



TIANGEN官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

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



Order: 010-59822688
Toll-free: 800-990-6057 / 400-810-6057
TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD

版本号: ET171206

High Affinity HotStart Taq 高亲和力抗体修饰的Taq DNA聚合酶

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 $^{\circ}$ C保存。在-20 $^{\circ}$ C条件下，本产品可保存1年。从-20 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

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。

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

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 ×	95°C	3~5 min	预变性
PCR反应	35~40 ×	94°C	15 sec	变性
		60°C	20 sec	退火
		72°C	1 min	延伸
		72°C	5 min	补充延伸

4. 结果检测: 反应结束后取10 µl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 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	—	—	— 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
荧光探针 (10 μ M)	1.0 μ l	0.4 μ l	200 nM ³
10 \times HA 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 ⁴	—	—	—
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 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。

⁴ 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