



ELK Biotechnology

For research use only.

HotStart Taq DNA Polymerase(5U/uL)

热启动Taq酶

货号	规格	储藏/有效期
EQ006-01	100 μ l	-20C°/两年
EQ006-02	500 μ l	-20C°/两年

产品介绍

Hot Start Taq DNA Polymerase 是Taq酶经Taq抗体孵育后的混合液。Taq 酶抗体与Taq 酶的亲和力非常高，在高温变性前可以封闭 Taq 酶的活性，因此可以非常有效地抑制引物二聚体和非特异性扩增，大大提高了 PCR 反应的精确性。

Hot Start Taq DNA Polymerase 无需特殊的高温处理，常规 PCR 反应条件中的预变性步骤即可启动 Taq 酶的活性，适用于各种基于 Taq 酶的热启动 PCR、qPCR 反应。PCR 产物为 3'端为 A，可直接用 TA 载体克隆。

试剂组成

组分	EQ006-01	EQ006-02
HotStartTaq DNA Polymerase (5U/ μ l)	100 μ l	500 μ l
10 \times PCR Buffer(Mg ²⁺)	0.5 ml	1 ml \times 3
ddH ₂ O	1 ml	1 ml \times 3
说明书	1 份	1 份

单位定义

1单位(U)Taq DNA 聚合酶活力定义为在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10nmol脱氧核苷酸掺入到酸不容物质所需的酶量。

活性检测条件：50 mM Tris-Hcl (pH 9.0, 25°C) ,50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂,0.2 mM each dNTPs(包括[3H]-Dttp), 200 μ g/ml 活化的小牛胸腺DNA 和 0.1 mg/ml BSA。

质量控制

SDS-PAGE 检测纯度大于 99%。经检测无外源核酸酶活性,PCR 方法检测无宿主 DNA 残留，能有效扩增人类基因组中的单拷贝基因。

PCR 体系成分

1.模板 DNA 的纯度：很多残留的核酸提取试剂会影响 PCR 反应，包括蛋白酶、蛋白变性剂(比如 SDS、胍盐)、高浓度盐(KAc、NaAc、辛酸钠等)和高浓度 EDTA 等。纯度不高的模板（比如煮沸法获取的模板）用量请勿超过 PCR 反应体系的 1/10（比如 50 μ l 反应体系中加入模板的体积不应超过 5 μ l）。如果模板 DNA 纯度太差，可使用我们的PCR



ELK Biotechnology

For research use only.

产物回收试剂盒 (Cat. No.EP005) 对模板 DNA 进行纯化及浓缩。经我们的PCR产物回收试剂盒纯化后的模板使用量可多至PCR 反应体系体积的 1/2。

2.模板 DNA 用量: 极微量的 DNA 也可以作为 PCR 模板, 但为保证反应的稳定性, 50 μ l 体系建议使用 10⁴拷贝以上的靶序列作为模板。模板 DNA 的推荐使用量:

人基因组DNA	0.05 μ g~0.5 μ g/50 μ lPCR反应体系
大肠杆菌基因组DNA	10ng~100ng/50 μ lPCR反应体系
λ DNA	0.5ng~5ng/50 μ lPCR反应体系
质粒DNA	0.1ng~10ng/50 μ lPCR反应体系

如需用扩增产物作为模板再扩增, 应至少将扩增产物稀释 1,000 至 10,000 倍后再作为模板使用, 否则可能会出现涂抹条带或无特异性条带。

3. 引物浓度: 一般每条引物配制的浓度为 10 μ M (50 \times), 工作浓度为 0.2 μ M。引物过量可能会出现非特异性扩增, 引物过少则可能会降低扩增效率。

PCR 参数设置

1.预变性: 一般预变性为 94 $^{\circ}$ C, 1~5 min。变性温度过高或时间过长都会损失 Taq 酶的活性。

2.退火: 退火温度是 PCR 的关键, 温度过高可能降低产量, 温度过低可能会产生引物二聚体或非特异性扩增。初次尝试PCR 扩增建议尝试低于 T_m 5 $^{\circ}$ C (如果两条引物 T_m 不同, 参考较低的 T_m)作为退火温度。一般引物合成公司会提供所合成引物的 T_m , 也可以根据此公式估算引物 T_m : $T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A} + \text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G} + \text{C})$ 。最佳退火温度需要进行梯度PCR 确定。

3.延伸: 延伸温度通常为 72 $^{\circ}$ C, 延伸时间长短取决于目的DNA 片段长度, 以 1kb/min 计算所需延伸时间, 时间过长可能会导致非特异性增加。循环结束后, 继续延伸 5~10min, 以获得完整的双链产物。

4. 循环数: 一般使用 25~35 个循环, 低拷贝模板可适当增加循环数。但过多的循环数可能会增加非特异性扩增, 却不会增加特异性产物。



ELK Biotechnology

For research use only.

使用方法

- 1.将 10×PCR Buffer、dNTPs、ddH₂O、模板DNA 和引物室温解冻，置于冰上。
- 2.将解冻后的各个组分上下翻转混合均匀，按下表依次加入各组分配制成 PCR 反应体系：

组分	体积 (μL)
10×PCR Buffer*	5
引物1 (10 μM)	1
引物2 (10 μM)	1
Hotstart Taq DNA Polymerase*	0.5
模板DNA	n
ddH ₂ O	up to 50

注：1) 10×PCR Buffer 使用前必须充分混合均匀，否则将影响 PCR 效果。

2) Mg²⁺终浓度：体系终浓度为2mM，满足大多数基因片段的扩增。如需调整，可使用25mM MgCl₂，在2-5mM终浓度间调整。

3) 聚合酶浓度：推荐使用0.5ul/50ul体系，也可以在0.5-1.0ul/50ul之间进行优化。

上述例子为 50 μl 反应体系所加的组分，如果需要其他体积的反应体系，请按比例增减各组分。

3.手指轻弹 PCR 反应管充分混匀，低速离心数秒使溶液沉降到管底。

4.PCR 反应循环设置举例

循环步骤	温度 (°C)	时间	循环数
预变性	94	1-5 min	1x
变性	94	15 sec	25-35x
退火*	50-60	30 sec	
延伸※	72	30 sec	
终延伸	72	5 min	1x

*以实际最佳退火温度为准。

※延伸时间可根据扩增产物长度设计，以1kb/min作为参考。



ELK Biotechnology

For research use only.

5.结果检测：取 5-10 μ l 扩增产物直接进行琼脂糖电泳检测。

* 琼脂糖凝胶浓度与线形 DNA 最佳分辨范围的关系：

琼脂糖浓度	最佳线形 DNA 分辨范围
0.5%	1,000~30,000
0.7%	800~12,000
1.0%	500~10,000
1.2%	400~7,000
1.5%	200~3,000
2.0%	50~2,000