

Version 1

Cat No. AG11103  
AG11104  
AG11105

# *Pro Taq* DNA 聚合酶 Ver. 2

## *Pro Taq* DNA Polymerase Ver. 2

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



## ➤ 产品概述

本产品是在本公司性能优越的 *Accurate Taq* DNA Polymerase 中添加了高保真酶，使其具有部分的 3' → 5' Exonuclease 活性 (Proof reading 活性)，非常适合 10 kb 以上 DNA 片段的扩增，并且具有较好的保真性能。大部分 PCR 产物 3' 端带有一个 A 碱基，可直接克隆于 T 载体。

## ➤ 产品组成

组分名称	AG11103 【 250U (200 rxns) 】	AG11104 【 250U (200 rxns) 】	AG11105 【 250U (200 rxns) 】
<i>Pro Taq</i> DNA Polymerase ( 5U / μ l )	50 μ l	50 μ l	50 μ l
10X <i>Pro Taq</i> PCR Buffer Ver. 2 ( Mg <sup>2+</sup> plus )	1 ml	-	1 ml
dNTP Mix ( 10 mM each )	200 μ l	200 μ l	-
10X <i>Pro Taq</i> PCR Buffer Ver. 2 ( Mg <sup>2+</sup> free )	-	1 ml	-
MgCl <sub>2</sub> Solution ( 50 mM )	-	500 μ l	-

## ➤ 保存

保存温度：-20°C

运输温度：干冰或者-20°C冰袋运输

## ➤ 活性定义

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 10 nmol 脱氧核苷酸摄入到酸不溶物质所需的酶活性定义为 1 个活性单位 ( U )。

## ➤ 产品优势

1. 本品中添加了高保真酶，相对于 *Accurate Taq* 具有更高的保真性。在普通的 PCR 扩增条件下，具有扩增效率高、错配率低的特点。
2. 本产品以 λ DNA 为模板可扩增 ~ 40 kb 的 DNA 片段，以 Human 基因组 DNA 为模板可扩增 ~17.5 kb 的 DNA 片段。

## ➤ 实验原理

PCR 扩增原理

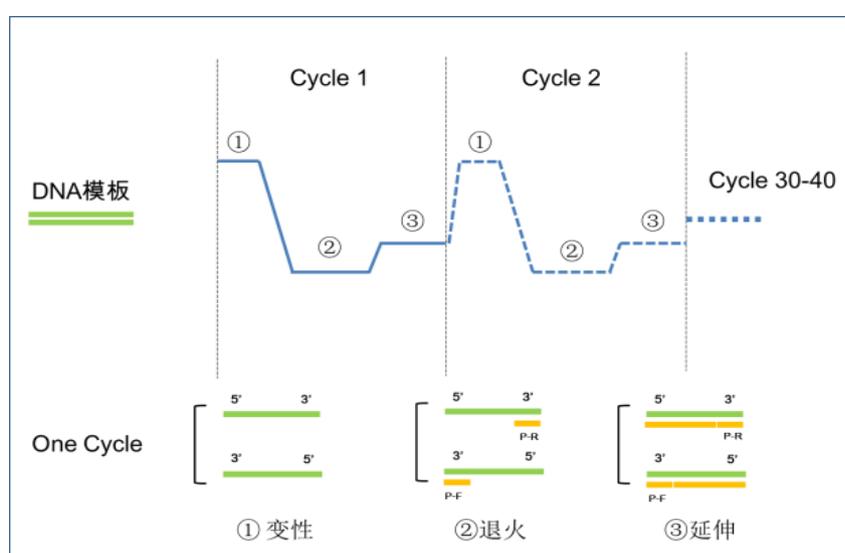
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

扩增详情如下，一般将步骤 ①②③ 称为一个循环，每次进行 DNA 扩增时以此循环 30-40 次。进行 PCR 扩增时，可根据引物的不同调整退火温度，进而获得最优 PCR 扩增反应条件。

步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

步骤②：引物与单链 DNA 进行退火；

步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下进行延伸，与单链 DNA 形成互补链；



## ➤ 使用注意事项

1. 产品中 *Pro Taq* DNA Polymerase 使用前先离心，将所有的溶液收集至离心管底部，然后再进行使用，减少损失；使用时应轻柔混匀（避免起泡），缓慢吸取。
2. 试剂盒中的各组分均需要在  $-20^{\circ}\text{C}$  保存，使用前于冰上溶解后，轻柔混匀后再进行使用。
3. 反应体系需要在冰上配制，以减少配制反应液过程中的非特异性扩增，配制反应体系时一定要确保每个组分都混合均匀。

