

Version 1

Code No. CM0269

Accurate Super Taq HS DNA 聚合酶 II

Accurate Super Taq HS DNA Polymerase II

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

本产品中 *Accurate Super Taq* HS DNA Polymerase II 通过基因改造技术使其具有很强的热稳定性，卓越的扩增效率、抗干扰性能、扩增速度、扩增灵敏度和扩增特异性。

本产品中还添加了在常温状态下能够抑制 *Accurate Super Taq* DNA Polymerase II 活性的单克隆抗体，通过对抗体比例进行优化，使得该聚合酶在 55°C 下仍可保持严格的封闭性，能够有效抑制非特异性扩增。当反应在 95°C 保持 30 sec 以上时，单克隆抗体完全失活，该聚合酶活性可被完全释放，使 PCR 体系具有很高的特异性及灵敏度，并提升结果准确性。

本产品中 *Accurate Super Taq* HS DNA Polymerase II 具有 5' → 3' DNA 聚合酶活性和 5' → 3' 外切酶活性，无 3' → 5' 外切酶活性，适合于各种基于 Taq DNA Polymerase 的 PCR 反应及 qPCR 反应；使用本产品得到的 PCR 产物 3' 端带有一个 A 碱基，可直接克隆于 T 载体。

➤ 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量定义为一个活性单位 (U)。

➤ 产品组成

组分名称	体积
<i>Accurate Super Taq</i> HS DNA Polymerase II (30 U/μl)	50 μl
10X Super Taq HS PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)*	1 ml x 3 pcs

*: 10X Super Taq HS PCR Buffer II (Mg²⁺ plus)组成:

100mM Tris-HCl (pH8.9 at 25°C), 750 mM KCl, 30 mM MgCl₂

➤ 保存及运输

保存温度: -20°C 保存

运输温度: 干冰运输或 -20°C 冰袋运输

➤ 产品优势

1. 热稳定性高: 95°C 加热半衰期超过 1 小时。
2. 扩增效率高: 1kb 以内片段延伸时间仅需 1sec, 2kb 以内片段延伸时间可缩短至 1 ~ 5 sec。
3. 抗干扰性能强: 针对不同干扰物质 (血红素、EDTA、异硫氰酸胍、乙醇等), 均有较强的抗抑制能力。

➤ 使用注意事项

1. *Accurate Super Taq* HS DNA Polymerase II 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，并用移液器轻柔吸打混匀（避免起泡），切勿剧烈振荡，避免其失活；使用时建议存放于冰盒内，使用完后建议立即置于-20℃保存。
2. 10X Super Taq HS PCR Buffer II (Mg²⁺ plus) 使用前请于冰上充分融化，短暂离心，将所有的溶液收集至离心管底部，减少损失，并用移液器轻柔吸打混匀，然后再进行使用。
3. 操作时需注意防止实验环境和操作过程中的 DNase 污染。
4. 反应体系需要在冰上配制，最后将配制好的反应液放置于 PCR 仪中反应。

➤ 实验前准备

1. **试剂 & 耗材：**
引物、水（RNase-free）、1.5 ml 离心管（RNase-free）、PCR 管（RNase-free）、枪头（RNase-free）、移液器。
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

组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
<i>Accurate Super Taq</i> HS DNA Polymerase II (30 U/μl)	— ^{*1}	—
10X Super Taq HS PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus) ^{*2}	1 x	5 μl
dNTP Mix (10 mM each)	0.6 mM	3 μl
Template	≤ 500 ng ^{*3}	—
Primer F (10 μM)	0.4 μM ^{*4}	2 μl
Primer R (10 μM)	0.4 μM ^{*4}	2 μl
RNase free water	—	Up to 50 μl

*1: 进行 PCR 实验时，推荐反应终酶量为 2.5 U，可根据实际情况在 2.5 ~ 10 U 范围内进行调整；
进行 qPCR 实验时，推荐反应终酶量为 20 U，可根据实际情况在 5 ~ 30 U 范围内进行调整。

