

组分	#M0131	#M0132	#M0133
Taq 聚合酶 (5 U/μl)	80 μl	200 μl	80 μl×5
10× 标准Taq 反应缓冲液	1.5 ml×2	1.5 ml×5	1.5 ml×10

**概述:** Taq DNA聚合酶是一种耐热聚合酶, 该酶具有5'→3'聚合酶活性和双链特异性5'→3'核酸外切酶活性<sup>(1,2,3)</sup>。该酶是PCR中应用最广泛的酶。为了便于各种PCR反应, 标准Taq缓冲液不含有非离子变性剂, 适用于要求无变性剂的反应的需要<sup>(4,5)</sup>。

**来源:** 来源于一种*E. coli*菌株, 此菌株含有来源于*Thermus aquaticus* YT-1的Taq DNA聚合酶基因。

**应用:** 常规PCR, 微阵列分析, 高通量PCR, DHPLC, 菌落PCR。

**贮存溶液:** 20 mM Tris-HCl (pH 8.0 @ 25 °C), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% NP-40和50%甘油(V/V)。

**反应缓冲液:** (随酶提供) 10×标准Taq反应缓冲液。

**反应条件:** 100 μl的反应体系含: 1×标准Taq反应缓冲液, DNA模板, 引物, 200 μM dNTPs和2-5 U的聚合酶。

**1×标准Taq反应缓冲液:** 10 mM Tris-HCl (pH 8.3 @ 25 °C), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>。

**单位定义:** 1单位指75°C条件下反应30分钟, 能使10 nmol的dNTPs掺入酸不溶性沉淀物所需要的酶量。

**活性检测条件:** 1×标准Taq反应缓冲液, 每种dNTP (包括<sup>3</sup>H-dNTP) 各200 μM以及200 μg/ml的活化小牛胸腺DNA。

**热失活条件:** 无。

**储存温度:** -20°C。

## 质量控制检测:

**5 kb Lambda PCR:** 以5 ng Lambda DNA为模板, 在1×标准Taq反应缓冲液中加入200 μM dNTPs、0.2 μM引物和2.5 U的聚合酶进行PCR扩增25个循环, 获得5 kb特异性产物100 ng。

**核酸内切酶活性:** 50 μl反应体系中, 20 U本酶与1 μg的pUC19质粒于37°C下温育4小时, DNA的电泳条带无明显变化。

## 参考文献:

1. Chien, A., Edgar, D.B. and Trela, J.M. (1976). *J. Bact.*, 127, 1550-1557.
2. Kaledin, A.S., Sliusarenko, A.G. and Gorodetskii, S.I. (1980). *Biokhimiya*, 45, 644-651.
3. Lawyer, F.C. et al. (1993). *PCR Methods and Appl.*, 2, 275-287.
4. Longley, M.J., Bennett, S.E. and Mosbaugh, D.W. (1990). *Nucleic Acids Res.*, 18, 7317-7322.
5. Lyamichev, V., Brow, M.A. and Dahlberg, J.E. (1993). *Science*, 260, 778-783.

## PCR应用指南:

Taq DNA聚合酶广泛的应用于聚合酶链式反应(PCR)的一种聚合酶, 以下的建议可基本确保该酶成功地完成PCR反应。这些建议涵盖了常规的PCR反应。富含GC模板、有二级结构的模板、低模板浓度以及扩增超过5 kb以上模板时, 需要相应的调整反应条件。

**1. DNA模板:** 以高质量、纯化后的DNA模板可以提高PCR反应成功的几率, 而避免之前相关PCR反应的污染也非常关键。一般而言, 在进行25-30轮循环后, 要检测到产物, 需要大约10<sup>4</sup>拷贝数的目的DNA。也就是说需要终浓度为0.1 ng/ml的质粒病毒DNA, 1-10 μg/ml的基因组DNA。

**2. 引物:** 寡核苷酸引物的长度一般为20-30 bp, 理想的GC含量应为40-60%, 并且平均的分布在引物中。理论退火温度一般是在42-65°C之间, 两引物的退火温度相差应在5°C以内。引物内不能存在二级结构, 如发夹结构, 两引物之间不能互补, 以防出现引物二聚体而减少产量。有很多软件都可以设计出合适的引物。一个典型的PCR反应中, 引物的浓度应约为0.1-0.5 μM。

**3. Mg<sup>2+</sup>浓度:** 大多数使用Taq DNA聚合酶的PCR反应, 最适Mg<sup>2+</sup>浓度一般为1.5-2.0 mM。可以用0.5或1.0 mM递增浓度来确定最适Mg<sup>2+</sup>浓度。

**4. dNTPs:** 每种dNTPs的浓度一般都为200 μM。

**5. Taq DNA聚合酶:** PCR反应体系中Taq DNA聚合酶的终浓度一般是20 U/ml。但在进行特异性扩增时, 可用5-50 U/ml的用量。

**6. 起始反应:** 反应开始以及在第一轮热循环时, 非特异性链的合成, 是一些PCR反应中产生非预期产物的原因, 这种现象可以通过以下步骤来避免: 所有的反应成分都应置于冰上, 且添加反应成分亦需在冰上操作, 最后加入聚合酶, 并立即将反应体系置于已预热至变性温度(94°C)的扩增仪中。

# Taq DNA聚合酶

- 7. 变性温度与时间:** 为使DNA完全变性, PCR循环前, 起始变性温度通常为94°C。热循环中DNA要在94°C有15-30秒的变性, 这也依赖于所使用的扩增仪及PCR管。根据扩增仪的相关资料, 来确定是否需要增加特异的反应步骤。
- 8. 退火温度与时间:** 通常, 退火温度的选择需与引物的 $T_m$ 值相匹配, 一般在55-60°C之间。15-30秒的退火时间是比较合适的。
- 9. 延伸时间:** 延伸反应通常为72°C, 一般而言, 每合成1000 bp需要一分钟, 当延伸长度小于1 kb时, 需要的时间为45-60秒。

## Taq DNA聚合酶PCR反应体系:

以 $\lambda$  DNA为模板进行PCR扩增反应

1. 按下列组份配制PCR反应液。

Taq (5 U/ $\mu$ l)	0.25-0.5 $\mu$ l
10 $\times$ PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> Plus)	5 $\mu$ l
dNTP Mixture (各2.5 mM) <sup>a</sup>	4 $\mu$ l
模板DNA ( $\lambda$ DNA) <sup>b</sup>	2.5 ng
引物1 (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
引物2 (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
水	至50 $\mu$ l

[a]: 如果使用dNTP Mixture (各10 mM), 则50  $\mu$ l PCR体系的加入量为1  $\mu$ l

[b]: 50  $\mu$ l PCR反应体系中模板DNA推荐使用量

人基因组DNA	0.1 $\mu$ g~1 $\mu$ g
大肠杆菌基因组DNA	10 ng~100 ng
$\lambda$ DNA	0.5 ng~5 ng
质粒DNA	0.1 ng~10 ng