

Version 1

Cat No. AG11303
AG11305
AG11306

Pro Taq HS DNA 聚合酶 Ver. 2

Pro Taq HS DNA Polymerase 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

Pro Taq HS DNA Polymerase 是应用 LA PCR 原理, 在本公司性能优越的 *Accurate Taq* enzyme 中添加了高保真酶, 使其具有 3' → 5' Exonuclease 活性 (Proof reading 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, 抗体会在最初的 DNA 变性步骤中失活, 因此在常规 PCR 反应条件下即可使用。使用本制品扩增得到的大部分 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	AG11303 【250U (200 rxns)】	AG11305 【250U (200 rxns)】	AG11306 【250U (200 rxns)】
<i>Pro Taq</i> HS DNA Polymerase (5U/μl)	50 μl	50 μl	50 μl
10X <i>Pro Taq</i> PCR Buffer Ver.2 (Mg ²⁺ plus)	1 ml	1 ml	-
dNTP Mix (10 mM each)	200 μl	-	-
10X <i>Pro Taq</i> PCR Buffer Ver.2 (Mg ²⁺ free)	-	-	1 ml
MgCl ₂ Solution (50 mM)	-	-	500 μl

➤ 保存

保存温度: -20°C

运输温度: 干冰或者-20°C冰袋运输

➤ 活性定义

在 74°C、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. 本品中添加了高保真酶, 相对于 *Accurate Taq* 具有更高的保真性。在普通的 PCR 扩增条件下, 具有扩增效率高、错配率低的特点。
2. 本品中添加了能够抑制 Taq 酶活性的单克隆抗体, 可以进行热启动反应。在进行 PCR 反应前, 抗体与酶结合抑制 Taq 酶的活性, 有效抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。

3. 本产品以 λ DNA 为模板可扩增 ~ 40 kb 的 DNA 片段,以 Human gDNA 为模板可扩增 ~20 kb 的 DNA 片段。

➤ 实验原理

PCR 扩增原理

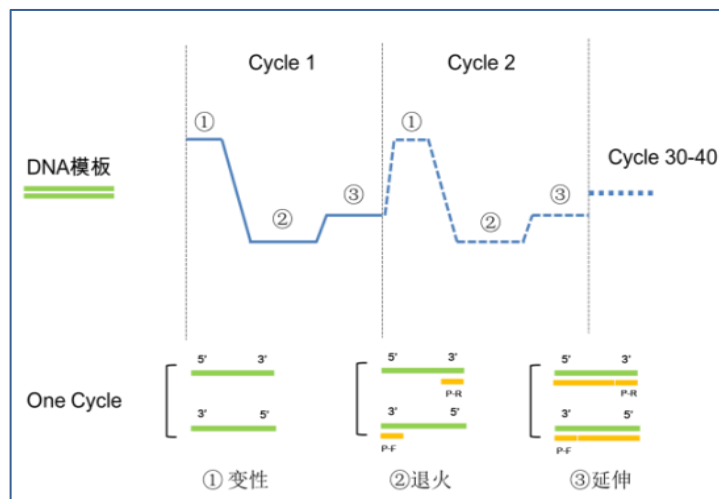
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术,在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下,依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环,使得 DNA 片段在数量上呈指数增加,在短时间内获得大量目的基因片段。

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。

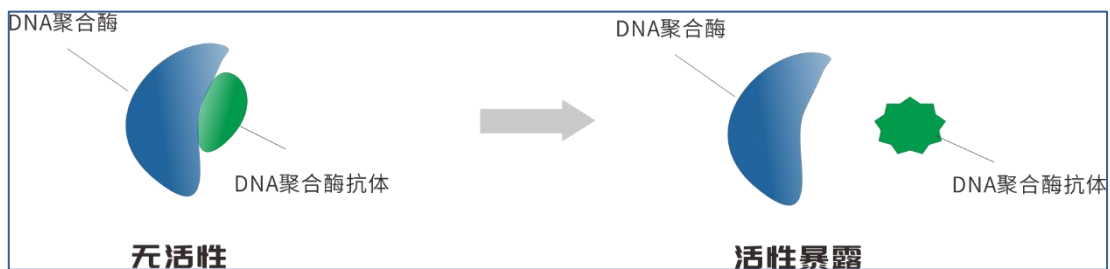
步骤①: DNA 进行高温变性, DNA 双螺旋结构解链;

