

Version 1

Cat No. AG11501  
AG11502

# *Exp Taq* HS DNA 聚合酶 Ver.2 (Mg<sup>2+</sup> +、dNTPs+)

# *Exp Taq* HS DNA Polymerase Ver.2 (Mg<sup>2+</sup> and dNTPs plus)

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

本制品是在本公司性能优越的 *Accurate Taq enzyme* 中添加了高保真酶，使其具有部分 3' -5' Exonuclease 活性 (Proof reading 活性)，精心优化得到的 PCR 反应体系，非常适合长片段 DNA 的 PCR 扩增。

同时在 *Exp Taq HS DNA Polymerase* 中还混合了 Taq 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	AG11501 (125U / 50 rxns)	AG11502 (500U / 200 rxns)
<i>Exp Taq HS DNA Polymerase</i> ( 5U/μl )	25 μl	100 μl
5X <i>Exp Taq PCR Buffer Ver.2</i> (Mg <sup>2+</sup> plus)	500 μl	1 ml X 2 pc
dNTP Mix (10 mM each)	100 μl	400 μl

## ➤ 保存

保存温度：-20℃

运输温度：干冰或者-20℃冰袋运输

## ➤ 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. 本制品是精心优化得到的 PCR 反应体系，非常适合长片段和较复杂 DNA 的 PCR 扩增。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 ~20 kb 的 DNA 片段。
2. *Exp Taq HS DNA Polymerase* 中添加了高保真酶，相对于 *Accurate Taq* 具有更高的保真性及更强的扩增能力。在普通的 PCR 扩增条件下，具有扩增效率高、错配率低的特点。

3. *Exp Taq* HS DNA Polymerase 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

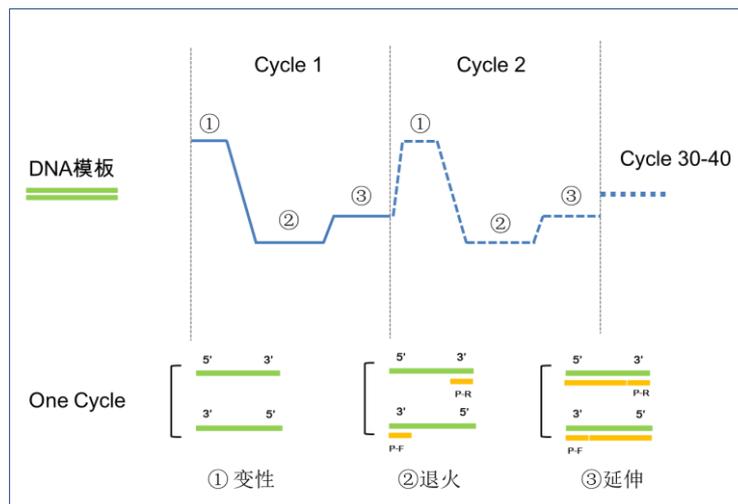
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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。

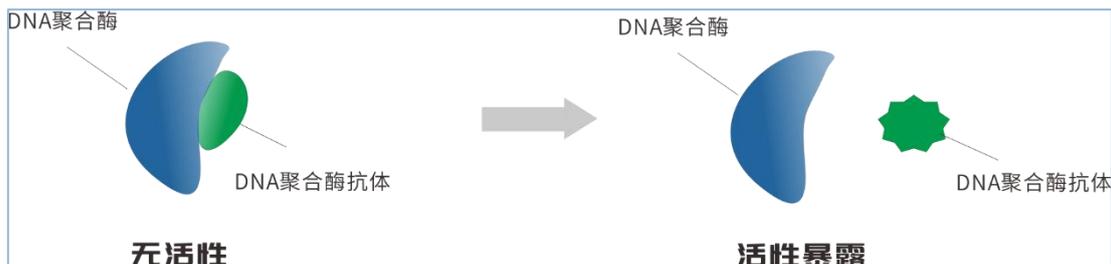
步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

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。相对于普通 PCR 而言，本制品主要是在 *ExpTaq* enzyme 中混入 Taq 单克隆抗体。抗体在高温加热前与 Taq 特异性结合，抑制 Taq 的活性，从而可以抑制低温条件下引物非特异性退火引起的非特异性扩增。



## ➤ 使用注意事项

1. 产品中 *Exp 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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

