



GeneCore Taq Gold HS
DNA Polymerase
使用说明书

目 录

1、贮存和稳定性.....	2
2、介绍.....	2
3、组分列表.....	2
4、酶学性质.....	2
5、需要但未提供的材料.....	3
6、DNA 扩增.....	4
a 一般性建议.....	4
b 准备反应混合液.....	4
c 扩增 DNA 模板.....	5
d 温度循环和循环优化.....	6
7、疑难解答.....	8

1. 贮存和稳定性

收到产品后，请立即置于-20℃冷冻保存。

2. 介绍

GeneCore Taq Gold HS DNA Polymerase 是一个热稳定的、分子量为 94kDa 的重组 DNA 聚合酶，由经过修饰的嗜热水生菌（*Thermus aquaticus*）DNA 聚合酶基因编码，具有严格的热启动能力。它能灵敏检测较低拷贝的 DNA 并有效降低引物二聚体和非特异性扩增，PCR 产物可直接克隆于 T-Vector。

3. 组分列表

货品号	数量	
104-8752-1	250U	50 ul
104-8752-2	1000U	200 ul

4. 酶学性质

一个酶单位（U）的定义：在下面的分析条件下，以大马哈鱼精子 DNA 为模板，74℃ 孵育 10 分钟，在每 30 分钟内将 10nmole 的 dNTPs 掺入到酸性不溶材料中所需要的酶蛋白量。

◆ 分析条件：

25mM TAPS(三-[羟甲基]-甲基-氨基-丙烷-磺酸，钠盐)，pH9.3(室温)；50mM KCl；2mM MgCl₂；1mM β-巯基乙醇；200μM 每种 dATP、dGTP、dTTP；100μM [α-³²P]-dCTP(0.05-0.1Ci/mmmole)；DNA，通过一个修正的方法激活；终体积 50μL，74℃ 孵育 10 分钟。

◆ 贮存缓冲液：

20mM Tris-HCl，pH8.0 (室温)，100mM KCl，0.1mM EDTA (乙二胺四乙酸)，1mM DTT (二硫苏糖醇)，50% 甘油，0.5% Tween 20，0.5% Nonidet P40。

◆ 额外的活性：

在 74℃ 条件下，分别将 600 ng 的超螺旋 pBR322 质粒(dam⁻，dcm⁻)或者 600ng 的 MspI 消化的 pBR322 质粒 DNA 与 8 个单位的 GeneCore Taq Gold HS DNA Polymerase 共同孵育，没有检测到核酸内切酶和外切酶活性。这个聚合酶附带有 一个叉状结构，能够增强 5'到 3'核酸酶活性，无 3'到 5'外切酶活性。

5. 需要但未提供的材料

◆ 试剂

高压灭菌去离子水，超滤或者玻璃蒸馏水

10×PCR Buffer

MgCl₂溶液

dNTP mixture

引物

模板

◆ 仪器设备

电泳供电电源

凝胶电泳槽

PCR 仪器系统

可调移液器

◆ 辅助材料

PCR 反应管

1.5mL 离心管

带有滤芯的吸头

6. DNA 扩增

a 一般性建议

由于 PCR 的巨大扩增能力，低水平的 DNA 污染，特别是来自之前的 PCR 扩增反应产物，带有高水平 DNA 的样品，对照模板的污染都能形成 PCR 产物，即使在未添加目标 DNA 模板时这种情况也会发生。如果可能，所有的反应都应该与 PCR 产物分析区域隔离开来，使用专用的一次性容器、溶液和移液管进行 DNA 提取、反应液混合和样品分析，最大程度降低交叉污染。

b 准备反应混合液

- ◆ 首先准备用于所有样品的标准混合液(水、缓冲液、MgCl₂溶液、dNTP、引物和酶)，之后等量加到每个反应管中。然后加入模板DNA。这样可以将移液过程的损失降到最低，并提高精确度、降低移液的次数。请使用与您的PCR仪器系统相匹配的PCR反应管进行PCR扩增。
- ◆ 因为 DNA 可能附着于塑料上，并且塑料表面常发现有核酸酶的存在，因此最好使用灭菌的、经过硅化的离心管和吸头。

成分	反应量 (μL)	主混合液浓度
水	*	—
10×PCR Buffer	2	1×
2.5mM MgCl ₂	1.6	1.0-4.0mM**
10mM dATP	0.4	200μM
10mM dCTP	0.4	200μM
10mM dGTP	0.4	200μM
10mM dTTP	0.4	200μM
引物 1	0.2-0.8	0.2-1.0uM
引物 2	0.2-0.8	0.2-1.0uM
实验模板	2	10ng-500ng
Taq Gold HS 酶 DNA Polymerase	0.2	1U/反应
总量	20μL	

