
- ❖ dNTPs 浓度过高，可能会与  $Mg^{2+}$  结合，影响 DNA 聚合酶活性；同时，高浓度的 dNTPs 会降低扩增特异性，产生 smear 带。
- ❖ dNTPs 浓度过低，可能会降低扩增效率。

### 4. 合适的退火温度及时间

- ❖ 退火温度越高，扩增特异性越高，但一定程度上扩增效率会降低。
- ❖ 退火温度过低，可能导致反应特异性不好，并且可能出现引物二聚体。

### 5. 延伸温度及时间



- ❖ *Exp Taq* DNA polymerase 的最佳延伸温度是 70–75°C，一般推荐 72°C，延伸速度推荐 1min / kb，可在 30 sec / kb ~1 min / kb。

## 6. 扩增循环数

- ❖ 扩增循环数取决于模板的初始拷贝数。如果模板的初始拷贝数少于 10 个，则需要大约 40 个循环。对于初始拷贝数较高的模板，一般推荐 25–35 个循环。

## 7. 防止污染措施

- ❖ 配制反应液与添加 DNA 模板的区域最好分开，避免交叉污染。
- ❖ 每次实验设置不添加模板的阴性对照，以检查是否存在污染。

## ➤ 附录

( 两步法 PCR 反应程序 )

Step	温度	时间	Cycles
预变性	94°C	1 min	1
变性	94°C	30 sec	} 30–35
延伸	68°C	1 min / kb	
最终延伸	72°C	2 min	1