首先按照下表在冰上配制 PCR 反应液。将配制好的溶液轻柔混匀。

组分名称	反应终浓度	50 $\mu\text{l}$ 体系
<i>Exp Taq</i> HS DNA Polymerase ( 5U/ $\mu\text{l}$ )	2.5 U <sup>*1</sup>	0.5 $\mu\text{l}$
5X <i>Exp Taq</i> PCR Buffer Ver.2 (Mg <sup>2+</sup> plus)	1 X	10 $\mu\text{l}$
dNTP Mix (10 mM each)	0.4 mM	2 $\mu\text{l}$
Template	$\leq 500 \text{ ng}^{\text{*2}}$	-
Primer F	0.2 $\mu\text{M}^{\text{*3}}$	1 $\mu\text{l}$
Primer R	0.2 $\mu\text{M}^{\text{*3}}$	1 $\mu\text{l}$
RNase free water	-	Up to 50 $\mu\text{l}$

\*1: 表中推荐的酶量经过优化, 适用于大多数的 PCR 反应; 可根据实际情况进行调整。

\*2: 模板用量一般  $\leq 500 \text{ ng}$ ; 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  $\mu\text{M}$ ; 可根据实际需要在 0.2 - 1.0  $\mu\text{M}$  范围内调整。

### 2. 反应条件 (以三步法扩增 1 kb DNA 片段为例<sup>\*8</sup>)

将加好样的 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 $^{\circ}\text{C}$	1 min <sup>*4</sup>	1
变性	98 $^{\circ}\text{C}$	10 sec <sup>*5</sup>	} 25~35
退火	55 $^{\circ}\text{C}$	30 sec <sup>*6</sup>	
延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	1 min / kb <sup>*7</sup>	
最终延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	2 min	1

- \*4: 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。
- \*5: 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。
- \*6: 退火温度主要取决于上下游引物的 T<sub>m</sub> 值, 通常可按照 T<sub>m</sub> ± 5°C 设定。
- \*7: 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。
- \*8: 当引物 T<sub>m</sub> 值较高或三步法 PCR 扩增结果不好时, 可尝试两步法 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

- 以 Human gDNA 为模板, 采用本试剂盒扩增不同长度的 DNA 片段, 能很好地扩增出 20 kb 的 DNA 片段。

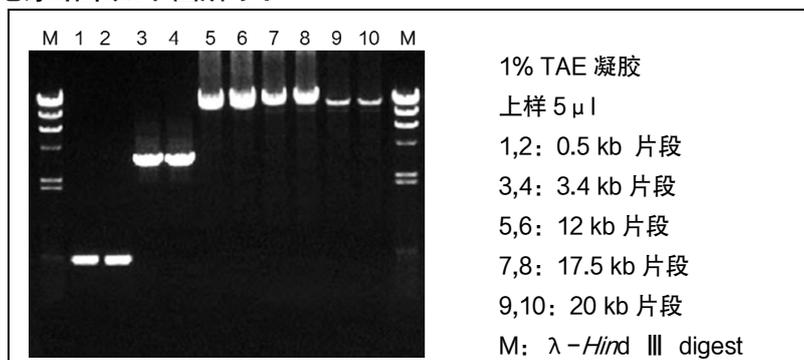
##### 0.5 kb 和 3.4 kb DNA 片段扩增反应程序如下:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	1 min	1
变性	94°C	30 sec	} 30
退火	55°C	30 sec	
延伸	72°C	1 min / kb	
最终延伸	72°C	2 min	1

##### 12 kb、17.5 kb 和 20 kb DNA 片段扩增反应程序如下:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	1 min	1
变性	98°C	20 sec	} 30
延伸	68°C	1 min / kb	
最终延伸	72°C	10 min	

电泳结果如下图所示:



