

Version 1

Code No. AG11212

Accurate Taq HS DNA 聚合酶 (无 5'→3' 外切酶活性)

Accurate Taq HS DNA Polymerase (5'→3' exo-)

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

Accurate Taq HS DNA 聚合酶(无 5'→3' 外切酶活性)是基于 *Taq* DNA Polymerase 改造的 DNA 聚合酶, 缺乏野生型 *Taq* 的 5' →3' 核酸外切酶活性, 搭配优化后的反应 buffer, 扩增性能强, 对于高 GC 含量、高 AT 含量及低起始量的模板都能进行有效的扩增。此外, 本产品中还添加了在常温状态下能够抑制 DNA Polymerase 活性的单克隆抗体, 可以进行 Hot Start PCR, 有效抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。

➤ 产品组成

组分名称	AG11212 (100rxns / 50 μl)
<i>Accurate Taq</i> HS DNA Polymerase (5'→3' exo-)	100 μl
10X <i>Taq</i> PCR Buffer*1	600 μl
dNTP Mix (10 mM each)	100 μl

*1: 10X *Taq* PCR Buffer 中含有 Mg²⁺。

➤ 保存及运输

保存温度: -20℃保存

运输温度: -20℃冰袋运输或干冰运输

➤ 活性定义

在 74℃、30 分钟内, 以活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物, 将 10 nmol 脱氧核苷酸摄入到酸不溶物质所需的酶活性定义为 1 个活性单位 (U)。

➤ 产品优势

1. 本产品聚合酶缺乏 5' →3' 核酸外切酶活性, 具有高灵敏度, 高扩增效率和高特异性等特点。
2. 本产品中添加了能够抑制聚合酶活性的单克隆抗体, 可进行热启动反应, 能有效抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。
3. 本产品适用于多种模板: 以 λ DNA 为模板可扩增 ~ 10 kb 的 DNA 片段, 以 Human gDNA 为模板可扩增 ~ 4kb 的 DNA 片段。
4. 本产品反应体系经优化, 对于高 GC 含量、高 AT 含量及低起始量的模板都能进行有效的扩增。
5. 本产品可用于多重 PCR。
6. 本产品适用于 SNP 基因分型相关实验。

➤ 实验原理

PCR 扩增原理

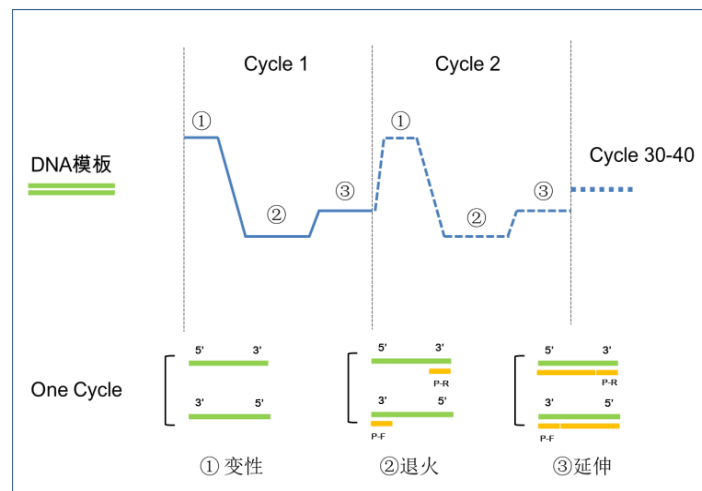
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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 退火；

步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下延伸，与单链 DNA 形成互补链。



➤ 使用注意事项

1. 产品中 *Accurate Taq* HS DNA Polymerase(5'→3' exo-)的甘油浓度较高，使用前短暂离心，将所有的溶液收集至离心管底部，减少损失，并用移液枪轻轻吸打混匀，过程中尽量避免起泡，然后再进行使用。
2. 本产品各组分均需要在-20℃保存，使用前于冰上溶解后，轻柔混匀后再进行使用。
3. 反应体系需要在冰上配制，配制完后立即放进 PCR 仪中进行反应。

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材：

Primer、DNA 模板、PCR 管、枪头、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

按照下表在冰上配制 PCR 反应液

组分名称	反应终浓度	50 μ l 体系
<i>Accurate Taq</i> HS DNA Polymerase (5'→3' exo-)	-	1 μ l ^{*1}
10X <i>Taq</i> PCR Buffer	1 X	5 μ l
dNTP Mix (10 mM each)	0.2 mM	1 μ l
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
Template ^{*3}	< 1 μ g	-
RNase free water	-	Up to 50 μ l

*1: 通常情况下, *Accurate Taq* HS DNA Polymerase (5'→3' exo-)的加入量为 1 μ l, 如扩增结果不理想可尝试提升酶量, 在 1 μ l ~ 2 μ l 范围内进行调整。

*2: 通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好的结果, 也可根据具体实验情况在 0.1 ~ 0.4 μ M 范围内调整。

*3: 通常情况下, 建议模板添加量不超过 1 μ g; 若扩增效果不好, 可尝试延长 PCR 反应延伸时间。

2. 反应条件 (以两步法 PCR 扩增为例^{*3}):

将含有反应液的 PCR 管放置于 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 ^{*1}	95°C	1 min	1
变性	95°C	30 sec	} 30-35
退火和延伸	68°C	1min / kb ^{*2}	
最终延伸	68°C	10min	1