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. 产品中 *Pro Taq* HS DNA Polymerase 使用前先离心，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. 试剂盒中的各组分均需要在-20℃保存，使用前于冰上溶解后，轻柔混匀后再进行使用。

➤ 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（表 1 与表 2）所示配制 PCR 反应液。
- 2) 将配制好的溶液轻轻的涡旋振荡混匀。

表 1 AG11303 与 AG11305 产品反应液配制

组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
<i>Pro Taq</i> HS DNA Polymerase (5U/μl)	1.25 U ¹	0.25 μl
10X <i>Pro Taq</i> PCR Buffer Ver.2 (Mg ²⁺ plus)	1 X	5 μl
dNTP Mix (10 mM each)	0.2 mM	1 μl
Template	< 500 ng ²	-
Primer F (10 μM) ³	0.2 μM	1 μl
Primer R (10 μM) ³	0.2 μM	1 μl
RNase free water	-	Up to 50 μl

表 2 AG11306 产品反应液配制

组分名称	反应终浓度	50 μ l 体系
<i>Pro Taq</i> HS DNA Polymerase (5U/ μ l)	1.25 U ^{*1}	0.25 μ l
10X <i>Pro Taq</i> PCR Buffer Ver.2 (Mg ²⁺ free)	1 X	5 μ l
MgCl ₂ Solution (50 mM)	2.0 mM	2 μ l
dNTP Mix (10 mM each)	0.2 mM	1 μ l
Template	< 500 ng ^{*2}	-
Primer F (10 μ M) ^{*3}	0.2 μ M	1 μ l
Primer R (10 μ M) ^{*3}	0.2 μ M	1 μ l
RNase free water	-	Up to 50 μ l

*1: 本说明书推荐的酶量经过优化, 适用于大多数的 PCR 反应; 同时, 可根据实际情况进行调整;

*2: 模板用量一般 < 500 ng; 同时, 可根据实际需要调整模板用量;

*3: 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 (以三步法扩增 1 kb DNA 片段为例^{*5})

将加好样的 Tube 放置于 PCR 仪中, 然后按照下表反应条件进行 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 \pm 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。

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。

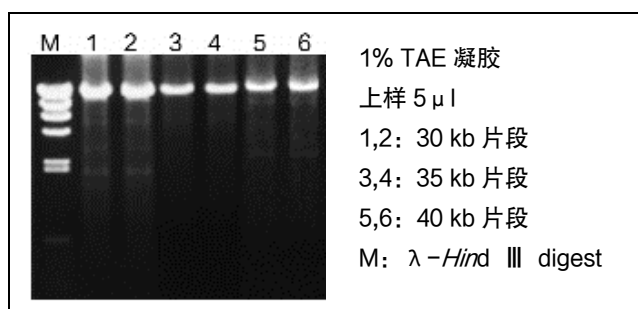
➤ 实验例

1. 以 λ DNA 为模板，能够很好地扩增出长达 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:

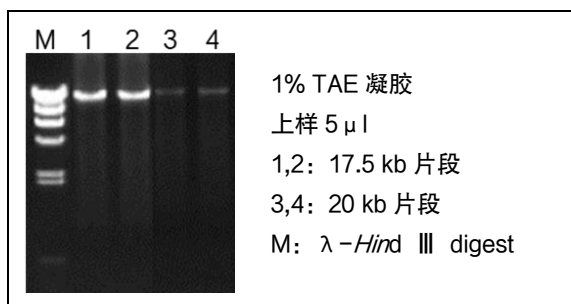


2. 以 Human gDNA 为模板，能够扩增出长达 20 kb 的 DNA 片段。

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 Human Total RNA 反转录获得的 cDNA 为模板，能够扩增出长达 13 kb 的 DNA 片段。

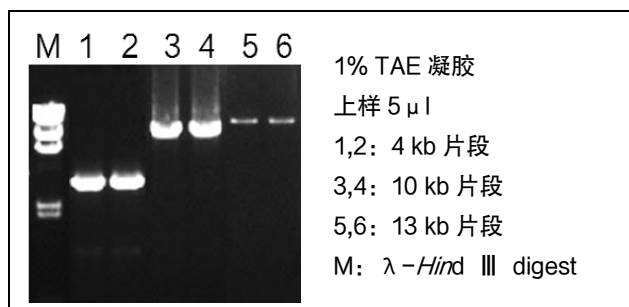
4 kb DNA 片段扩增反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	30 sec	1
98°C	10 sec	} 30
55°C	30 sec	
72°C	1 min / kb	
72°C	2 min	1

