

特点:

Tiosbio® Marathon DNA Polymerase为带有校读功能的DNA 聚合酶, 具备超高保真度和扩增效率, 优秀的延伸性, 同时结合热启动技术, 可最大限度地提高 PCR 扩增的成功率, 是完成高GC含量序列扩增, 序列突变, 及其它需要极佳序列准确度实验的理想选择。

Tiosbio® Marathon DNA Polymerase可耐受血液样本对PCR的抑制作用, 能够直接从血液样本中扩增目的序列; 动、植物组织样本也只需使用本公司相应的动物组织裂解液 (BT0311)、植物组织裂解液 (BT0312) 对样本进行简单处理, 即可使用裂解液做为PCR扩增的模板, 避免进行繁复的DNA提取步骤。使用时只需加入模板、引物和灭菌水即可进行 PCR 扩增, 大大简化了试验操作, 提高了试验效率。

包装量及储存条件:

BT0016包装量为50次份 (50 μ L/次), 各组分均保存于-20 $^{\circ}$ C, 其中:

名称	BT0016
Marathon DNA Polymerase (1.0U/ μ L)	50 μ L
2 \times Marathon PCR Buffer*	1.275mL
2.5mM dNTP	0.5mL

*2 \times Marathon PCR Buffer 保存于-20 $^{\circ}$ C时为液体状为态 (不会冻结), 保存温度低于-20 $^{\circ}$ C可能会冻结, 需完全融解并充分混匀后使用, 冻融过程不影响品质, 请放心使用。

使用方法:

- 1、反应液配制前, 充分混匀除 Marathon DNA Polymerase 以外的各组份。冻结的试剂应完全解冻后方可使用。
- 2、按下表配制反应体系, 并混合均匀 (目的片段 \leq 5kb)。

名称	体积
Tiosbio® 2 \times Marathon PCR Buffer	25 μ L
Marathon DNA Polymerase (1.0U/ μ L) *	1 μ L
上游引物 (10 μ M)	1.5 μ L
下游引物 (10 μ M)	1.5 μ L
2.5mM dNTPs	10 μ L
模板 DNA*	\geq 1 μ l
H ₂ O	up to 50 μ L

*注:

- ①配制预混液时, 最后添加 Marathon DNA Polymerase。预混液经漩涡混匀, 瞬时离心后, 再行进 PCR;
- ②50 μ L 反应体系模板 DNA 的用量分别为 Genomic DNA 10~200ng, Plasmid DNA 1~5ng, 第一链 cDNA 转录物 50~200ng (对应总 RNA 量)。

- 3、PCR 反应程序的设置: 物种、目的基因及扩增引物均会对 PCR 反应条件造成影响, 每个反应的具体运行程序根据试验情况进行调整。

一般情况下, 请按照两步法进行扩增, 如两步法无法获得扩增产物, 或引物的 T_m 值 \leq 72 $^{\circ}$ C时, 请使用三步法。此外, 扩增 10kb 以上的长片段出现杂带或弥散时, 请尝试 Step down PCR。

	循环数	温度	时间
两步法	1st Cycle	94 $^{\circ}$ C	2min
	25~40 Cycles	98 $^{\circ}$ C	10sec
		68 $^{\circ}$ C	1kb/min*
	Last Cycle	72 $^{\circ}$ C	5min

	Hold	4°C	Forever
三步法	1st Cycle	94°C	2min
	25~40 Cycles	98°C	10sec
		(Tm-5) °C	30sec
		68°C	1kb/min*
	Last Cycle	72°C	5min
	Hold	4°C	Forever
Step down	1st Cycle	94°C	2min
	5 Cycles	98°C	10sec
		74°C	1kb/min*
	5 Cycles	98°C	10sec
		72°C	1kb/min*
	5 Cycles	98°C	10sec
		70°C	1kb/min*
	15 ~25 Cycles	98°C	10sec
		68°C	1kb/min*
	Last Cycle	72°C	5min
		Hold	4°C

*延伸时间需根据产物长度进行调整，Marathon DNA Polymerase 的延伸速度约为 1kb/min。按照 30sec/kb 设定在一般情况下也可以进行扩增，但是扩增产物得率可能会降低；Marathon DNA Polymerase 扩增效率很高，25~30 个循环靶序列即可得到充分扩增。如果扩增模板靶序列拷贝数较低，或扩增产物长度超过 10kb，请尝试 30~40 个循环，以获得更好的试验结果。

4、电泳

- (1) 使用 1%~2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，上样量以 5~10 μ L 为宜；
- (2) 琼脂糖凝胶制作过程需加入 GelRed[®]、GelGreen[®]、EB、SYBR Green I 等荧光染料，或者待电泳结束后进行泡染，并观察条带。

5、注意事项

(1) 为保证 PCR 的顺利进行：

- 1) PCR 扩增时使用薄壁 PCR 管，推荐反应体积为 50 μ L。
- 2) 灭菌水、引物请事先分装成小份保存，尽可能避免污染。
- 3) 引物长度一般为 22~35nt (Tm 值>60°C)，无二级结构，并避免形成引物二聚体。
- 4) 长片段扩增时，长度应在 25~35nt，Tm 值>65°C，且 3'端尽量避免高 GC 含量序列。
- 5) 模板 DNA 的长度与纯度对 PCR 的结果有很大的影响。模板量充裕的情况下，建议事先进行模板的琼脂糖凝胶电泳，以确认模板的品质。

(2) PCR 扩增产物的克隆

- 1) Marathon DNA Polymerase 的扩增产物为平末端，该扩增产物经多功能 DNA 纯化回收试剂盒 (BT0091) 纯化后，可使用本公司的 Tiosbio[®] Blunt Zero Vector (TD0201) 进行产物的克隆。或是使用 5'端磷酸化的引物进行扩增，或将 PCR 扩增产物的末端磷酸化后，方能进行平末端的克隆。
- 2) Marathon DNA Polymerase 具有 3'→5' 的外切酶活性，如需对 PCR 产物进行限制性内切酶的处理，再利用酶切后的突出末端进行克隆时，需要在酶切处理前先对扩增产物进行纯化。PCR 扩增产物经苯酚/氯仿处理后，进行乙醇沉淀，或使用本公司生产的多功能 DNA 纯化回收试剂盒 (BT0091) 回收 PCR 扩增产物。