

## Hot-Start Taq DNA Polymerase

产品编号	产品名称	包装
D7211L	Hot-Start Taq DNA Polymerase	5000U

### 产品简介:

- 碧云天生产的Hot-Start Taq DNA Polymerase是一种仅当温度高于45°C时才具有DNA聚合酶活性的Taq DNA Polymerase(简称Taq酶)与其可逆抑制剂的混合物, 俗称热启动Taq酶或HS Taq酶。使用本产品进行PCR反应时可以在室温操作, 并能有效避免室温操作时由于普通Taq酶或其它耐热DNA聚合酶存在活性而导致的非特异性PCR背景。
- 碧云天的Hot-Start Taq DNA Polymerase是Taq酶与其可逆性抑制剂的混合物。该抑制剂可以可逆性地结合于Taq酶活性位点, 当温度低于45°C时, 形成非活性的Taq酶和抑制剂的复合物, 从而抑制了Taq酶的活性。在常规PCR反应过程中, 当温度升高至45°C或以上时, Taq酶和其可逆性抑制剂解离, 从而发挥其正常的DNA聚合酶活性。上述机制使Hot-Start Taq DNA Polymerase仅在加热到45°C或以上时才会有酶活性, 从而确保了小于45°C时不会发生非特异性的DNA聚合反应, 有效降低了PCR的非特异性背景, 提高了PCR反应的准确性和精确性。
- 常规的DNA分离纯化操作, 例如PCR纯化试剂盒或DNA凝胶回收试剂盒和乙醇沉淀等操作, 都能有效去除本产品中的抑制剂, 以避免可能的对于后续反应的干扰。
- Hot-Start Taq DNA Polymerase使用时无需额外的高温孵育步骤以释放Taq酶活性。
- Hot-Start Taq DNA Polymerase和普通的Taq DNA Polymerase一样, 可以催化5'至3'方向的依赖于DNA模板的DNA的聚合反应, 没有3'至5'的外切酶活性, 最终会导致PCR产物的3'末端产生3'-dA overhangs, 即产生带一个A的3'粘端, 可直接用于TA克隆。

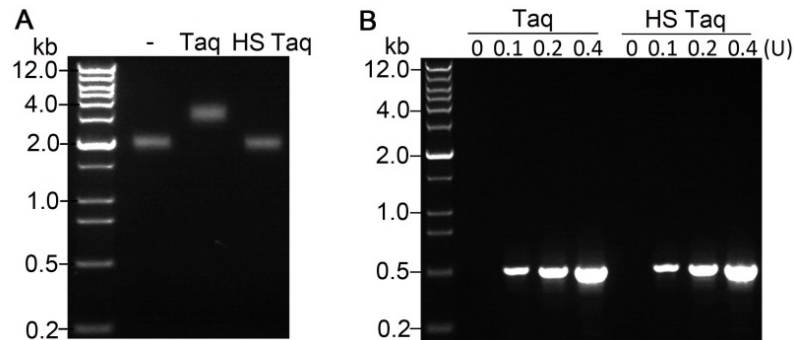


图1. Hot-Start Taq DNA Polymerase的酶活力测定。A. Hot-Start Taq DNA Polymerase (HS Taq)在40°C时, 其聚合酶活力完全被抑制。以M13 mp18 ssDNA (7249nt, 电泳显示约2.2kb)为模板, 添加适量引物后40°C孵育10min, 1% Agarose凝胶电泳。图中可见普通Taq酶在40°C可以发生聚合反应, 使DNA条带延长至电泳呈现的约3.5kb大小, 而Hot-Start Taq酶(HS Taq)完全不能使M13 mp18 ssDNA的链发生延长, 即其酶活力完全被抑制。B. Hot-Start Taq DNA Polymerase在常规PCR条件下其活力完全被释放, PCR扩增效果和Taq酶完全一致。