10 kb 和 13 kb DNA 片段扩增反应程序:

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:

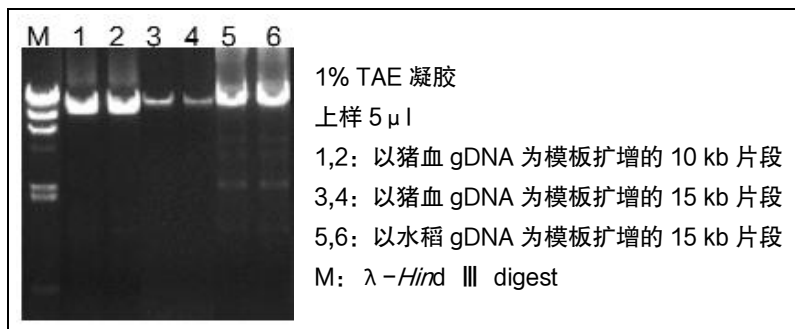


4. 以猪血和水稻的 gDNA 为模板，分别扩增不同长度 DNA 片段。

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:

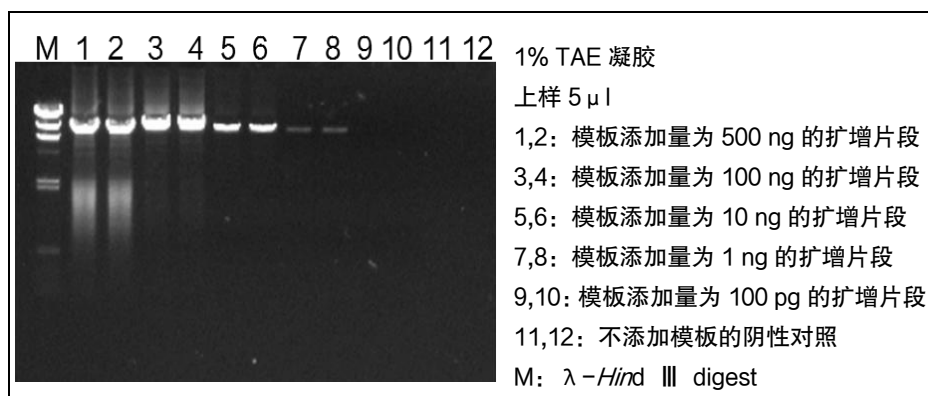


5. 以 Human gDNA 为模板，添加不同模板量（500 ng、100 ng、10 ng、1 ng、100 pg），扩增 10 kb 的 DNA 片段，模板量低至 1 ng 时，能够扩增出目的片段。

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:



➤ 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 反应扩增效率降低，PCR 反应产物产量减少。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°C，两引物 T_m 值相差不超过 5°C。
- ❖ 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 个碱基连续互补序列。
- ❖ 合适的引物浓度为 0.2 ~1.0 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. dNTPs 浓度

- ❖ 本产品的反应体系中，推荐的 dNTPs 终浓度 200 μ M。
- ❖ dNTPs 浓度过高，可能会与 Mg^{2+} 结合，影响 DNA 聚合酶活性；同时，高浓度的 dNTPs 会降低扩增特异性，产生 smear 带。
- ❖ dNTPs 浓度过低，可能会降低扩增效率。

4. Mg^{2+} 浓度

- ❖ 对于 *Pro Taq* DNA polymerase 来说，较理想的 Mg^{2+} 是 2.0 mM；同时，可根据实验具体情况进行调整。
- ❖ Mg^{2+} 浓度过低，会影响 PCR 扩增，导致 PCR 产物产量低；
- ❖ 浓度过高，则可能会降低 PCR 的特异性。

5. 合适的变性温度及时间

- ❖ 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，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。

6. 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，并且可能会出现引物二聚体。

7. 延伸温度及时间

- ❖ *Pro Taq* HS DNA polymerase 的最佳延伸温度是 70-75°C，一般推荐 72°C，延伸速度是 30 sec / kb ~1 min / kb。当扩增结构复杂或长度较长的片段，推荐 1 min / kb。

8. 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。

9. 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。