

Version 2

Code No. AG11307

2X Pro Taq HS PCR 预混液 Ver. 2

2X Pro Taq HS PCR Master Mix Ver. 2

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

➤ 产品概述

本产品为即用型 *Pro Taq* HS enzyme PCR 反应 2 倍浓度的预混液。进行 PCR 反应时，只需向预混液中加入模板、引物与水即可进行扩增。这种预混液方案操作简便，可最大限度地减少人为误差，减少多步操作带来的污染，在较短时间内即可获得检测结果。其中的 *Pro Taq* HS enzyme 是利用本公司性能优越的 *Accurate Taq* enzyme 中添加高保真酶，使其具有部分 3' → 5' Exonuclease 活性（Proofreading 活性），非常适合 10 kb 以上 DNA 片段的扩增，并且具有较好的保真性能。同时在酶体系中还混合了 Taq 酶单克隆抗体，可以进行 Hot Start PCR。反应开始前抗体会与 Taq 酶结合并抑制其活性，从而可以抑制低温条件下引物非特异性退火或者引物二聚体引起的非特异性扩增。当 PCR 反应开始后，抗体在最初的 DNA 变性步骤中失活，因此在常规 PCR 反应条件下即可使用。使用本产品得到的大部分 PCR 产物 3' 端带有一个 A 碱基，可直接克隆于 T 载体。

➤ 产品组成

组分名称	AG11307 (120 rxns / 50 μl)
2X <i>Pro Taq</i> HS PCR Master Mix Ver. 2	1 ml X 3 pcs

➤ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

运输温度：干冰运输或者-20℃冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本产品为 2X 的预混液，只需向预混液中加入模板、引物与水即可进行扩增，操作简便，可最大限度的减少人为误差，避免多步操作带来的污染，在较短时间内即可获得检测结果。
2. 2X *Pro Taq* HS PCR Master Mix Ver. 2 热稳定性较好，以 λ DNA 为模板可扩增 ~ 40 kb 的 DNA 片段，以 Human 基因组 DNA 为模板可扩增 ~ 17.5 kb 的 DNA 片段。
3. 本产品中添加了能够抑制 DNA polymerase 活性的单克隆抗体，可以进行热启动反应。在进行 PCR 反应前，抗体与酶结合抑制 DNA 聚合酶的活性，有效抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。

➤ 实验原理

PCR 扩增原理

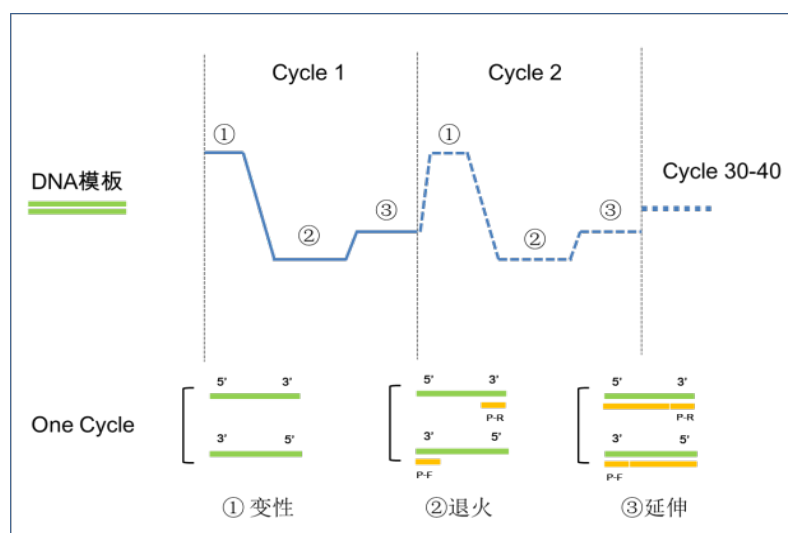
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

扩增详情如下，一般将步骤①②③称为一个循环，每次进行 DNA 扩增时以此循环 30-40 次。进行 PCR 扩增时，可根据引物的不同调整退火温度，进而获得最优 PCR 扩增反应条件。

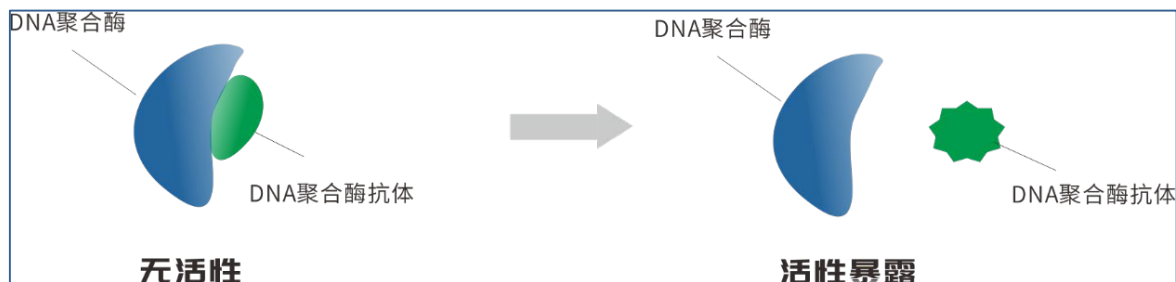
步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