2. 以  $\lambda$  DNA 为模板，采用本试剂盒扩增不同长度的 DNA 片段，能很好地扩增出 40 kb 的 DNA 片段。

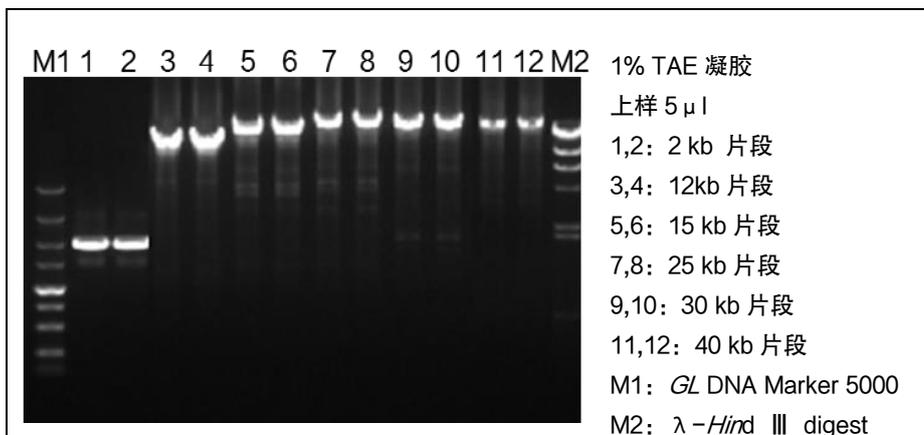
**2 kb 和 12 kb DNA 片段扩增反应程序如下：**

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	1 min	1
变性	94°C	30 sec	} 30
退火	55°C	30 sec	
延伸	72°C	1 min / kb	
最终延伸	72°C	2 min	1

**15 kb、25 kb、30 kb 和 40 kb 扩增反应程序如下：**

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	1 min	1
变性	98°C	5 sec	} 30
延伸	68°C	15 min	
最终延伸	72°C	10 min	

电泳结果如下图所示：

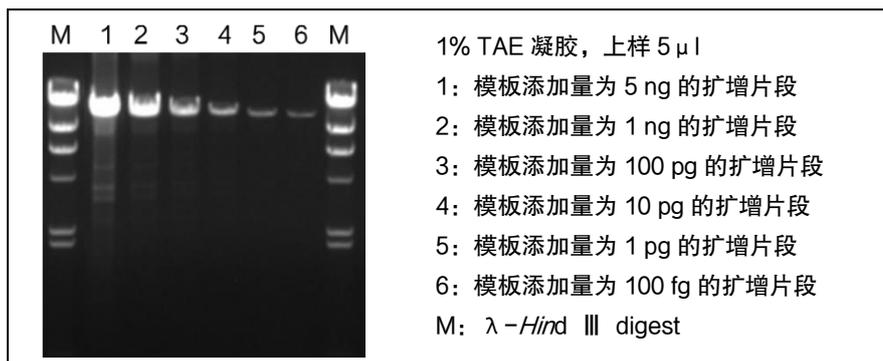


3. 以不同添加量 ( 5 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg ) 的  $\lambda$  DNA 为模板，采用本试剂盒扩增~15 kb 的 DNA 片段，灵敏度可达 100 fg。

**反应程序如下：**

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	1 min	1
变性	98°C	5 sec	} 30
延伸	68°C	15 min	
最终延伸	72°C	10 min	

电泳结果如下：



## ➤ 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

- ❖ 引物浓度降低：可能会导致反应效率降低。可尝试提高 PCR 扩增引物反应浓度。
- ❖ 引物浓度升高：导致反应特异性不好。可适当降低引物浓度。
- ❖ 引物完整性不好：可能会导致无扩增曲线，可通过 PAGE 电泳确认引物的完整性，如引物有降解，建议更换引物。
- ❖ 引物设计的原则：
  - ① 引物一般是 15-30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40 - 60 %之间。
  - ② 建议正反向引物 Tm 值在 50-70 $^{\circ}$ C，两引物 Tm 值相差不超过 5 $^{\circ}$ C。
  - ③ 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
  - ④ 引物 3' 端避免出现发夹结构。
  - ⑤ 减少引物之间的互补序列，一般不要超过 4 个碱基连续互补序列。

### 3. dNTPs 浓度

- ❖ dNTPs 浓度过高，可能会与 Mg<sup>2+</sup> 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. 合适的变性温度及时间

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。

- ❖ 简单模板 PCR, 进行 94°C, 30 sec ~ 1 min 的预变性。
- ❖ 困难模板的 PCR, 如 GC-rich 序列, 建议在 94°C 下进行 2 ~ 4 min 的预变性。
- ❖ 菌落 PCR, 建议在 94°C 下进行 5 min 的预变性。
- ❖ 变性温度一般推荐 98°C, 5~10 sec 或 94°C, 30 sec。

#### 5. 合适的退火温度及时间

- ❖ 退火温度越高, 引物特异性越高, 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, 出现引物二聚体。可适当提高退火温度。

#### 6. 延伸温度及时间

- ❖ *Exp 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。

#### 7. 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。

#### 8. 防止污染措施

- ❖ 配制反应液与添加 DNA 模板的区域建议分开, 避免交叉污染。
- ❖ 每次实验可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

#### 两步法 PCR 程序：

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	1 min	1
变性	98°C	10 sec	} 25~35
延伸	68°C	1 min / kb	
最终延伸	72°C	10 min	1