* 可以使用任何体积的水和实验模板量的组合，只要保证总反应体积 (包括缓冲液，dNTP，引物，酶和MgCl₂溶液) 等于 20μL。

** Mg²⁺的最佳浓度由具体的引物和模板决定，必需靠使用者的经验确定。在多数情况下，Mg²⁺的工作浓度在 1.0 到 4.0mM范围，能够获得好的扩增效果。

c 扩增 DNA 模板

- ◆ 轻轻混合（避免产生气泡）GeneCore Taq Gold HS DNA Polymerase 和其他已融化的试剂。移液前，在微量离心机中离心把管壁液体离下来。小心缓慢地吸取酶溶液；因为酶贮存缓冲液中的甘油带来的粘度能够影响移液体积的正确性。如果可能请使用正压式微量分注器。使用标准混合液有助于提高准确性，减少吸头造成的试剂损耗和降低管与管之间的加样差异。
- ◆ 除了使用 GeneAmp PCR 系统 9600, 9700 和 2400 仪器外，为了防止反应体系挥发和回流，请盖上 PCR 管的盖子或使用 PCR 盖膜封住 PCR 反应板。
- ◆ 在用户使用自行设计的引物扩增不同的DNA靶片段时，针对每一个引物-模板组合来优化PCR反应条件是必要的，可以通过改变Mg²⁺浓度、引物浓度、dNTP浓度和循环条件实现优化。这些条件变化对PCR结果的影响，可以通过可视化的溴化乙啶（EB）凝胶染色检测琼脂糖凝胶上的条带的亮度和分布来判断。
- ◆ 尽管 100-1000bp长度是比较典型和容易扩增的长度，但扩增的DNA片段最长可达 5kb。以足够的模板拷贝数开始PCR反应，才能确保在 25 或者 30 个循环后得到扩增信号，起始模板最好大于 10⁴个拷贝，但在每 50μL体系中总模板DNA要低于 500ng。低浓度的靶DNA片段可能需要 35 或者更多的循环数以产生足够的用于分析的样品。
- ◆ 如果样品 DNA 中含有蛋白酶(例如不纯的基因组 DNA)，在加入 AmpliTaq Gold DNA Polymerase 前，需要将 DNA 样品在 95° C 加热 5 分钟失活蛋白酶。
- ◆ 引物的长度通常在 15-30 个碱基。为了最大限度的保证引物的专一性，引物的G+C含量应接近50%。为了避免潜在的问题，引物需经凝胶电泳或者HPLC离子交换色谱纯化。引物的最佳浓度应该通过实验确定，在 0.1-1μM 的引物浓度变化范围进行条件尝试。引物浓度过低可能导致产物量过低或者无法得到产物，而浓度过高可能导致非特异性的扩增产物出现。0.2-0.5μM 引物浓度的范围适合大多数 PCR 扩增。引物序列自身或者相互之间不要有互补发生，特别是 3'末端。
- ◆ 最佳的Mg²⁺浓度需要通过实验确定，对于每一个引物组，Mg²⁺浓度最高可提至 4mM，太少或者太多都可能降低扩增效率或者导致非专一性的产物出现。

如果样品中含有EDTA或者其他螯合剂，则需在反应体系内成比例地提高Mg²⁺浓度。

Mg²⁺浓度还应与样品DNA和dNTP的浓度变化保持平行。

- ◆ 保持 dNTPs 在反应体系中的平衡；如果任一种 dNTP 的浓度与其他三者显著不同，GeneCore Taq Gold HS DNA Polymerase 可能容易出现错配，并导致扩增速度降低和反应提前终止。
- ◆ 符合 GeneAmp PCR 仪器系统标准的反应体系体积范围，将有助于获得好的扩增结果。如果改变标准混合液中的试剂或者模板的体积，那么需要在标准混合液中通过等量的方式调节水的体积以保持其他试剂浓度的恒定。
- ◆ GeneCore Taq Gold HS DNA Polymerase 是处于休眠状态的，可以通过加热激活，因为用 GeneCore Taq Gold HS DNA Polymerase 增强了 PCR 的特征性，增加 GeneCore Taq Gold HS DNA Polymerase 浓度可在不增加背底的情况下也可以得到更高产量的确定产物，开始建议使用 1.25U/反应，然后在反应混合液中按 0.5 个单位增加 GeneCore Taq Gold HS DNA Polymerase 的量。直到得到想要的结果。

d 温度循环和循环优化

- ◆ GeneCore Taq Gold HS DNA Polymerase 的性能优化和质量控制是在 GeneAmp PCR 仪器系统上进行的。PCR 进程的最佳性能受选择的温度、温度保留的时间和在一个循环中两步间温度升降所用时间的影响。

