



Quick-Load *Taq* 2× Master Mix (with loading dye)

组分	#M0321
Quick-Load <i>Taq</i> 2× Master Mix	1.25 ml
25 mM MgCl ₂ Solution	1.5 ml

概述: Quick-Load *Taq* 2× Master Mix是一种经优化的即用型溶液, 包含*Taq* DNA聚合酶、dNTPs、MgCl₂、KCl、示踪染料及稳定剂。本品中含有两种常用于DNA胶的示踪染料, 染料橙黄G和二甲苯蓝FF, 使预混液呈绿色, PCR产物可直接上样于琼脂糖凝胶。在1× TBE中, 以1%的琼脂糖凝胶电泳, 染料橙黄G的迁移率约为50 bp, 二甲苯蓝FF的迁移率约4 kb, 本品中所含的示踪染料不会与DNA条带产生共迁移。Quick-Load *Taq* 2× Master Mix非常适用于模板为纯化的DNA溶液、细菌克隆和cDNA产物的常规PCR反应, 以复杂的基因组DNA为模板可扩增长达4kb的片段, 以Lambda DNA为模板则可达5 kb的长度。

Taq DNA聚合酶是一种耐热DNA聚合酶, 该酶具有5'→3'聚合酶活性和双链特异性的5'→3'核酸外切酶活性。

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

应用: PCR, 引物延伸, 微阵列分析, 高通量 PCR。

随酶提供的试剂: 25 mM MgCl₂。

反应条件: 25 μl或50 μl反应体系中加入1× Quick-Load *Taq* Master Mix、DNA模板和引物。

1× Quick-Load *Taq* Master Mix: 10 mM Tris-HCl (pH8.6@25°C), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 U/ml *Taq* DNA 聚合酶, 0.2 mM dNTPs (每种), 5%甘油, 0.08% NP-40, 0.05% Tween-20, 0.024%染料橙黄G, 0.0025%二甲苯蓝FF。

单位定义: 1单位指在75°C反应30分钟, 能使10 nmol的dNTP掺入酸不溶性沉淀物中所需要的酶量。

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

热失活: 无。

质量控制检测:

5 kb Lambda PCR: 以5 ng Lambda DNA为模板, 在1× Quick-Load *Taq* Master Mix中加入0.2 μM引物进行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., Slyusarenko, 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.
6. Saiki, R.K. *et al.* (1985) *Science*, 230, 1350-1354.
7. Powell, L.M. *et al.* (1987) *Cell*, 50, 831-840.
8. Sun, Y., Hegamyer, G. and Colburn, N. (1993) *Biotechniques*, 15, 372-374.
9. Sarkar, G., Kapelner, S. and Sommer, S.S. (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18, 7465.

PCR使用指南:

Taq DNA聚合酶是PCR应用最为广泛的酶。以下使用指南适用于使用Quick-Load *Taq* 2× Master Mix时进行常规PCR反应。当PCR模板富含GC、具有复杂二级结构、低浓度或产物>5kb时可能要求改变相应的条件。

DNA模板: 使用高质量、经过纯化的DNA模板能更大地提高PCR反应的成功率。对于典型的PCR反应, 在25-30个PCR循环中, 要求有约10⁴拷贝数的目的DNA。因此, 对于质粒或病毒, 模板浓度要求为0.01~1 ng/ml, 基因组DNA则为1~10 μg/ml。使用菌落时大小应为<1 mm², 并在循环反应前充分悬浮。



Quick-Load *Taq* 2× Master Mix (with loading dye)

引物: 寡核苷酸引物长度通常含20~30个核苷酸, 并且最好GC含量在40~60%并均匀分布于引物中。两条引物的理论计算退火温度 (T_m) 通常应该在42~65°C之间, 而且两条引物间相差不超过5°C。

建议在设计PCR引物时为了获得最佳结果请借助于计算机引物设计程序, 如Primer3。

在典型的PCR反应中, 每条引物的终浓度为0.1~0.5 μM , 最佳为0.2 μM 。

Mg离子浓度: 在Quick-Load *Taq* 2× Master Mix中Mg离子浓度为3 mM, 在PCR反应中终浓度为1.5 mM。该浓度可以满足大多数的需求。如有需要, 可以按0.5 mM递增量进一步优化Mg离子浓度。

核苷酸: dNTPs的浓度通常是每种核苷酸为200 μM 。

Quick-Load *Taq* 2× Master Mix浓度: 加入Quick-Load *Taq* 2× Master Mix使其浓度为1×。

起始反应: 在一些PCR反应中, 建立反应以及进行PCR循环前的非特异性引物合成已被确定是非特异性产物的来源。通常可以通过在冰上配制反应成分, 最后加入Quick-Load *Taq* 2× Master Mix以及将热循环仪预热至变性温度 (95°C) 后立即进行反应来避免非特异性产物的产生。

变性温度与时间: 在PCR循环前为了充分使DNA变性, 要求初始变性温度为95°C。对于菌落PCR推荐起始95°C变性5分钟。完全悬浮菌落非常重要。在热循环时, 应使用94~95°C变性15秒至1分钟, 具体参数可根据热循环仪和所使用的反应管进行调整。

退火温度与时间: 退火温度应选择与引物对的 T_m 值匹配的温度, 通常在45~70°C之间。退火时间通常为15秒~1分钟。退火温度可以通过以低于理论 T_m 值5°C为起始温度进行PCR温度梯度优化。

延伸时间: 延伸反应通常在72°C下进行, 延伸时间根据所需扩增产物的长度而定。通常每1000个碱基对使用延伸时间为1分钟。对于<1 kb的产物延伸时间为45~60秒。建议在72°C下最终延伸5分钟。

典型的循环反应条件: 扩增500 bp片段的典型PCR反应条件如下:

1个循环: 94°C~95°C 1~5分钟

25~40个循环: 94°C~95°C 15~30秒; 45°C~70°C 10~30秒; 72°C 1分钟/kb

1个循环: 72°C 5分钟 (完成所有模板的复制)

1个循环: 4°C~10°C (保存样品以备下一步实验使用)

注意: 长期贮存请存放于-20°C。Quick-Load *Taq* 2× Master Mix反复冻融数次仍保持稳定。本品如果存放于4°C超过三个月, 以Lambda DNA为模板扩增5 kb片段时只获得50%的产量。