*2: 该 10X Super Taq HS PCR Buffer II (Mg²⁺ plus) 仅适用于 PCR 扩增反应，如需进行定量反应，需要调整 buffer 体系。

*3: 通常情况下，建议模板添加量 ≤ 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 0.4 μM，可根据实验结果在 0.2 ~ 1.0 μM 范围内调整。

2. PCR 反应条件（三步法）^{*1}

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec ^{*2}	1
变性	95°C	15 sec ^{*3}	30 ~ 35
退火	55°C ^{*4}	15 sec ^{*4}	
延伸	72°C	30 sec/kb ^{*5}	
最终延伸	72°C	2 min ^{*6}	1

*1: 建议首先采用三步法 PCR 反应程序，如引物退火温度较高，三步法无法获得较好结果，也可尝试进行两步法 PCR 扩增，详见附录。

*2: 预变性时间通常设定为 30 sec，如果模板变性困难，可以延长预变性时间至 30 sec ~ 3 min。

*3: 变性条件的设定可根据设备进行调整，一般 95°C 15 sec 可以得到较好的结果，但是可根据实际情况在 10 ~ 30 sec 进行调整。

*4: 退火温度主要取决于上下游引物的 T_m 值，通常可按照 $T_m \pm 5^\circ\text{C}$ 设定；退火的时间建议 15 sec，可根据实际情况将时间延长至 30 sec。

*5: 延伸时间建议 30 sec/kb，但是可以根据实际情况缩短或者延长反应时间，对于简单的 2kb 以内的片段可将延伸时间缩短至 1 ~ 10 sec/kb，对于复杂片段可将时间延伸至 30 ~ 60 sec/kb。

*6: 此步骤为最终延伸，如扩增片段较长或者想延伸更彻底，可将时间延长至 5 min。

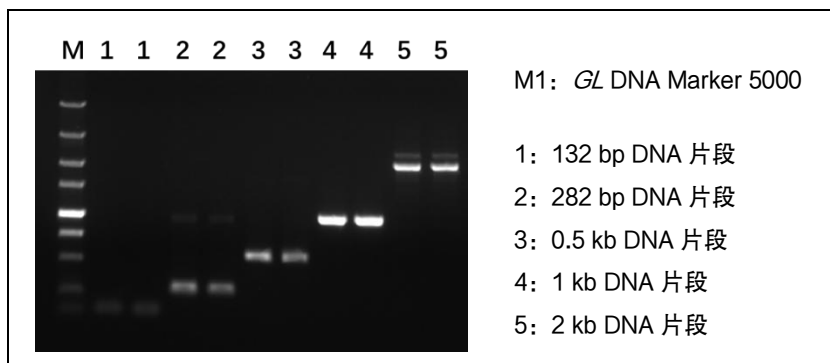
➤ 实验例

1. *Accurate Super Taq* HS DNA Polymerase II 具有较好的扩增速度，以 Human gDNA 为模板，使用本产品扩增不同长度的 DNA 片段，速度最快可达 1sec / kb。

反应程序:

温度	时间	循环数
95°C	1 min	1
95°C	15 sec	30
60°C	15 sec	
72°C	1 sec	
72°C	2 min	1

电泳结果如下图所示:

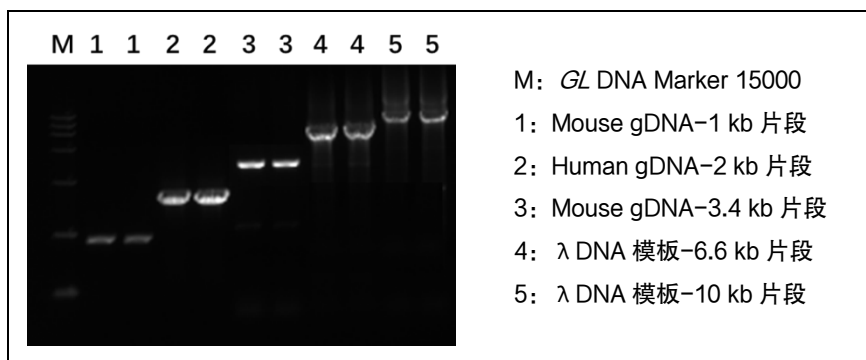


2. 使用 *Accurate Super Taq* HS DNA Polymerase II 扩增不同长度的 DNA 片段，以 gDNA 为模板，可扩增出 ~ 3.4kb 的 DNA 片段；以 λ DNA 为模板，可扩增出 ~ 10 kb 的 DNA 片段。