- **来源:** 本产品使用的Taq DNA polymerase为recombinant Taq DNA Polymerase, 通过大肠杆菌表达纯化获得, 和纯化获得的天然Taq DNA Polymerase在各方面的性质相同。
- **用途:** 高背景和有非特异性条带的PCR, 高专一性PCR(high-specificity PCR), 高灵敏度PCR, 生物芯片分析(microarray analysis), 常规PCR, 克隆PCR、TA克隆等, 不建议用于荧光定量PCR(qPCR)。
- **活性定义:** One unit of the enzyme catalyzes the incorporation of 10 nmol of deoxyribonucleotides into a polynucleotide fraction (adsorbed on DE-81) in 30 min at 70°C. Enzyme activity is assayed in the following mixture: 67 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 6.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM 2-mercaptoethanol, 50 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA, 0.75 mM activated calf thymus DNA, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 MBq/ml [<sup>3</sup>H]dTTP。
- **纯度:** 不含DNA内切酶、外切酶和磷酸酯酶, 不含RNA酶, 满足常规PCR反应要求。
- **酶储存溶液:** 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 100 mM KCl, 0.5% (v/v) Nonidet P40, 0.5% (v/v) Tween 20 and 50% (v/v) glycerol。
- **10X Hot-Start PCR Buffer:** 100 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 500 mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8% (v/v) Nonidet P40。
- **失活或抑制:** 酚氯仿抽提可以使Hot-Start Taq DNA Polymerase失活, 加入脱氧胆酸钠至0.06%, SDS至0.01%, 或sarkosyl至0.02%均可以抑制Hot-Start Taq DNA Polymerase。
- 本产品用于50微升的PCR反应体系, 足够用于4000个反应; 用于20微升的PCR反应体系, 足够用于10000个反应。

## 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7211L-1	Hot-Start Taq DNA Polymerase (2.5U/μl)	5000U
D7211L-2	10X Hot-Start PCR Buffer	10ml×2
—	说明书	1份

## 保存条件:

-20°C保存。

## 注意事项:

- 由于PCR反应非常灵敏可以扩增目的基因序列超过1000万倍，在使用Hot-Start Taq Polymerase时请注意避免微量待扩增DNA的污染，并尽量考虑设置不加模板的空白对照以确认是否有待扩增DNA的污染。
- Hot-Start Taq DNA polymerase在PCR过程中每循环的出错几率约为 $2.2 \times 10^{-5}$ ，对于大于1kb的DNA片段的克隆推荐使用出错几率更低的DNA聚合酶，例如Pfu DNA polymerase、BeyoTaq DNA polymerase等。对于普通的PCR或RT-PCR定性检测或定量检测，Hot-Start Taq DNA polymerase是最佳选择。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明:

### 1. PCR反应体系的设置:

- 融解并混匀PCR反应所需的各种溶液。将Hot-Start Taq DNA Polymerase置于冰浴上或冰盒内。
- 参考下表在冰浴上设置PCR反应体系(如果有多个类似的PCR反应，可以先配制大体积的包含水、buffer、dNTP和Hot-Start Taq酶的混合物，然后分装到各PCR反应管内。根据情况，有时混合物中可以包括引物):

试剂	最终浓度	体积
双蒸水或Milli-Q水	-	(36.5-x)μl
10X Hot-Start PCR Buffer	1X	5μl
dNTP (2.5mM each)	0.2mM each	4μl
模板DNA	10pg-1μg*	xμl
引物混合物(10μM each)	0.8μM	4μl
Hot-Start Taq DNA Polymerase (2.5U/μl)	1.25U/50μl	0.5μl
总体积	-	50μl

注意: (a) 通常引物的终浓度为 $0.2 \mu\text{M}$ 时可获得良好的检测效果，也可以根据情况在 $0.1\text{-}1.0 \mu\text{M}$ 范围内调整引物的终浓度。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度。

(b) 对于不同类型的模板在50μl反应体积中推荐用量如下:

哺乳动物基因组DNA:  $0.1\text{-}1 \mu\text{g}$ ; 大肠杆菌基因组DNA: 10-100ng; 质粒DNA: 0.1-10ng。过多的模板DNA容易导致非特异性的PCR产物。

- 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体体积聚于管底。
  - 如果所使用的PCR仪有热盖则省略本步骤。如果PCR仪没有热盖，则在管内滴入一滴矿物油(mineral oil, ST275)。
  - 把设置好的PCR反应体系置于PCR仪上，开始PCR反应。
2. PCR反应参数的设置可以参考如下示例:

STEP1(起始变性):  $94^\circ\text{C}$  3min

STEP2(变性):  $94^\circ\text{C}$  30sec

STEP3(退火):  $55^\circ\text{C}$  30sec

STEP4(延伸):  $72^\circ\text{C}$  1min

STEP5(循环): Go To STEP2 for 30 cycles

STEP6(最终延伸):  $72^\circ\text{C}$  10min

STEP7(临时保存):  $4^\circ\text{C}$  forever

### 注意:

- PCR反应的设置需根据模板、引物、PCR产物的长度和GC含量等条件的不同设定不同的PCR反应条件包括温度、时间和循环数等。
- STEP4(延伸)的时间设置需根据PCR产物的长度进行设置，通常每kb产物的延伸时间为1分钟。例如PCR产物的长度为1kb，则延伸时间可以设置为1分钟，PCR产物的长度为2kb，则延伸时间可以设置为2分钟，以此类推。
- 对于初次进行的PCR，为尽量确保可以扩增出预期的PCR产物，可以把循环数设置为35。对于需进行半定量反应循环数一定要进行适当优化，使PCR反应没有达到平台期。

