Vazyme LAmp® DNA Polymerase (Mg^{2+} plus buffer)

P301

Version 5.1

Vazyme biotech co., ltd.

产品简介

Vazyme LAmp® DNA Polymerase是Taq DNA Polymerase与一种含有3'→5'外切酶活性 (校对活性)的蛋白组成的混合酶，保真度是Taq DNA Polymerase的6倍。配合特别优化的缓冲体系，Vazyme LAmp® DNA Polymerase非常适合长片段的扩增，可从基因组中扩增长达21kb的片段，并且对不同来源、不同长度的模板均具有很高的扩增效率。PCR产物的3'端带A，可克隆至T载体，并适用于ClonExpress® 快速克隆试剂盒 (C112/C113)。附带的PCR Enhancer可有助于高GC含量片段的扩增。

产品组成

组　分	P301-01 125 U 50 rxn (50 μl/rxn)	P301-d1 125 U 50 rxn (50 μl/rxn)	P301-02 500 U 200 rxn (50 μl/rxn)	P301-d2 500 U 200 rxn (50 μl/rxn)
10 × Vazyme LAmp® Buffer (Mg^{2+} plus)	500 μl	500 μl	1 ml × 2	1 ml × 2
Vazyme LAmp® DNA Polymerase (5 U/μl)	25 μl	25 μl	100 μl	100 μl
dNTP Mix (10 mM each)	------	100 μl	------	400 μl
5 × PCR Enhancer	125 μl	125 μl	500 μl	500 μl
10 × Loading buffer	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml × 2	1.25 ml × 2

储存条件

-20℃保存。

单位定义

用活化的大马哈鱼精子DNA 作为模板/引物，74℃ 30分钟内，摄入10 nmol的全核苷酸为酸性不溶物的活性定义为1个活性单位 (U)。

质量控制

核酸外切酶残留检测：10 U的本酶和0.6 μg λ-Hind III在37℃下孵育16小时，DNA的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测：10 U的本酶和0.6 μg Supercoiled pBR322 DNA在37℃下孵育4小时，DNA的电泳谱带不发生变化。

RNase残留检测：10 U的本酶和1 μg Hela细胞总RNA在37°C下孵育1小时，RNA的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌DNA残留检测：10 U本品中残留的核酸经*E.coli* 16s rDNA特异性的TaqMan qPCR检测，*E.coli*基因组残留低于10拷贝。

功能检测：

1. 50 μl体系中体系中加入2.5 U本酶，以10 ng人基因组DNA为模板，可以很好的扩增长度为18 kb的目的片段。
2. 50 μl体系中体系中加入2.5 U本酶，以10 ng棉花基因组DNA为模板，可以很好的扩增长度为21 kb的目的片段。
3. 50 μl体系中体系中加入2.5 U本酶，以1 ng λDNA为模板，可以很好的扩增长度为35 kb的目的片段。
4. 50 μl体系中体系中加入2.5 U本酶，以50 ng HeLa细胞总RNA对应的cDNA为模板，可以很好的扩增长度为12 kb的目的片段。
5. 50 μl体系中体系中加入2.5 U本酶，并加入5 × PCR Enhancer，以10 ng 人基因组DNA为模板，可以很好的扩增长度为4.2 kb的目的片段 (GC含量为65%)。

应用实例

1. 反应体系配制

ddH_2O	to 50 μl
10 × Vazyme LAmp® Buffer (Mg^{2+} plus)	5 μl
25 mM $MgCl_2$ [a]	optional
dNTP Mix (10 mM each)	1 μl
5 × PCR Enhancer [b]	optional
模板DNA [c]	optional
引物1 (10 μM)	2 μl
引物2 (10 μM)	2 μl
Vazyme LAmp® DNA Polymerase (5 U/μl) [d]	0.5 μl

a. 体系中已含有终浓度为2 mM的Mg^{2+}，对于大多数由本酶催化的PCR反应来说是最优浓度；如有需要，可用25 mM $MgCl_2$以0.2-0.5 mM为间隔向上摸索Mg^{2+}最佳使用浓度。

b. 推荐仅当扩增片段GC含量> 60%且优化条件也无法正常扩增时使用；可能会使保真度有轻微降低。

c. 不同模板最佳反应浓度有所不同，下表为50 μl反应体系推荐模板使用量：

人基因组DNA	10～200 ng
大肠杆菌基因组DNA	1～100 ng
λ DNA	0.1～10 ng
质粒DNA	0.1～10 ng

d. 酶量可在0.25-1 μl之间调整。加大酶量在通常情况下可以提高扩增产量，但有可能会使特异性下降。

2. PCR反应条件设置

目的片段< 5 kb

94℃	5 min（预变性）	
94℃	30 sec	30-35 cycles
55℃*	30 sec	
72℃	30 sec/kb	
72℃	7 min（彻底延伸）	

* 退火温度需要根据引物退火温度调整，一般设置成低于引物退火温度1-2℃即可。

目的片段> 5 kb

94℃	1-3 min (预变性)	
94℃	10 sec	30-35 cycles
68℃*	30-60 sec/kb	
68℃	7 min (彻底延伸)	

* 对于> 5 kb的片段，推荐使用长引物，Tm值在68-70℃，把退火/延伸温度合并为68℃。这样可以显著提高扩增特异性。延长延伸时间有助于提高扩增产量。

引物设计注意事项

1.引物3'端最后一个碱基选择C或G；

2.引物3'端最后8个碱基应避免出现连续错配；

3.引物3'端尽量避免出现发夹结构；

4.引物Tm值一般控制在55℃-65℃之间，扩增长片段用引物建议Tm值控制在68-70℃；

5.引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物Tm值计算；

6.引物GC含量控制在40%-60%之间；

7.正向引物和反向引物Tm值以及GC含量尽可能一致。