

Version 1

Cat No. AG11513

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

## *L-Exp Taq* HS DNA Polymerase (Mg<sup>2+</sup> free 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，不仅具有非常强的长片段扩增性能，还兼备扩增复杂模板的能力，以 Human 基因组 DNA 为模板可扩增 ~24 kb 的 DNA 片段，而且，对于难以扩增的较高 GC 含量模板 (~75%)，扩增成功率高。

同时在 *L-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	AG11513 (125U / 50 rxns)
<i>L-Exp Taq</i> HS DNA Polymerase ( 5U/ $\mu$ l )	25 $\mu$ l
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> free)	500 $\mu$ l
dNTP Mix (10 mM each)	100 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> Solution (50 mM)	150 $\mu$ l

## ➤ 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. 本制品精心优化得到的 PCR 反应体系，非常适合长片段和较复杂 DNA 的 PCR 扩增。以  $\lambda$  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 ~24 kb 的 DNA 片段。

2. *L-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. *L-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

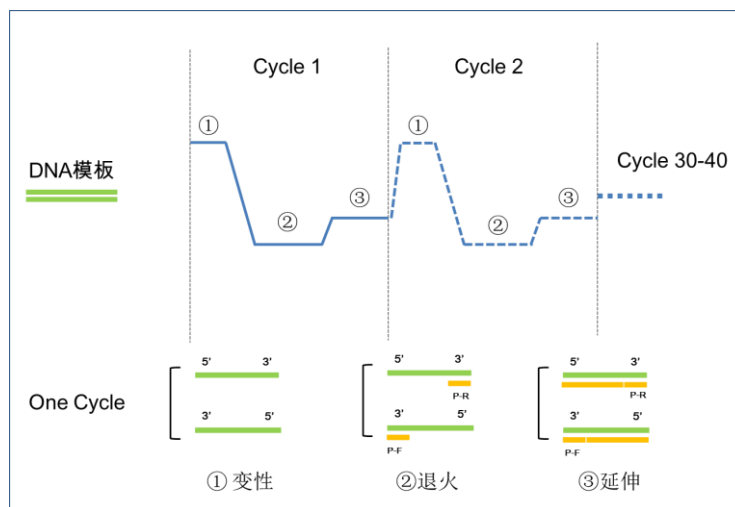
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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。

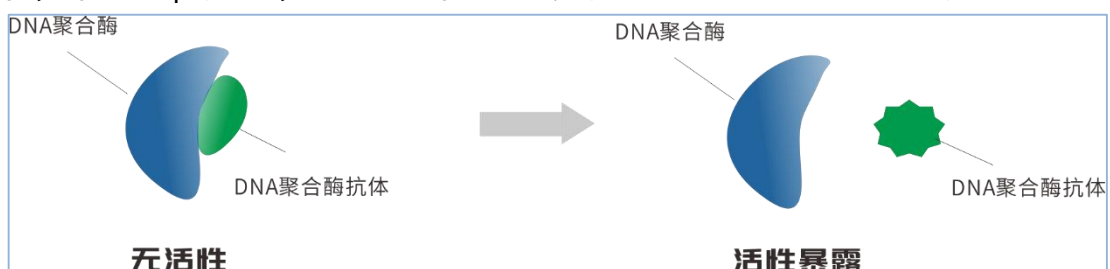
步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

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，本产品主要是在 *L-Exp Taq* DNA Polymerase 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 *L-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，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

首先按照下表所示配制 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>L-Exp Taq</i> DNA Polymerase ( 5U/ $\mu\text{l}$ )	2.5 U <sup>*1</sup>	0.5 $\mu\text{l}$
5X <i>L-Exp Taq</i> PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> free)	1 X	10 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> Solution ( 50 mM )	3.0 mM <sup>*2</sup>	3 $\mu\text{l}$
dNTP Mix (10 mM each)	0.4 mM	2 $\mu\text{l}$
Template	$\leq 500$ ng <sup>*3</sup>	-
Primer F ( 10 $\mu\text{M}$ )	0.2 $\mu\text{M}$ <sup>*4</sup>	1 $\mu\text{l}$
Primer R ( 10 $\mu\text{M}$ )	0.2 $\mu\text{M}$ <sup>*4</sup>	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: Mg<sup>2+</sup> 推荐反应终浓度为 3.0 mM；可根据实际情况进行调整。

\*3: 模板用量一般  $\leq 500$  ng；可根据实际需要调整模板用量。

\*4: 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>9</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>*5</sup>	1
变性	98 $^{\circ}\text{C}$	10 sec <sup>*6</sup>	} 25~35
退火	55 $^{\circ}\text{C}$	30 sec <sup>*7</sup>	
延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	1 min / kb <sup>*8</sup>	
最终延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	2 min	1

- \*5: 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。
- \*6: 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。
- \*7: 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。
- \*8: 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。
- \*9: 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。

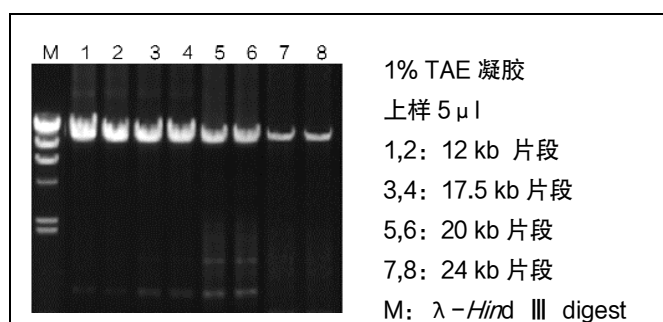
#### ➤ 实验例

- 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 24 kb 的 DNA 片段。

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	1

电泳结果如下图所示:

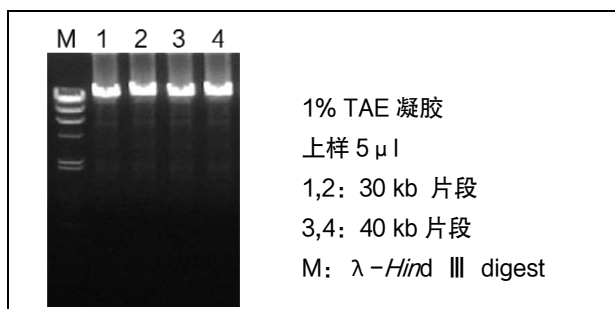


- 以 λ DNA 为模板, 采用本试剂盒扩增不同长度的 DNA 片段, 能很好地扩增出 40 kb 的 DNA 片段。

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	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°C，两引物 Tm 值相差不超过 5°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. Mg<sup>2+</sup> 浓度

- ❖ Mg<sup>2+</sup>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。

### 4. dNTPs 浓度

- ❖ 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。

## 5. 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。

## 6. 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。

## 7. 延伸温度及时间

- ❖ *L-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。

## 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