



产品描述

HotPro™ Taq DNA Polymerase 采用了国际上最新专利的合成亲和性配体技术, 该配体可以以一种温度依赖性的方式来可逆性地阻断酶的活性。该酶与一般 Hot-start 酶不同之处在于, 一般的 Hot-start 酶只在第一步温度升高之前封闭酶的活性, 而 HotPro™ Taq DNA Polymerase 利用抑制性配体通过温度调节方式封闭 HotPro™ Taq DNA Polymerase 的底物结合位点, 温度低于 40°C 时, 形成非活性的酶抑制剂复合物, 当温度升高至引物特异性的退火温度时, 结合平衡向模板-特异性引物复合物形成方向移动, 因此最大限度的减少 PCR 扩增全程中的非特异性扩增产物产生, 大大提高了 PCR 反应的精确性。PCR 产物的 3' 端带 A, 可克隆至 T 载体, 并适用于 ClonMan™ 快速克隆试剂盒(PN101/PN111/PN112 等)。2×HotPro™ Taq PCR Master Mix 包含 HotPro™ Taq DNA Polymerase, dNTP 以及优化的缓冲体系, 只需加入引物和模板即可进行扩增, 减少了移液操作, 提高了通量和结果的重现性。含染料的 Master Mix 可在 PCR 反应结束后直接进行电泳。

产品应用

用于高灵敏度和有较强背景的基因组扩增(如基因组中某个特定基因位点或外源病原体检测)、DNA 序列测定、Multiplex PCR、TA 克隆等。

产品组成

组份	PC401-01 250U	PC401-02 1000U	PC401-03 3000U
HotPro Taq DNA Polymerase (5U/μl)	50 μl	200 μl	
10×HotPro Taq Buffer (Mg ²⁺ Plus)	0.5 ml	2×1 ml	PC401-02×3

产品储存

-20°C 保存。

单位定义

用活化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物, 74°C 30 分钟内, 摄入 10 nmol 的全核苷酸为酸性不溶物的活性定义为 1 个活性单位 (U)。

质量控制

核酸外切酶残留检测: 10U 的本酶和 0.6 μg λ -Hind III 在 37°C 下孵育 16 小时, DNA 的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测: 10U 的本酶和 0.6 μg Supercoiled pBR322 DNA 在 37°C 下孵育 4 小时, DNA 的电泳谱带不发生变化。

RNase 残留检测: 10U 的本酶和 1 μg HeLa 细胞总 RNA 在 37°C 下孵育 1 小时, RNA 的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌 DNA 残留检测: 10U 本品中残留的核酸经 E.coli 16s rDNA 特异性的 TaqMan qPCR 检测, E.coli 基因组残留低于 10 拷贝。

功能检测: 50 μl PCR 体系中加入 1.25 U 本酶, 以 100ng 人基因组 DNA 为模板扩增 α -1-antitrypsin gene。30 个循环后将 1/10 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 可见有单一的 360bp 条带。



应用实例

1. 反应体系配置

ddH ₂ O	to 50μl
10×HotPro Taq Buffer (Mg ²⁺ Plus)	5 μl
25 mM MgCl ₂ ①	optional
dNTP Mixture (10mM each)	1 μl
5 × PCR Enhancer ②	optional
Template③	optional
Primer 1 (10 μM)	2 μl
Primer 2 (10 μM)	2 μl
HotPro Taq DNA Polymerase (5U/μl) ④	0.5 μl

①. 对于大多数 PCR 反应, Mg²⁺最佳终浓度为 1.5-2 mM。体系中已含有终浓度为 2 mM 的 Mg²⁺, 如有需要, 可用 25 mM MgCl₂以 0.2-0.5 mM 为间隔向上摸索 Mg²⁺最佳使用浓度。

②. 推荐仅当扩增片段 GC 含量 > 60%且优化条件也无法正常扩增时使用, 可能会降低保真度。(Protein#PC701)

③. 不同模板最佳反应浓度有所不同, 下表为 50 μl 反应体系推荐模板使用量:

人基因组 DNA	1 ~ 500 ng
大肠杆菌基因组DNA	1 ~ 100 ng
λ DNA	0.1 ~ 1 ng
质粒 DNA	0.1 ~ 1 ng

④. 酶量可在 0.25-1 μl 之间调整。加大酶量在通常情况下可以提高扩增产量, 但有可能会使特异性下降。

2. PCR 反应循环的设置

94°C	5 min (预变性) ^a	} 30 ~ 35 cycles
94°C	30 sec	
55°C ^b	30 sec	
72°C	60 sec/kb	
72°C	7 min (彻底延伸)	

a. 预变性时间至少需要 5 min。如扩增不理想, 可适当延长 95°C 预变性时间, 最长可至 10 min。

b. 退火温度需要根据引物退火温度调整, 一般设置成低于引物退火温度 1-2°C 即可。

引物设计注意事项

1. 引物 3' 端最后一个碱基选择 C 或 G;
2. 引物 3' 端最后 8 个碱基应避免出现连续错配;
3. 引物 3' 端尽量避免出现发夹结构;
4. 引物 Tm 值控制在 55°C-65°C 之间;
5. 引物额外附加序列, 即与模板非配对序列, 不应参与引物 Tm 值计算;
6. 引物 GC 含量控制在 40%-60%之间;
7. 正向引物和反向引物 Tm 值以及 GC 含量尽可能一致。