## ➤ 实验前准备

### 1. 试剂 & 耗材：

Primer、DNA 模板、PCR 管、枪头、冰浴或冰盒。

### 2. 仪器：

PCR 仪、移液器、旋涡振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪。

## ➤ 操作方法

### 1. 配制 PCR 反应液

- 1) 首先按照下表 (表 1 与表 2) 所示配制 PCR 反应液。反应体系需要在冰上配制。
- 2) 将配制好的溶液轻轻的涡旋振荡混匀。

表 1 AG11103 与 AG11105 产品反应液配制

组分名称	反应终浓度	50 $\mu$ l 体系
<i>Pro Taq</i> DNA Polymerase ( 5 U/ $\mu$ l )	1.25 U <sup>*1</sup>	0.25 $\mu$ l
10X <i>Pro Taq</i> PCR Buffer Ver. 2 ( Mg <sup>2+</sup> plus )	1 X	5 $\mu$ l
dNTP Mix ( 10 mM each )	0.2 mM	1 $\mu$ l
Template <sup>*2</sup>	< 500 ng	-
Primer F ( 10 $\mu$ M ) <sup>*3</sup>	0.2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Primer R ( 10 $\mu$ M ) <sup>*3</sup>	0.2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
RNase free water	-	Up to 50 $\mu$ l

表 2 AG11104 产品反应液配制

组分名称	反应终浓度	50 $\mu$ l 体系
<i>Pro Taq</i> DNA Polymerase ( 5U/ $\mu$ l )	1.25 U <sup>*1</sup>	0.25 $\mu$ l
10X <i>Pro Taq</i> PCR Buffer Ver. 2 ( Mg <sup>2+</sup> free )	1 X	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> Solution ( 50 mM )	2.0 mM	2 $\mu$ l
dNTP Mix (10 mM each )	0.2 mM	1 $\mu$ l
Template <sup>*2</sup>	< 500 ng	-
Primer F ( 10 $\mu$ M ) <sup>*3</sup>	0.2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Primer R ( 10 $\mu$ M ) <sup>*3</sup>	0.2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
RNase free water	-	Up to 50 $\mu$ l

\*1: 本说明书推荐的酶量经过优化, 适用于大多数的 PCR 反应; 同时, 可根据实际情况进行调整。

\*2: 模板用量一般 < 500 ng; 同时, 可根据实际需要调整模板用量;

\*3: 引物通常使用终浓度为 0.2  $\mu$  M; 同时, 可根据实际需要 0.2 - 1.0  $\mu$  M 范围内调整。

### 2. 反应条件 (以三步法扩增 1 kb DNA 片段为例<sup>\*5</sup>)

溶液混匀之后, 将 Tube 放置于 PCR 仪中, 然后按照下表条件进行 PCR 反应:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	30 sec <sup>*1</sup>	1
变性	98°C	10 sec <sup>*2</sup>	} 25-35
退火	55°C	30 sec <sup>*3</sup>	
延伸	72°C	1 min / kb <sup>*4</sup>	
最终延伸	72°C	2 min	1

\*1: 一般建议将预变性设置为 94°C 30 sec~1 min; 对于复杂模板, 如高 GC 或者长片段, 可尝试延长预变性时间。

\*2: 变性条件的设定可根据设备进行调整, 一般 98°C 5~10 sec 或 94°C 30 sec。

\*3: 退火温度主要取决于上下游引物的 T<sub>m</sub> 值, 通常可按照 T<sub>m</sub> ± 5°C 设定。

\*4: 延伸温度一般设定为 72°C, 延伸速度 1 min / kb; 同时, 可在 30 sec / kb ~1 min / kb 范围内进行调整。

\*5: 可根据具体实验情况选择两步法进行 PCR 扩增。

### 3. 结果检测

反应结束后, 取适量反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

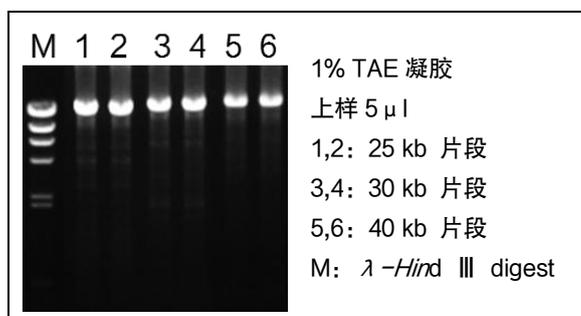
## ➤ 实验例

- 以 λ DNA 为模板, 能够很好地扩增出 40 kb 的 DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	5 sec	} 30
68°C	15 min	
72°C	10 min	1

电泳结果如下:

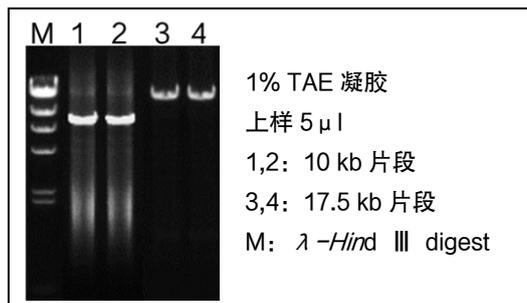


- 以 Human gDNA 为模板, 能够扩增长达 17.5 kb 的 DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	10 sec	} 30
68°C	1 min / kb	
72°C	10 min	1