步骤②：引物与单链 DNA 进行退火；

步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下进行延伸，与单链 DNA 形成互补链。



Hot Start PCR 是一种特异性较高的 PCR 扩增方法。相较于普通 PCR，添加了能够抑制 DNA 聚合酶活性的单克隆抗体，抗体在高温加热前与 DNA 聚合酶特异性结合，抑制 DNA 聚合酶的活性，从而可以有效抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。在反应开始时，抗体会在最初的 DNA 变性步骤中失活；DNA 聚合酶活性恢复，进行正常的 PCR 反应。



➤ 使用注意事项

1. 2X *Pro Taq* HS PCR Master Mix Ver. 2 需要溶液融化后离心，将所有的溶液收集至离心管底部，然后再进行使用，减少损失；使用时应轻柔混匀（避免起泡），缓慢吸取。
2. 避免反复冻融，以免降低酶活性。

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材：
Primer、DNA 模板、PCR 管、枪头、冰浴或冰盒。
2. 仪器：
PCR 仪、移液器、旋涡振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪。

➤ 操作方法

1. 配制 PCR 反应液

- 1) 首先按照下表所示在冰上配制 PCR 反应液。
- 2) 将配制好的溶液轻轻的涡旋振荡混匀。

组分名称	反应终浓度	50 μ l 体系
2X <i>Pro Taq</i> HS PCR Master Mix Ver.2	1X	25 μ l
Template ^{*1}	≤ 500 ng	–
Primer F (10 μ M) ^{*2}	0.2 μ M	1 μ l
Primer R (10 μ M) ^{*2}	0.2 μ M	1 μ l
RNase free water	–	Up to 50 μ l

*1: 模板用量一般小于等于 500 ng；可根据实际需要调整模板用量；

*2: 引物通常使用终浓度为 0.2 μ M；同时，可根据实际需要 0.2 ~ 1.0 μ M 范围内调整。

2. 反应条件（以三步法 PCR 扩增 1 kb DNA 片段为例^{*5}）

溶液混匀之后，将 Tube 放置于 PCR 仪中，然后按照下表条件进行 PCR 反应。

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	30 sec ^{*1}	1
变性	98°C	10 sec ^{*2}	} 25–35
退火	55°C	30 sec ^{*3}	
延伸	72°C	1 min / kb ^{*4}	
最终延伸	72°C	2 min	1

- *1: 一般建议将预变性设置为 94°C 30 sec~1 min; 对于复杂模板, 如高 GC 或者长片段, 可尝试延长预变性时间。
- *2: 变性条件的设定可根据设备进行调整, 一般 98°C 5~10 sec 或 94°C 30 sec。
- *3: 退火温度主要取决于上下游引物的 T_m 值, 通常可按照 T_m ± 5°C 设定。
- *4: 延伸温度一般设定为 72°C, 延伸速度 1 min / kb; 同时, 可在 30 sec / kb ~1 min / kb 范围内进行调整。
- *5: 可根据具体实验情况选择两步法进行 PCR 扩增 (两步法 PCR 反应程序可参考附录)。

3. 结果检测

反应结束后, 取适量反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

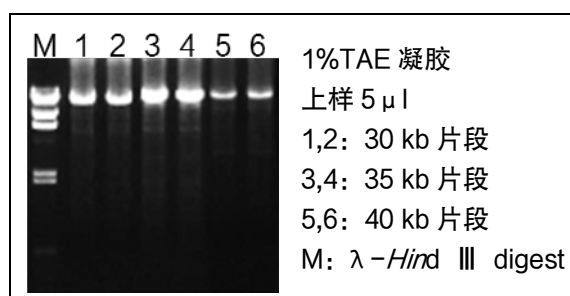
➤ 实验例

1. 以 λ DNA 为模板, 能很好地扩增出 40 kb 的 DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	5 sec	} 30
68°C	15 min	
72°C	10 min	1

电泳结果如下图所示:

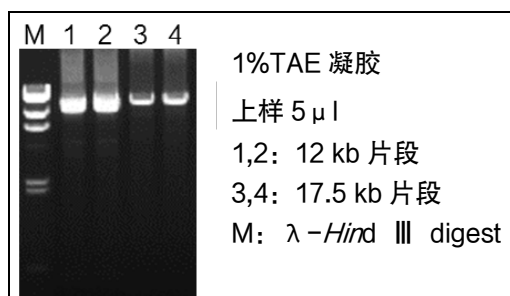


2. 以 Human gDNA 为模板, 能很好地扩增出 17.5 kb 的 DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	10 sec	} 30
68°C	1 min / kb	
72°C	10 min	1