反应程序:

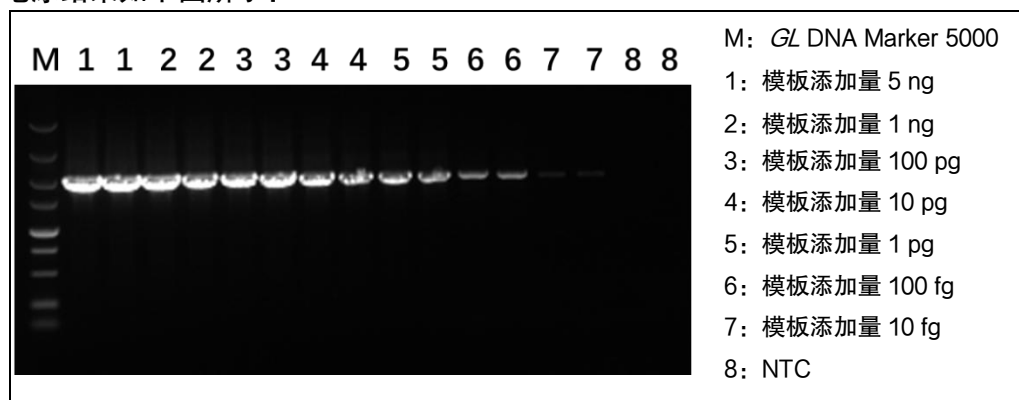
温度	时间	循环数
95°C	1 min	1
95°C	15 sec	} 30
60°C	30 sec	
72°C	30~60 sec/kb	
72°C	5 min	1

电泳结果如下图所示:

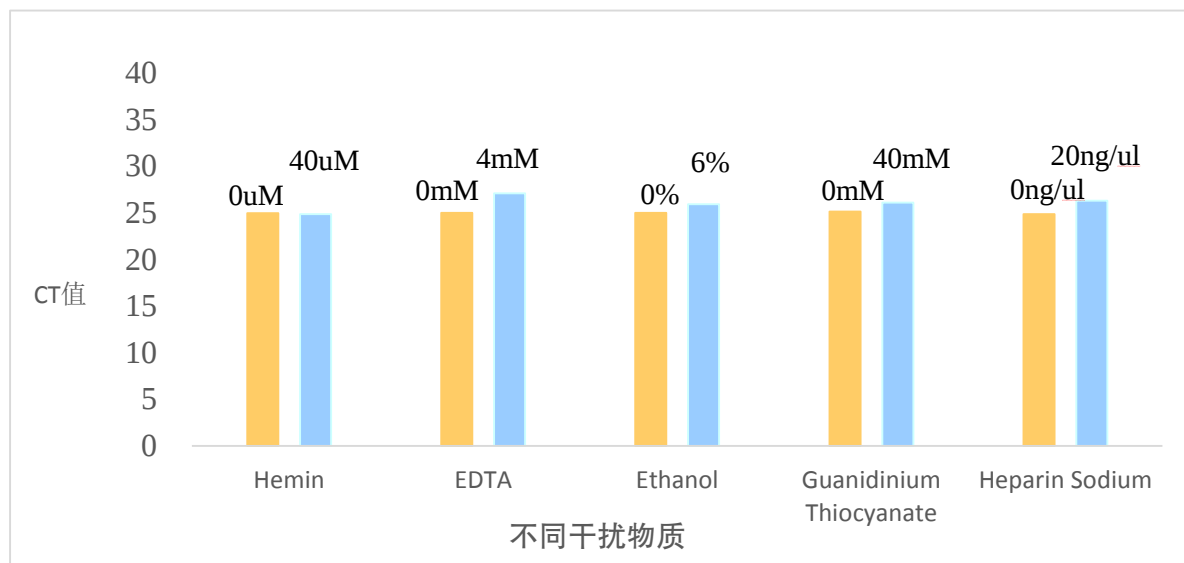


3. 以 λ DNA 为模板，添加不同模板量 (5 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg、10 fg)，使用 *Accurate Super Taq* HS DNA Polymerase II 扩增 2 kb 的 DNA 片段，模板量低至 10 fg 时仍能扩增出目的条带。

电泳结果如下图所示：

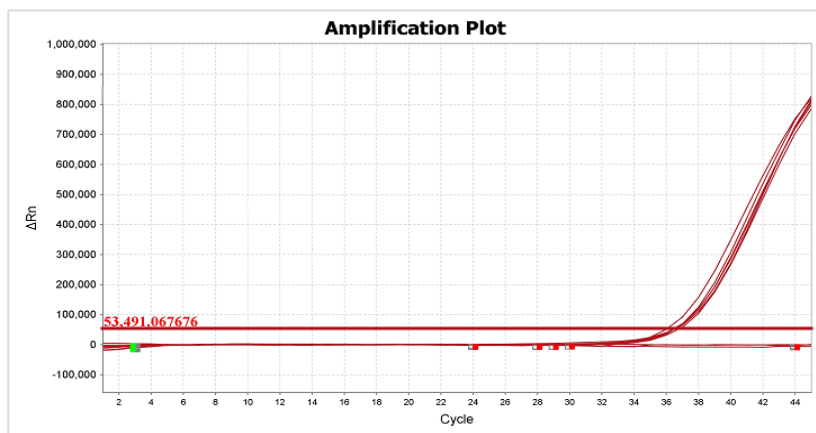


4. Human cDNA 为模板，使用本产品进行 RPP30 基因（GC 含量为 62%，CY5 通道）定重检测，并添加不同干扰物质，干扰物质在体系中的反应终浓度及种类分别为：40 μ M Hemin、4 mM EDTA、6% Ethanol、40 mM Guanidinium Thiocyanate、20 ng/ μ l Heparin Sodium，添加干扰物质后扩增性能与未添加组别 Ct 差值均小于 2，表明本产品具有较强的抗干扰能力，实验结果如下：



*: 代表未添加干扰物质组别，代表添加干扰物质组别，Ct 值越高代表抗干扰性能越差。

5. 以非洲猪瘟 B646L 标准物质 [GBW (E) 091034] 为模板, 使用本产品进行荧光探针 qPCR 方法检测 B646L 基因, 25 μ l 反应体系中模板加入量为 35 copies、0 copies (阴性对照)。所用定量仪器为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。实验结果如下:



结果如上图所示:

- 1、对于低拷贝的病毒模板, 本产品都能够进行良好扩增, 出值率为 100%。
- 2、阴性对照在 45 cycles 内没有检出。

➤ 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°C ~ 60°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 0.2 μ M ~ 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. 合适的退火温度

- ❖ 退火温度过低：可能会导致反应特异性不好，或形成引物二聚体。可适当提高退火温度。
- ❖ 退火温度过高：可能会导致扩增效率低，无扩增曲线。可适当降低退火温度。

5. 防污染措施

- ❖ 实验过程中应穿戴好实验服，佩戴好一次性的口罩、手套。
- ❖ 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，立即用水或 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。

6. 实验细节

- ❖ 扩增反应前要确认管内无气泡。
- ❖ 检查反应程序，确保反应程序设置正确。

➤ 附录：两步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	30 sec	1
变性	95℃	15 sec	30 ~ 35
退火与延伸	60℃	30 sec/kb	
最终延伸	72℃	2 min	1