一个标准的循环包括：一个解链步骤：分离 DNA 双链；一个引物退火步骤 (37°-65° C，由 DNA 靶序列决定)：使引物与互补的 ssDNA 杂交，并起始聚合反应；一个引物延伸步骤(72° C)：在退火期间完成 DNA 的复制。表 1 显示适用于各种 GeneAmp PCR 仪器系统的常用温度条件。

表 1.应用生物系统 GeneAmp PCR 仪器系统的 GeneCore Taq Gold HS DNA Polymerase 循环的精确时间和温度

应用生物系统	管和量		用 GeneCore Taq Gold HS DNA Polymerase 的样品的时间和温度			
	管的类型	量的范围 (μL) /管	预孵化步骤*	每个 25 或更多的循环		结尾步骤
				融解	退火/延伸	
DNA 热循环 480	GeneAmp 细孔反应管	50-100	循环步骤	循环步骤		延长时间
			5-10min 95°C 1cycle	45sec – 1min 94°C – 96°C	45sec – 1min 60°C – 72°C	≥10min 60°C – 72°C
GeneAmp PCR 9600 系统、2400 系统、9700 系统 (9600 的竞争模式)	MicroAmp 反应	50-100	保持	循环		保持
			5-10min 95°C 1cycle	15sec – 30sec 94°C – 96°C	15sec – 30sec 60°C – 72°C	≥10min** 60°C – 72°C

* 预 PCR 加热步骤能完全激活 GeneCore Taq Gold HS DNA Polymerase，这一步骤不可缺少。

**在结尾步骤，存储扩增样品于冰箱或冷冻柜中直到准备使用。

- ◆ 较高的退火温度(>5°C)通常更容易得到专一性的结果。最佳退火温度可以通过经验确定，每次测试 1°C 或者更小的温度变化，逐次增加温度直到获得最好的扩增专一性。在这些退火温度中，会发现一个 GeneCore Taq Gold HS DNA Polymerase 活性最高的点。
- ◆ 靶序列的长度决定延伸时间的长短。通常，温度 70°C-80°C 之间时，GeneCore Taq Gold HS DNA Polymerase 的延伸速率为每分钟 2,000-4,000 碱基。聚合速率在低于 55°C 和高至 85°C（对于一些模板）的情况下也是显著的。在循环后期随着 DNA 数量的增加，GeneCore Taq Gold HS DNA Polymerase 分子的数量可能对于每个批次的延伸变得不足。因此，为了维持扩增效率，在后面的循环中增加延伸时间可能是必要的。

7. 疑难解答

现象	可能的原因	建议的措施
产物条带亮度低或者观察不到条带	实验样品浓度太低。	增加实验样品浓度。
	实验样品 DNA 损坏或者降解。	使用经处理的减少缺口和断裂的实验材料。
	酶浓度太低。	增加酶浓度，在每 50 μ L 的反应体系中额外再加入 0.25U 的酶。
	Mg ²⁺ 浓度太低。	增加Mg ²⁺ 浓度，体系中再额外加入 0.2mM 的Mg ²⁺ 。
	变性时间太长或者太短。	调整变性时间，以每次 5 秒的剂量变化。
	变性温度太高或者太低。	调整变性温度，以每次 1 $^{\circ}$ C 的剂量变化。
	退火/延伸温度太高。	降低温度，以每次 2 $^{\circ}$ C 的剂量减少。
	退火/延伸时间太短。	延长时间，以每次 30 秒的剂量增加。
	循环数太低。	增加循环数，每次增加 3 个循环。
产物有多条带	引物设计不好。	检查引物设计和构成。
	退火/延伸温度太低。	以每次 2 $^{\circ}$ C 的剂量，提高退火温度。
	反应没有热启动。	尝试手动热启动。
产物条带弥散	模板污染。	在一个隔离区进行 PCR 反应。
	酶浓度太高。	降低酶浓度，在 50 μ L 的反应体系内以 0.25 单位的剂量递减。
	Mg ²⁺ 浓度太高。	降低Mg ²⁺ 浓度，以每次 0.1mM 的剂量递减。
	变性时间太短。	以每次 5 秒的剂量延长变性时间。
	变性温度太低。	以每次 1 $^{\circ}$ C 的剂量，提高变性温度。
	退火/延伸时间太长。	以每次 30 秒的剂量，降低时间。
	循环数太高。	以每次 3 个循环的剂量，减少循环数。
产物条带部分或者完全消失	反应没有热启动。	尝试手动热启动。
	模板污染。	在一个隔离区进行 PCR 反应。
	实验样品 DNA 降解。	检测一个新的等量样品。

◆ 申明：本产品仅用于科研，请勿作为诊断、临床试剂使用！！