

Version: AF 3.2 (2021.04.01修订)

2×Spark Long Taq PCR Master Mix (0.1 U/μL)

目录号: AF0402、AF0403

01/产品组分

货号	AF0402-A	AF0402-B	AF0403-A	AF0403-B
规格	1 mL	1 mL×5	1 mL	1 mL×5
染料	+	+	-	-

02/保存条件

本产品组分-20℃保存。

03/产品概述

本产品包含 Spark Long Taq DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液，浓度为 2×。具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点，能避免 PCR 操作过程中的污染，可最大限度的减少人为误差。可用于长片段 DNA 扩增和 GC 含量高、二级结构复杂片段的扩增。

使用时只需取适量 2×Spark Long Taq PCR Master Mix 溶液，加入模板和引物，并加入去离子水补足体积，使 Master Mix 溶液浓度为 1×即可进行反应。

04/质量控制

经检测无外源核酸酶活性；能有效扩增人基因组中的单拷贝基因；室温存放一周，无明显活性改变。

05/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、平末端加 A 等，产物可以直接用于 T/A 载体克隆。

06/实验流程

反应体系

操作在冰上进行，各组分解冻后请充分混匀后使用，用完后请及时放回-20℃保存。反应体系不同，可按此比例增加或减少产品用量。

Components	Volume
Template	optional
Forward Primer (20 μM)	0.5-1 μL
Reverse Primer (20 μM)	0.5-1 μL
2×Spark Long Taq PCR Master Mix	25 μL
ddH ₂ O	up to 50 μL

▲PCR反应体系中，不同模板的最佳反应浓度有所不同，50 μL体系推荐模板使用量如下：

模板种类	模板使用量
质粒或病毒DNA	1-30 ng
基因组DNA	0.1~1 μg
λ DNA	2.5 ng
噬菌体	0.1~5 ng

反应程序

94℃:	3 min	} 30 cycles
94℃:	30 sec	
T _m :	30 sec	
72℃:	45-60sec/kb	
72℃:	5 min	

▲退火温度需根据引物的 T_m 值进行调整，若有需要，可通过进行退火温度梯度 PCR 寻找引物与模板结合的最佳退火温度。

▲不同种类的模板选择合理的延伸时间有助于提高 PCR 扩增产量，如：扩增质粒或病毒 DNA 时以 45 sec/ kb 的速度进行扩增，基因组或 cDNA 以 60 sec/ kb 的速度进行扩增。

以下是不同长度的片段建议的延伸时间表：

PCR片段长度 (kb)	延伸时间 (min)
3	2
6	4
10	7
15	10
20	14
25	17
30	20
35	24
40	27
45	30

07/结果检测

反应结束后取 5 μ L 反应产物，在适合浓度的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。如果 PCR 产品中含染料，那扩增后的产物不需加上样缓冲液，可直接上样进行电泳。

08/注意事项

- ◇ 扩增长片段强烈推荐使用 0.2 mL 薄壁管。其他试管未经测试。较厚的试管在 92°C 时不能有效的使模板变性。实验时尽可能缩短变性时间，降低变性温度。第一步在 92-94°C 的温度下预变性 2 分钟（GC 含量高可延长变性时间至 5 分钟）。长片段在循环过程中尽可能缩短变性时间（92-94°C 下变性 10-15 秒），若模板中 GC 含量丰富，则 95°C 变性 30 秒。这可以防止 DNA 脱嘌呤和链断裂，当扩增的基因组 DNA 片段长度超过 12 kb 时，应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 含量高或扩增片段较长，可在反应混合物中加入甜菜碱或 DMSO，甜菜碱终浓度为 1-2.5 M，DMSO 终浓度为 1%-8%，最常用的浓度为 2% (<30 kb) 或 4% (>30 kb)。
- ◇ 扩增长片段，引物一般终浓度为 0.3-1 μ M，长度最好为 27-36 bp；退火温度一般在 65°C-70°C 之间，此时退火温度和延伸温度基本一致，可将退火和延伸设置为同一温度进行，使用 2 步法扩增。如果设计的引物在 20 bp 左右，则推荐使用传统 3 步法扩增。

09/相关产品

- AF0102 2×Spark Taq PCR Master Mix (with dye)
- AF0801 2×Spark LongHiFi PCR Master Mix (with dye)
- AF1402 SuperPure dNTP Mixture each 10mM solution
- AJ0101 Spark 2000 DNA Marker
- AJ0201 Spark 6×DNA Loading Buffer (双染料)
- AJ0210 Sparkred

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