电泳结果如下图所示：



3. 以猪血的 gDNA 为模板，扩增 10 kb、15 kb 的 DNA 片段，能够扩增出目的片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	10 sec	} 30
68°C	1 min / kb	
72°C	10 min	1

电泳结果如下图所示：

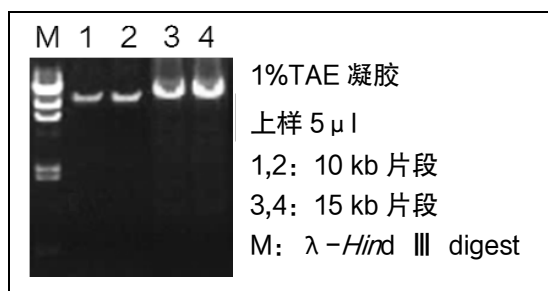


4. 以水稻的 gDNA 为模板，扩增 10 kb、15 kb 的 DNA 片段，能很好地扩增出目的片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	10 sec	} 30
68°C	1 min / kb	
72°C	10 min	1

电泳结果如下图所示：

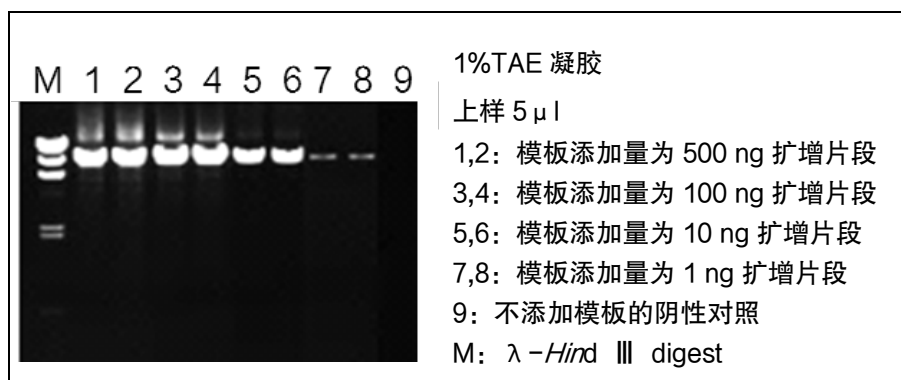


5. 以 Human gDNA 为模板，添加不同模板量 (500 ng、100 ng、10 ng、1 ng) ，扩增 10 kb DNA 片段，模板量低至 1 ng 时，可扩增出目的片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	10 sec	} 30
68°C	1 min / kb	
72°C	10 min	1

电泳结果如下图：



➤ 产品注意事项

1. 合适的模板

- ❖ 模板加入量降低时，扩增效率降低，产物量减少，扩增特异性升高；模板加入量升高时，扩增效率升高，扩增特异性降低；可根据实际情况调整模板加入量。
- ❖ 模板的纯度及完整性严重影响 PCR 反应，采用高质量高纯度的 DNA 模板，可提高 PCR 反应的成功率，降低外源污染。模板不纯、降解或模板中含有抑制 PCR 反应的物质等，都可能会导致 PCR 反应扩增效率较低，PCR 反应产物产量少。建议更换模板，重新实验。

2. 合适的引物

- ❖ 引物一般是 15-30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40-60%之间。
- ❖ 建议正反向引物 T_m 值在 50-70℃，两引物 T_m 值相差不超过 5℃。
- ❖ 引物 A、T、C、G 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
- ❖ 引物 3' 端避免出现发夹结构。减少正反向引物之间的互补序列，最好不要超过 4 个连续互补序列。
- ❖ 合适的引物浓度为 0.2~1.0 μM。引物浓度降低时，扩增效率降低，反应特异性升高。引物浓度升高时，扩增效率升高，反应特异性降低。

3. 合适的变性温度及时间

- ❖ 一般建议将预变性设置为 94℃ 30 sec~1 min；对于复杂模板，如高 GC 或者长片段，可尝试延长预变性时间，但时间过长，可能会影响 DNA 聚合酶活性。
- ❖ 变性时间过长或温度过高，可能导致非特异性扩增、DNA 聚合酶活性降低等问题发生；变性时间过短或温度过低，可能导致扩增效率低，电泳条带弥散。

4. 合适的退火温度及时间

- ❖ 退火温度越高，扩增特异性越高，但一定程度上扩增效率会降低。
- ❖ 退火温度过低，可能导致反应特异性不好，并且可能出现引物二聚体。可适当提高退火温度。

5. 扩增循环数

- ❖ 扩增循环数取决于模板的初始拷贝数。如果模板的初始拷贝数少于 10 个，则需要大约 40 个循环。对于初始拷贝数较高的模板，一般推荐 25-35 个循环。

6. 防止污染措施

- ❖ 配制反应液与添加 DNA 模板的区域最好分开，避免交叉污染。
- ❖ 每次实验设置不添加模板的阴性对照，以检查是否存在污染。

➤ 附录：两步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94℃	30 sec	1
变性	98℃	10 sec	} 30-35
延伸	68℃	1 min / kb	
最终延伸	72℃	2 min	1