电泳结果如下:

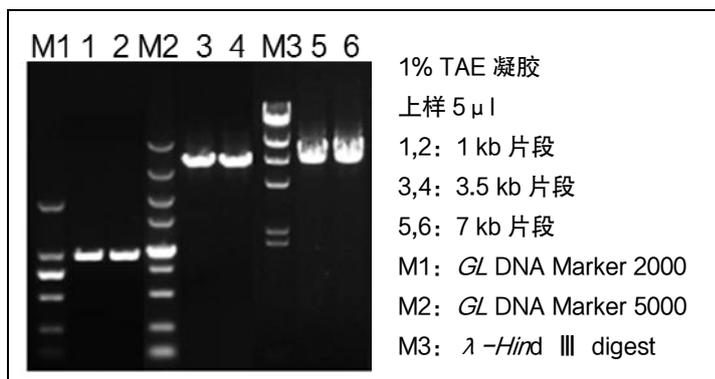


3. 挑取 *E.coli* 单菌落加入至 20  $\mu$ l RNase free water 中, 混匀后取 1  $\mu$ l 菌液为模板, 扩增不同长度的 DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	30 sec	1
98°C	10 sec	} 30
55°C	30 sec	
72°C	1 min / kb	
72°C	2 min	1

电泳结果如下:



4. 以 Human Total RNA 反转录获得的 cDNA 为模板, 能够扩增长达 13 kb 的 DNA 片段。

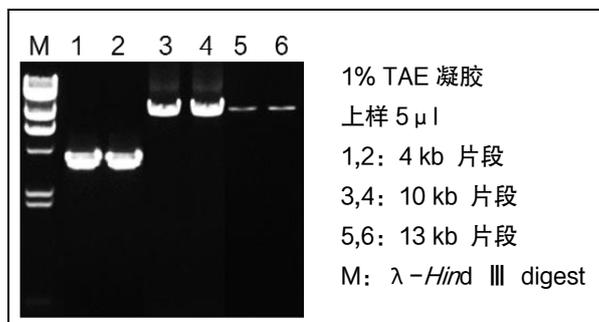
4 kb DNA 片段扩增反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	30 sec	1
98°C	10 sec	} 30
55°C	30 sec	
72°C	1 min / kb	
72°C	2 min	1

10 kb 和 13kb DNA 片段扩增反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	10 sec	} 30
68°C	1 min / kb	
72°C	10 min	1

电泳结果如下:



5. 以小鼠 Total RNA 反转录获得的 cDNA 为模板，能够扩增长达 12 kb 的 DNA 片段。

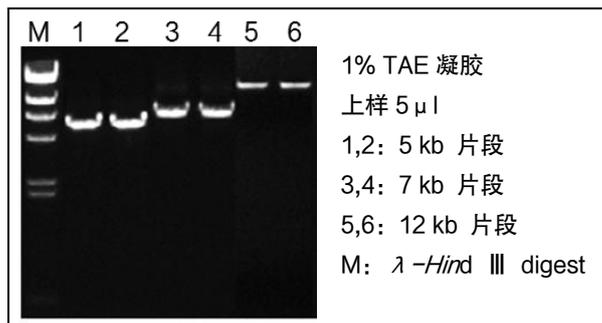
5 kb DNA 片段扩增反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	30 sec	1
98°C	10 sec	} 30
55°C	30 sec	
72°C	1 min / kb	
72°C	2 min	1

7 kb 和 12 kb DNA 片段扩增反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	10 sec	} 30
68°C	1 min / kb	
72°C	10 min	1

电泳结果如下:

