

Hot Start Taq DNA 聚合酶

组分	#M0291
Hot Start Taq DNA 聚合酶 (5 U/μl)	50 μl
10 × 反应缓冲液 (含15 mM MgCl ₂)	1.5 ml
25 mM MgCl ₂ (用于 Mg ²⁺ 优化)	1.0 ml

概述: Hot Start Taq DNA聚合酶是由普通 Taq DNA聚合酶经过化学修饰得到, 在室温时处于失活状态, 需要经过高温 (95°C) 激活, 可以有效减少PCR过程中的非特异性产物, 具有更高的特异性和产率⁽¹⁾。在使用时, PCR反应液应在95°C预加热8~10分钟进行激活, 之后按照正常的PCR反应程序进行。被激活的酶和 Taq DNA聚合酶功能一致, 催化5'-3'DNA合成, 缺少3'-5'校正活性^(2,3)。Hot Start Taq DNA聚合酶适用于热启动PCR, 所有操作过程可在室温完成, 使用方便。

来源: 来源于一种重组的 *E. coli* 菌株, 该菌株含有来源于 *Thermus aquaticus* YT-1的 Taq DNA聚合酶基因。

应用: 热启动PCR, RT-PCR, 长度达到3 kb的基因组DNA和cDNA的特异性扩增, 低拷贝模板的扩增, 实时定量 PCR, 多重PCR, 具有3'-dA末端产物的扩增 (适用各种TA克隆系统)。

贮存溶液: 20 mM Tris-HCl (pH 8.3 @ 25°C), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% NP-40, 50%甘油。

10 × 反应缓冲液 (含15 mM MgCl₂): 670 mM Tris-HCl (pH 8.3 @ 25°C), 160 mM (NH₄)₂SO₄, 15 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20。

活性单位定义: 1单位指经高温激活后, 在72°C反应30分钟, 能够使10 nmol的dNTP掺入酸不溶性沉淀所需要的酶量。酶活性在下列反应体系中进行测定: 25 mM TAPS (pH 9.3 at 25°C), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM dTTP, 0.1 mM dCTP, 0.75 mM 激活的鲑鱼鱼白DNA以及0.4 MBq/ml [³H]-dCTP。在测试之前, 酶在80°C 加热3小时进行激活。

储存温度: -20°C。

质量控制检测:

PCR功能测试: 以人基因组DNA为模板, 扩增单拷贝antitrypsin基因, 产物长度357 bp, 相比于Taq DNA聚合酶有效减少非特异性产物并具有更高的产物产量。

核酸内切酶活性: 50 μl反应体系中, 20U该酶于1 μg的HindIII消化的λ DNA于37°C温浴4小时, 电泳条带无明显变化。

核酸外切酶活性: 50 μl反应体系中, 20U该酶于1 μg的pUC19质粒于37°C温浴4小时, 电泳条带无明显变化。

参考文献:

1. D'Aquila, R.T., et al., Maximizing sensitivity and specificity of PCR by preamplification heating, *Nucleic Acids Res.*, 19, 3749, 1991.
2. Moretti, T., et al., Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaqGold DNA polymerase, *Biotechniques*, 25, 716-722, 1998.
3. Weyant, R.S., et al., Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase, *Biotechniques*, 9, 309-308, 1990.

参考反应体系和程序:

1. 为了减小误差, 通常配制一个较大体积的主反应液, 含有除模板和引物之外的所有成分。将主反应液按照所需体积分装到PCR管中, 并按照规定加入引物和模板。参考的反应体系如下 (50 μl, 以λ DNA模板为例):

Hot start Taq	0.25-0.5 μl
10 × PCR反应缓冲液 ^a	5 μl
dNTP 混合液 (各10 mM)	1 μl
模板DNA (λ DNA) ^b	2.5 ng
引物1 (10 μM)	2 μl
引物2 (10 μM)	2 μl
水	至50 μl ^c

[a]: 上述反应体系中Mg²⁺的终浓度为1.5 mM, 可满足大多数PCR反应的需要。如有需要, 可对Mg²⁺进行优化。本产品提供25 mM 高纯度Mg²⁺溶液供优化使用。Mg²⁺浓度优化的范围在1.5 mM~4.5 mM之间。



Hot Start *Taq* DNA 聚合酶

[b]: 50 μ l PCR反应体系中模板DNA推荐使用量

人基因组DNA	0.1 μ g~1 μ g
大肠杆菌基因组DNA	10 ng~100 ng
λ DNA	0.5 ng~5 ng
质粒DNA	0.1 ng~10 ng

[c]: 如果PCR仪没有热盖功能, 可在液体表面添加少许石蜡油防止蒸发。

2. PCR反应循环程序可参考普通的*Taq* DNA聚合酶的循环程序, 唯一的区别是循环开始前增加一步高温激活, 即在95°C加热10分钟。参考的PCR程序如下:

2.1 95°C加热10分钟, 激活Hot Start *Taq* DNA聚合酶;

2.2 循环方式如下:

- a. 94°C 30秒
 - b. 50-60°C 30秒 (在合适的温度退火)
 - c. 72°C 1min/kb (按照产物长度, 选择延伸时间)
- 重复上述a、b、c三步循环30-35次

2.3 72°C反应5 min。