

qPCR Hotstart Taq DNA 聚合酶

货号: P1101, P1102, P1103, P1104

产品简介

东盛生物 qPCR Hotstart Taq DNA 聚合酶是一种创新型的类抗体技术修饰热启动酶，该酶在室温下活性被完全封闭，依赖温度激活酶活性，可有效减少非特异性扩增，具有非常高的特异性及灵敏度。qPCR Hotstart Taq DNA 聚合酶采用先进的生产技术，动物源性 DNA 污染为零，稳定性更强，具有抗体法热启动酶不可比拟的优势。同时，预变性时间缩短至 3 分钟，工作效率比大多数化学修饰法热启动酶更高，是一款专门用于探针、染料法 qPCR 专用酶。

产品组成

Component	P1101	P1102	P1103	P1104
	250 U	1,000 U	3,000 U	18,000 U
qPCR Hotstart Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ l)	50 μ l	200 μ l	200 μ l \times 3	100 μ l \times 36
10 \times qPCR Buffer (Mg ²⁺ Plus) [1]	1.25 ml	1.25 ml \times 2	1.25 ml \times 6	1.25 ml \times 36

[1] 10 \times qPCR Buffer 分为 Mg²⁺ Plus 与 Mg²⁺ Free 两种包装，可方便选择。如无特别说明提供 Mg²⁺ Plus 缓冲液。Mg²⁺ Free 的 10 \times qPCR Buffer 提供 25 mM MgCl₂。

本产品不含 dNTPs，如有需要请单独购买 (Cat. #: P9011/P9012/P9013)。

活性定义

一个活性单位 (U) 指用活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物，在 72 $^{\circ}$ C、30 min 内，摄入 10 nmol 全核苷酸所需的酶量。

保存条件

-20 $^{\circ}$ C 保存 2 年。

质量控制

纯度检测：经质量检测，产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测：PCR 方法检测无宿主残余 DNA，能有效扩增人基因组中的单拷贝基因。

应用举例

1. 配制反应体系

染料法 qPCR 请参考下表配置反应体系，体系大小、组分用量与添加顺序可调整：

Ordinal	Component	Volume (50 μ l reaction volume)	Final concentration (50 μ l reaction volume)
1	10 \times qPCR Buffer (Mg ²⁺ Plus)	5 μ l	1 \times
2	dNTPs (10 mM each) ^[1]	1 μ l	0.2 mM
3	F primer (10 μ M) ^[2]	2 μ l	0.4 μ M
4	R primer (10 μ M) ^[2]	2 μ l	0.4 μ M
5	20 \times SYBR Green I ^[3]	2.5 μ l	1 \times
6	qPCR Hotstart Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ l) ^[4]	0.5-1 μ l	2.5-5 U
7	template DNA ^[5]	1-4 μ l	<1 μ g
8	超纯水 ^[6]	To 50 μ l	-
optional	ROX 参比染料 ^[7]	Variable	-

[1] dNTP Mix 终浓度建议范围：0.05-0.2 mM。

[2] 引物终浓度建议范围：0.1-1 μ M。特异性差时可降低浓度，效率低时可提高浓度。

[3] SYBR Green I 终浓度建议范围：0.2 \times -1 \times 。染料浓度过低会使荧光信号变化降低，导致低拷贝的样品无法检出，而浓度过高时会抑制 PCR 反应。

[4] 根据目的片段扩增的难易程度调整 DNA 聚合酶的用量。

[5] DNA 模板建议用量 (50 μ l 体系)：1-10 ng cDNA，或 10-100 ng gDNA。加样体积不宜过小，以免造成较大的误差，但未稀释的 cDNA 不宜超过总体积的 1/10。

[6] 可单独订购超纯水 (Cat. #: P9021/P9022/P9023)。

[7] 对于某些固定型号的仪器，需要添加 ROX 才能精确测定 Ct 值。由于 ROX 的使用体积较小，建议将 ROX 提前与 qPCR Mix 混匀使用。ROX 用量参照具体仪器说明，下表仅供参考：

Instruments	ROX (100X)
ABI PRISM 7000/ PRISM 7700/ 7300/ 7900HT/ Step One/ Step One Plus/ GeneAmp 5700	1-2% (High ROX)
ABI 7500/ 7500 Fast/ ViiA 7/ QuantStudio 6/7/12K Flex; Agilent Stratagene Mx3000P/ Mx3005P/ Mx4000	0.2% (Low ROX)
Bio-Rad CFX96/ CFX384/ iQ/ iQ5; MJ Research Opticon 2/ Chromo 4; Roche LightCycler 480/ 96; Corbett Rotor Gene G/ Q/ 3000/ 6000; Thermo PikoReal 96; Eppendorf MasterCycler ep realplex; Cepheid Smart Cycler	No ROX

探针法 qPCR 请参考下表配置反应体系，体系大小、组分用量与添加顺序可调整：

Ordinal	Component	Volume (50 µl reaction volume)	Final concentration (50 µl reaction volume)
1	10× qPCR Buffer (Mg ²⁺ Plus)	5 µl	1×
2	dNTPs (10 mM each)	1 µl	0.2 mM
3	F primer (10 µM)	2 µl	0.4 µM
4	R primer (10 µM)	2 µl	0.4 µM
5	Probe (10 µM) ^[1]	Variable	0.1-0.5 µM
6	qPCR Hotstart Taq DNA 聚合酶 (5 U/µl)	0.5-1 µl	2.5-5 U
7	template DNA	1-4 µl	<1 µg
8	超纯水	To 50 µl	-
optional	ROX 参比染料	Variable	-

[1] 使用探针的浓度与 Real Time PCR 扩增仪、探针种类和荧光标记物种类有关，使用时请参照相关说明。

通常探针终浓度在 0.1-0.5 µM 之间。

2. 设定反应程序进行 qPCR 反应

两步法程序示例如下：

Stage	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	95°C	3 min	/
Denaturation	95°C	10 sec	40
Annealing & Extension ^[1]	60°C	30 sec	

[1] 仪器在此阶段进行信号采集。请根据仪器类型设置反应时间。如需优化温度，建议在 55-65°C 范围内调整。

经典三步法程序示例如下：

Stage	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95°C	3 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	40
Annealing ^[1]	60°C	15 sec	
Extension ^[2]	72°C	20 sec	

[1] 进行探针法荧光定量时，请设置在此阶段进行信号采集。常用退火温度在 55-65°C 之间。退火温度一般设定为所用引物的 T_m-5°C，若低于 55°C，则以 T_m 值为退火温度，一般不低于 55°C。请根据仪器类型设置反应时间。

[2] 进行染料法荧光定量时，请设置在此阶段进行信号采集。

3. 分析结果

观察扩增曲线；调整基线，计算 Ct 值；进行相对或绝对定量。

操作注意事项

1 本产品采用改进的类抗体修饰技术，依赖温度激活 DNA 聚合酶，能有效抑制非特异性结合，可在室温下配置反应体系。

引物设计注意事项

引物长度一般在 15-30 个碱基之间；上下游引物 3'末端避免互补，避免出现 3 个以上重复的 G 或 C，或出现发夹结构，否则会产生非特异性扩增；GC 含量控制在 40-60%，且上下游引物 GC 含量尽量接近；T_m 值控制在 55-65°C 之间，且上下游引物 T_m 值尽量接近，额外附加序列（酶切位点、修饰等）是非模板匹配序列，不参与 T_m 值计算。

本品仅供科学研究使用。