*1: 预变性条件为 95°C 1min 可获得比较好的结果, 对于特别复杂的模板, 如扩增结果不理想, 可根据实际需求在 1-5 min 范围内调整预变性时间。

*2: 若片段过长、模板复杂或模板量过多导致的扩增效果不好, 可尝试将延伸时间延长。

*3: 当两步法 PCR 扩增结果不好, 也可尝试三步法 PCR 扩增 (三步法程序可参考附录)。

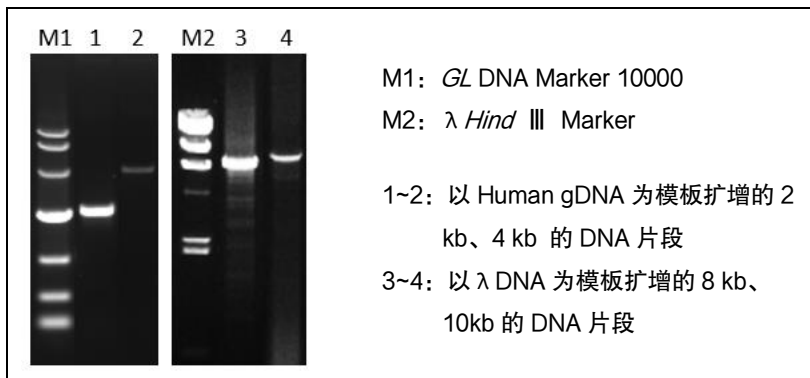
3. 结果检测

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

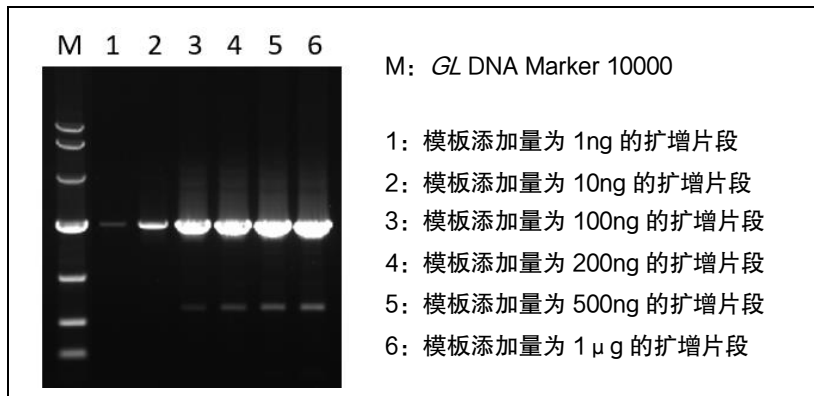
1. 采用本产品扩增不同长度的 DNA 片段，以 Human gDNA 为模板，可扩增出 4kb 的 DNA 片段；以 λ DNA 为模板，可扩增出 10 kb 的 DNA 片段。

电泳结果如下图所示：



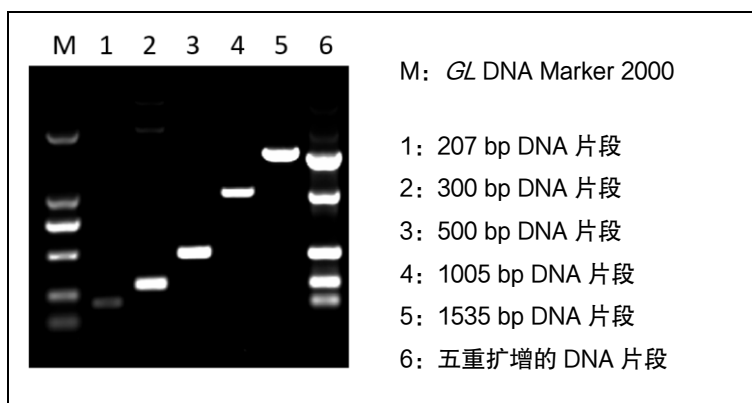
2. 以 Human gDNA 为模板，添加不同模板量（1 ng、10 ng、100 ng、200 ng、500 ng、1 μg），采用本产品扩增 2 kb 的 DNA 片段，模板量低至 1ng 时仍能扩增出目的条带。

电泳结果如下图所示：



3. 以 Human gDNA 为模板，采用本产品扩增 207 bp – 1535 bp 的 DNA 片段，可成功扩增五重片段。

电泳结果如下图所示：



➤ 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，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。模板降解或模板中含有抑制 PCR 反应的物质等，都可能会导致 PCR 反应扩增效率降低，PCR 反应产物产量减少。采用高质量高纯度的 DNA 模板，可降低外源污染，提高 PCR 反应的成功率。

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°C，两引物 T_m 值相差不超过 5°C，较高的引物 T_m 值可在两步法程序中获得较优的结果。
- ❖ 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 0.1 ~ 0.4 μ M。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. 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 30-35 个循环。

4. 防污染措施

- ❖ 配制反应液与添加 DNA 模板的区域最好分开，避免交叉污染。
- ❖ 小心轻柔地打开和关闭样管盖，避免样品飞溅或喷洒。若样品飞溅至手套，建议更换手套；若喷洒至桌面，立即水或 70% 的酒精擦拭。
- ❖ 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：三步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	1 min	1
变性	95°C	30 sec	} 30-35
退火	60°C	30 sec	
延伸	68°C	1 min / kb	
最终延伸	68°C	10 min	1