## 常见问题:

1. PCR产物非常少或没有特异性条带。

- a. 引物设计不佳是PCR过程中最常见的问题。请选择适当的引物设计软件进行引物设计，注意引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在加入酶切位点等的引物中，一定要注意加入酶切位点等后整条引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在原有引物效果不佳的情况并且阳性对照引物可以正常工作的情况下，可以考虑更换引物。
- b. 待扩增片段GC含量偏高。GC含量较高的情况下PCR会变得相对比较困难，此时可以使用适合扩增高GC含量DNA片段的GC-rich buffer，并相应地根据GC-rich buffer的要求或说明调整PCR反应参数的设置。
- c. 长片段扩增。尽管Hot-Start Taq DNA polymerase可以扩增最长达8kb的DNA片段，但大多数时候比较适合扩增3kb以下的片段，更长片段的扩增推荐使用其它更适合长片段扩增的DNA聚合酶。
- d. PCR反应设置时在室温进行容易导致非特异性条件。推荐在冰浴上设置PCR反应。
- e. 由于引物存在一定的二级结构或存在一定的引物二聚体，或引物偏短，导致退火效果不佳。此时可以采用Touch down等方法进行退火，通常采用从65°C逐步缓慢降温到55°C或50°C的方法，使退火更加充分。
- f. 退火温度不佳，需要优化。如果有温度梯度PCR仪，则可以设置退火的温度梯度，摸索退火的最佳温度。如果没有温度梯度PCR仪，则可以通过多次PCR反应摸索最佳的退火温度。
- g. 延伸时间不足。可按照每1kb片段延伸1分钟进行设置，对于较难扩增的片段可以设置为每1kb片段延伸1.5-2分钟。
- h. 待扩增片段GC含量较高或长度较长，变性不够充分。可以调节起始变性条件至95°C 1min甚至95°C 2-4min。
- i. 在不同PCR仪上进行PCR反应，避免有时PCR仪出现问题。
- j. 循环数不足，适当延长PCR的循环数。通常循环数最高不必超过40，常用的循环数范围为25-35。
- k. 模板含量太低，适当加大模板量，或采用巢式PCR(nested PCR)或二次PCR。巢式PCR即为在原先设计的PCR引物内侧再设计一对PCR引物，然后对第一次PCR产物进行稀释后再进行一次PCR扩增，这样一方面可以起到扩增作用，同时也可以从第一次PCR产物中扩增出特异性条带。二次PCR则为比较简单地用原有引物对第一次PCR产物进行稀释后再进行一次PCR扩增，可以起到扩增作用，但不能去除非特异性条带。
- l. 模板中含有抑制PCR反应的物质，可以用适当的DNA纯化方法例如柱纯化等纯化模板DNA。
- m. 当产生较多非特异性条带时，可以适当提高退火温度。
- n. 注意设置适当的阳性对照和阴性对照通常会有很大帮助。

#### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D7205	Taq DNA Polymerase	200U
D7207	Taq DNA Polymerase	1000U
D7209	Taq DNA Polymerase	5000U
D7211S	Hot-Start Taq DNA Polymerase	200U
D7211M	Hot-Start Taq DNA Polymerase	1000U
D7211L	Hot-Start Taq DNA Polymerase	5000U
D7216	Pfu DNA Polymerase	200U
D7217	Pfu DNA Polymerase	1000U
D7218	BeyoTaq DNA Polymerase	200U
D7219	BeyoTaq DNA Polymerase	1000U
D7220	BeyoFusion™ DNA Polymerase	200U
D7221	BeyoFusion™ DNA Polymerase	1000U
D7222	BeyoFusion™ Plus DNA Polymerase	200U
D7222B	BeyoFusion™ Plus DNA Polymerase	1000U
D7228	2X PCR Master Mix	400次
D7232	PCR Kit with Taq	400次
D7233	PCR Kit with Taq	2000次
D7237	PCR Kit with BeyoTaq	400次
D7251-1ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X)	100次
D7251-4ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X)	400次
D7251-20ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X)	2000次
D7251-100ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X)	10000次
D7255-1ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	100次
D7255-4ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	400次
D7255-20ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	2000次
D7255-100ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	10000次
D7259-1ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	100次
D7259-4ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	400次

D7259-20ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	2000次
D7259-100ml	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	10000次

Version 2017.04.05