

版本号: ET130906

High Affinity HotStart Taq

目录号: ET108

产品内容

产品组成	ET108-01	ET108-02
High Affinity HotStart Taq (5 U/ μ l)	250 U	500 U
10 \times HA Buffer	1.8 ml	1.8 ml
5 \times Probe qPCR Buffer	1 ml	2 \times 1 ml

储存条件

收到本产品后, 请立即置于 -20°C 保存。在 -20°C 条件下, 本产品可保存1年。从 -20°C 取出使用时, 将冻存的10 \times HA Buffer和5 \times Probe qPCR Buffer融解, 然后轻轻颠倒混匀, 待溶液完全均一后再行使用。如需一段时间内经常取用, 可在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 条件下储存3个月, 但要避免反复多次冻融。

产品简介

本产品中的High Affinity HotStart Taq是TIANGEN Taq DNA Polymerase 和其单克隆抗体的混合制品，适用于HotStart PCR实验。在PCR反应高温加热前，Taq单克隆抗体会与Taq酶结合，抑制其聚合酶活性。本产品中高亲和力抗体可以保证在常温条件下完全屏蔽Taq酶活性，使整个反应体系具有很高的特异性。另外，本产品中的Taq DNA Polymerase具有较高的模板亲和力，可以提高扩增的效率以及特异性。10×HA Buffer是特别为该酶所优化的PCR反应缓冲液，可以保证该酶的最佳性能。5×Probe qPCR Buffer是特别为探针法定量PCR用户所优化的反应添加剂，在实验中配合10×HA Buffer使用，可使本产品用于探针法定量PCR反应中，从而使得本产品具有更加广泛的应用范围。另外，该试剂盒所产生的PCR产物3'末端为A，可直接用TA载体克隆。

试剂盒特点

1. 高亲和体系：High Affinity HotStart Taq是特异性抗体修饰的热启动型DNA聚合酶，其抗体亲和力高；同时Taq DNA Polymerase具有较高的模板亲和力，具有稳定的扩增效率，和高的特异性；该酶配合精心优化的Buffer体系，使得PCR反应同时具有灵敏度高的优点。
2. 稳定性强：对于复杂模板，低拷贝模板的PCR反应以及多重PCR反应等普通DNA聚合酶无法完成的实验，本产品都具有较高的反应成功率。
3. 应用广泛：本产品不但适用于普通PCR分析，还适用于定量PCR分析。

注意事项

1. 在进行普通PCR反应和染料法定量PCR反应时，不需要额外的加入5×Probe qPCR Buffer，只有在进行探针法定量PCR时才需要额外加入5×Probe qPCR Buffer。
2. 在进行探针法定量PCR时，引物终浓度为250 nM，探针终浓度为200 nM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。如果需要进一步优化引物浓度的，可以在50-900 nM范围内调整；需要进一步优化探针浓度的，可以在100-500 nM范围内调整。

活性定义

1单位（U）High Affinity HotStart Taq活力定义为在74℃、3 min内，以活性化的大马哈鱼精子DNA作为模板/引物，将10 nmol的脱氧核苷酸掺入到酸不溶物质所需的酶量。

质量控制

SDS-PAGE检测纯度大于99%；经检测无外源核酸酶活性；能有效地扩增人基因组中的单基因；室温存放一周，无明显活性改变。

适用范围

适于常规PCR反应，复杂模板，低拷贝模板等的扩增；多重PCR实验，定量PCR实验等。

操作方法

<1> 建立普通 PCR 反应体系：

注意：以下举例仅供参考，实际反应条件因模板、引物等的结构不同而各异，需根据实际情况，设定最佳反应条件。

1. 使用High Affinity HotStart Taq，以人类基因组DNA为模板，扩增1000 bp的片段。
2. 按照下表中各组分的加入量进行反应液的配制。

反应体系：

组成成分	50 μ l 体系	20 μ l 体系	终浓度
DNA Template	—	—	< 200 ng
dNTPs (2.5 mM, each)	4.0 μ l	1.6 μ l	200 nM
正向引物 (10 μ M)	1.25 μ l	0.5 μ l	250 nM
反向引物 (10 μ M)	1.25 μ l	0.5 μ l	250 nM
10 \times HA Taq Buffer	5.0 μ l	2.0 μ l	1 \times
High Affinity HotStart Taq (5 U/ μ l)	0.5 μ l	0.2 μ l	0.05 U/ μ l
RNase-Free ddH ₂ O	至50 μ l	至20 μ l	—

3. 按照下表设置PCR反应程序。

反应程序：

阶段	循环	温度	时间	内容
预变性	1 \times	95 $^{\circ}$ C	3~5 min	预变性
PCR反应	35~40 \times	94 $^{\circ}$ C	15 sec	变性
		60 $^{\circ}$ C	20 sec	退火
		72 $^{\circ}$ C	1 min	延伸
		72 $^{\circ}$ C	5 min	补充延伸
补充延伸	1 \times	72 $^{\circ}$ C	5 min	补充延伸

4. 结果检测：反应结束后取10 μ l反应产物，进行琼脂糖凝胶电泳检测。

备注：实验结果表明，反复冻融的DNA模板会影响扩增，尽量不要将DNA模板进行反复冻融；需要多次实验的模板，可分装后进行冻存，以减少冻融次数。

<2> 建立染料法Real-Time PCR反应体系:

1. 将反应所需各组分解冻，并将所有试剂在室温下平衡并彻底混匀。
2. 建议置于冰上进行Real-Time PCR反应液的配制。

反应体系:

组成成分	50 μ l 体系	20 μ l 体系	终浓度
Template	—	—	— ¹
dNTPs (2.5 mM, each)	4.0 μ l	1.6 μ l	200 nM
正向引物 (10 μ M)	1.25 μ l	0.5 μ l	250 nM ²
反向引物 (10 μ M)	1.25 μ l	0.5 μ l	250 nM ²
10 \times HA Taq Buffer	5.0 μ l	2.0 μ l	1 \times
High Affinity Hot start Taq (5 U/ μ l)	0.5 μ l	0.2 μ l	0.05 U/ μ l
20 \times SYBR Solution	2.5 μ l	1.0 μ l	1 \times
50 \times ROX Reference Dye ³	—	—	—
RNase-Free ddH ₂ O	至50 μ l	至20 μ l	—

¹ 当模板为基因组DNA时模板量为50~100 ng，当模板为cDNA时，模板量不超过PCR反应体系的1/10。

² 引物终浓度为250 nM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时，可增加PCR反应体系中的引物浓度；发生非特异扩增时，可适当减少PCR反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的，可以在50-900 nM范围内调整。

³ 几种常见仪器的最适ROX Reference Dye浓度见下表:

仪器	终浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/Step One等	2.5 \times (例如: 2.5 μ l ROX/50 μ l体系)
ABI 7500、7500 Fast; Stratagene Mx3000P、Mx3005P和Mx4000等	0.5 \times (例如: 0.5 μ l ROX/50 μ l体系)
Roche仪器, Bio-Rad仪器, Eppendorf仪器等	不用添加

3. 按照下表设置PCR反应程序。

反应程序:

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1 \times	95 $^{\circ}$ C	3~5 min	预变性	否
PCR反应	40~45 \times	95 $^{\circ}$ C	15 sec	变性	否
		60 $^{\circ}$ C	30 sec	退火/延伸	是
熔解曲线	1 \times	65~95 $^{\circ}$ C	—	熔解曲线	是

4. 盖上反应管，轻柔混匀。可短暂离心，确保所有反应液均在管底。
5. 将反应体系置于荧光定量PCR仪中，开始反应。
6. 实验结果分析。

反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线和熔解曲线，进行PCR定量时制作标准曲线等。

<3> 建立探针法Real-Time PCR反应体系：

1. 将反应所需各组分解冻，并将其彻底混匀。
2. 建议置于冰上进行Real-Time PCR反应液的配制。

反应体系：

组成成分	50 μ l 体系	20 μ l 体系	终浓度
Template	—	—	— ¹¹
dNTPs (2.5 mM, each)	4.0 μ l	1.6 μ l	200 nM
正向引物 (10 μ M)	1.25 μ l	0.5 μ l	250 nM ¹²
反向引物 (10 μ M)	1.25 μ l	0.5 μ l	250 nM ¹²
荧光探针 (10 μ M)	1.0 μ l	0.4 μ l	200 nM ¹³
10 \times HA Taq Buffer	5.0 μ l	2.0 μ l	1 \times
5 \times Probe qPCR Buffer	10 μ l	4.0 μ l	1 \times
High Affinity HotStart Taq (5 U/ μ l)	0.5 μ l	0.2 μ l	0.05 U/ μ l
50 \times ROX Reference Dye ¹⁴	—	—	—
RNase-Free ddH ₂ O	至50 μ l	至20 μ l	—

¹¹ 当模板为基因组DNA时模板量为50~100 ng，当模板为cDNA时，模板量不超过PCR反应体系的1/10。

¹² 引物终浓度为250 nM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时，可增加PCR反应体系中的引物浓度；发生非特异扩增时，可适当减少PCR反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的，可以在50-900 nM范围内调整。

¹³ 探针的浓度与使用的Real-Time PCR扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，实际使用时请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用说明进行。通常探针终浓度为200 nM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。需要进一步优化探针浓度的，可以在100-500 nM范围内调整。

¹⁴ 关于ROX Reference Dye的使用请参考染料法Real-Time PCR反应体系。

3. 进行Real-time PCR反应

建议采用两步法PCR反应程序进行反应。变性时间可在5-15 sec范围内进行调整，退火/延伸时间可在20-32 sec范围内进行调整

两步法反应程序:

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1×	95°C	3~5 min	预变性	否
PCR反应	40~45×	95°C	5-15 sec ^{*1}	变性	否
		60°C	15-32 sec ^{*2}	退火/延伸	是

^{*1} 使用不同型号仪器进行时间设定时, 请按照仪器使用说明书要求进行实验操作, 使用ABI 7900HT/7900HT Fast/ViiA 7/StepOne/StepOnePlus时可设定为5 sec。

^{*2} 使用不同型号仪器进行时间设定时, 请按照仪器使用说明书要求进行实验操作。

几种常见仪器的时间设定见下表:

使用ABI 7900HT/7900HT Fast/ViiA 7/StepOne/StepOnePlus时请设定在20 sec。
使用Roche LightCycler/ LightCycler 480, ABI 7500 Fast时请设定在15 sec。
使用ABI 7000和7300时请设定在31 sec。
使用ABI7500时请设定在32 sec。

4. 盖上反应管, 轻柔混匀。可短暂离心, 确保所有反应液均在管底。
5. 将反应体系置于荧光定量PCR仪中, 开始反应。
6. 实验结果分析。

浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品