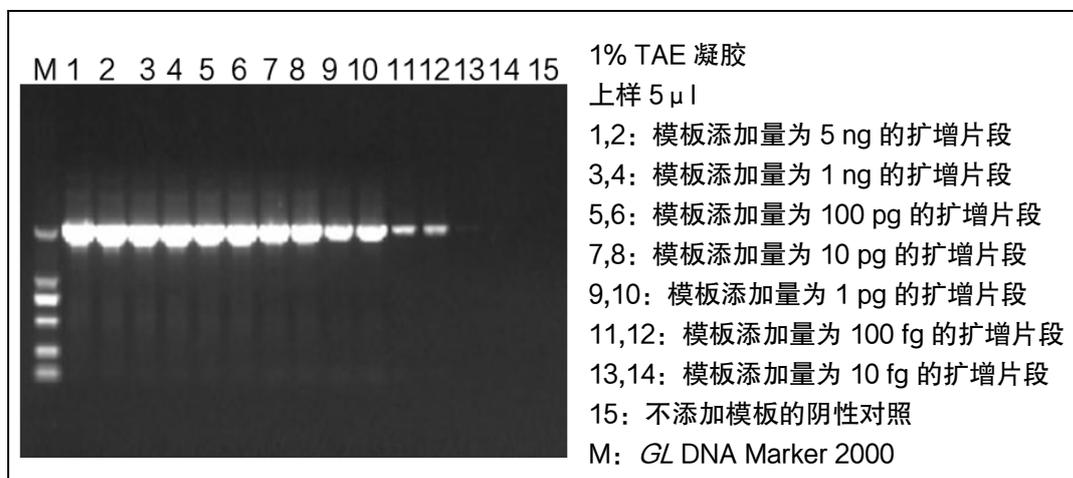


6. 以  $\lambda$  DNA 为模板，添加不同模板量 ( 5 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg、10 fg )，扩增 2 kb 的 DNA 片段，模板量低至 100 fg 时，可扩增出目的片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	30 sec	1
98°C	10 sec	} 30
55°C	30 sec	
72°C	1 min / kb	
72°C	2 min	1

电泳结果如下:



## ➤ 产品注意事项

### 1. 合适的模板

- ❖ 模板加入量降低时，扩增效率降低，产物量减少，扩增特异性升高；模板加入量升高时，扩增效率升高，扩增特异性降低；可根据实际情况调整模板加入量。

- ❖ 模板的纯度及完整性严重影响 PCR 反应，采用高质量高纯度的 DNA 模板，可提高 PCR 反应的成功率，降低外源污染。模板不纯、降解或模板中含有抑制 PCR 反应的物质等，都可能会导致 PCR 反应扩增效率降低，PCR 反应产物产量减少。建议更换模板，重新实验。

## 2. 合适的引物

- ❖ 引物一般是 15-30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40-60% 之间。
- ❖ 建议正反向引物 Tm 值在 50-70°C，两引物 Tm 值相差不超过 5°C。
- ❖ 引物 A、T、C、G 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
- ❖ 引物 3' 端避免出现发夹结构。减少正反向引物之间的互补序列，最好不要超过 4 个连续互补序列。
- ❖ 合适的引物浓度为 0.2 ~ 1.0  $\mu\text{M}$ 。引物浓度降低时，扩增效率降低，反应特异性升高。引物浓度升高时，扩增效率升高，反应特异性降低。

## 3. dNTPs 浓度

- ❖ 本产品的反应体系中，推荐的 dNTPs 终浓度 200  $\mu\text{M}$ 。
- ❖ dNTPs 浓度过高，可能会与  $\text{Mg}^{2+}$  结合，影响 DNA 聚合酶活性；同时，高浓度的 dNTPs 会降低扩增特异性，产生 smear 带。
- ❖ dNTPs 浓度过低，可能会降低扩增效率。

## 4. $\text{Mg}^{2+}$ 浓度

- ❖ 对于 *Pro Taq* DNA polymerase 来说，较理想的  $\text{Mg}^{2+}$  是 2.0 mM；同时，可根据实验具体情况进行调整。
- ❖  $\text{Mg}^{2+}$  浓度过低，会影响 PCR 扩增，导致 PCR 产物产量低；
- ❖ 浓度过高，则可能会降低 PCR 的特异性。

## 5. 合适的变性温度及时间

- ❖ 一般建议将预变性设置为 94°C 30 sec~1 min；对于复杂模板，如高 GC 或者长片段，可尝试延长预变性时间，但时间过长，可能会影响 DNA 聚合酶活性。
- ❖ 变性时间过长或温度过高，可能导致非特异性扩增、DNA 聚合酶活性降低等问题发生；变性时间过短或温度过低，可能导致扩增效率低，电泳条带弥散。

## 6. 合适的退火温度及时间

- ❖ 退火温度越高，扩增特异性越高，但一定程度上扩增效率会降低。
- ❖ 退火温度过低，可能导致反应特异性不好，并且可能会出现引物二聚体。

## 7. 延伸温度及时间

- ❖ *Pro Taq* DNA polymerase 的最佳延伸温度是 70-75°C，一般推荐 72°C，延伸速度是 30 sec / kb ~1 min / kb。当扩增结构复杂或长度较长的片段，推荐 1 min / kb。

## 8. 扩增循环数

- ❖ 扩增循环数取决于模板的初始拷贝数。如果模板的初始拷贝数少于 10 个，则需要大约 40 个循环。对于初始拷贝数较高的模板，一般推荐 25-35 个循环。

## 9. 防止污染措施

- ❖ 配制反应液与添加 DNA 模板的区域最好分开，避免交叉污染。
- ❖ 每次实验设置不添加模板的阴性对照，以检查是否存在污染。