

产品概述

Taq Plus HS DNA Polymerase是基于抗体法修饰，经过升级改造提升模板亲和能力的新一代热启动DNA聚合酶。搭配针对PCR/qPCR/ddPCR系统优化的最适Buffer，显著提高了扩增特异性和低拷贝基因的检测灵敏度，促进ddPCR中液滴的均匀生成，且不易发生融合。本产品适用于DNA模板（如DNA病毒）的探针法定量PCR检测，能够在广泛的定量范围内得到优异的扩增曲线，对靶基因进行准确定量、检测，重复性好，可信度高。对于模板类型、模板GC含量和引物Tm值等具有广泛的兼容性，同时具有良好的杂质耐受性能，适用多种检测场景。

产品组分

组分	NBS1021-01 (1,000 U)	NBS1021-05 (5,000 U)
5 × Taq Plus ddPCR Buffer ^a	4 × 1 ml	
Taq Plus HS DNA Polymerase (5 U/μl) ^b	200 μl	5 × NBS1021-01

a. 包含dNTP Mix, Mg²⁺等。

b. Taq Plus HS DNA Polymerase含有较高浓度甘油，使用前请短暂离心收集至管底，并用移液枪轻轻吸打，充分混匀后准确吸取。

保存条件

-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输。

适用范围

适用于动物、植物、微生物等DNA样本的核酸扩增。

注意事项

1/qPCR注意事项

引物设计

- 引物长度17 - 25 bp为佳。太短的引物容易导致扩增效率降低；太长的引物会导致出现引物高级结构的几率增加。两者都会干扰定量结果的准确性。
- 引物的GC含量控制在40% - 60%，最佳为45% - 55%。
- 引物的Tm值应大于60°C，推荐使用Primer Premier 5进行Tm值计算。
- 引物A、G、C、T整体分布尽量均匀，避免使用GC或者TA含量高的区域，尤其是3'端，必须避开GC含量不均匀的区域。
- 引物设计时请尽量避开T/C或者A/G的连续结构。
- 引物3'端最后五个碱基不能包含超过2个以上的G或者C。
- 正向或者反向引物应尽量接近探针序列，但是不能和探针序列有重合区域。

TaqMan探针设计指南

探针序列应尽量接近正向或者反向引物，但是不能与之有重合区域。

1. 探针长度一般为18 - 40 bp。
2. 应避免连续相同的碱基出现，特别是要避免GGGG或者更多的连续G出现。
3. 探针5'端应避免使用碱基G。
4. 探针的退火温度应为65 ~ 67°C。
5. 如果序列中包含多态性位点，应使其位于探针序列中间。

2/PCR注意事项

引物设计

1. 引物3'端最后一个碱基最好为G或者C。
2. 引物3'端最后8个碱基应避免出现连续错配。
3. 引物3'端应避免出现发夹结构。
4. 正向引物和反向引物的Tm值相差不超过1°C为佳，Tm值调整至55 ~ 65°C为佳(引物Tm值推荐使用Primer Premier 5进行计算)。
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. 引物的GC含量控制在40% - 60%之间。
7. 引物A、G、C、T整体分布要尽量均匀，避免使用GC或者AT含量高的区域。
8. 引物内部或者两条引物之间避免有5个碱基以上的互补序列，两条引物的3'端避免有3个碱基以上的互补序列。
9. 引物设计完毕请使用NCBI BLAST功能检索引物特异性，以避免非特异性扩增产生。

实验流程

1/qPCR实验流程(以ABI 7500为测试机型)

1. qPCR反应体系

5 × Taq Plus ddPCR Buffer	4 μl
Primer 1 (10 μM)	0.4 μl
Primer 2 (10 μM)	0.4 μl
TaqMan Probe (10 μM)	0.2 μl
50 × ROX Reference Dye 2	0.4 μl
Template DNA	x μl
Taq Plus HS DNA Polymerase (5 U/μl)	0.2 μl
ddH ₂ O	Up to 20 μl

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

- ▲ 一般来说反应体系中引物终浓度为0.2 μM即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度0.1 - 1.0 μM范围内调整引物浓度。
- ▲ 探针终浓度可以在50 - 250 nM之间调整。
- ▲ qPCR灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大影响。推荐将模板稀释后加入反应体系中，可有效提高实验的重复性。
- ▲ 模板可以进行适当体积调整，如模板类型为未稀释的cDNA原液，使用体积不应超过qPCR反应总体积的1/10。

2. 按下列条件进行qPCR反应

标准程序

Stage 1	预变性	Reps: 1	95°C	30 sec
Stage 2	循环反应	Reps: 45	95°C	10 sec
			60°C	30 sec

快速程序

Stage 1	预变性	Reps: 1	95°C	20 sec
Stage 2	循环反应	Reps: 45	95°C	1 sec
			60°C	20 sec*

* 实际使用的Real Time PCR仪是否支持快速扩增循环，初次尝试请进行预实验确认。

2/PCR实验流程

1. PCR反应体系

5 × Taq Plus ddPCR Buffer	4 μl
Primer 1 (10 μM)	1 μl
Primer 2 (10 μM)	1 μl
Template DNA*	x μl
Taq Plus HS DNA Polymerase (5 U/μl)	0.2 μl
ddH ₂ O	Up to 20 μl

*不同模板最佳反应浓度不同，下表为20 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 λ	1 - 100 ng
DNA	0.1 - 10 ng
质粒DNA	0.1 - 10 ng

2. PCR反应程序

95°C	30 sec(预变性)	} 30 - 35 cycles
95°C	30 sec	
55°C*	30 sec	
72°C	60 sec/kb	
72°C	7 min(彻底延伸)	

* 退火温度需要根据引物的T_m值进行调整，一般设置成低于引物T_m值3 ~ 5°C即可。

常见问题与解决方案

◇ 扩增曲线形状异常

- ① 扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统矫正后产生；提高模板浓度重复实验。
- ② 扩增曲线断裂或下滑：模板浓度较高，基线的终点值大于 C_T 值。减小基线终点(C_T 值-4)，重新分析数据。
- ③ 个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡。处理样本时要注意离心，进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

◇ 反应结束无扩增曲线出现

- ① 反应循环数不够：一般设置循环数为45，但需要注意的是过多的循环会增加过多的背景信号，降低数据可信度。
- ② 确认程序中是否设置了信号采集步骤：两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段；三步法扩增程序应当将信号采集设置在72°C延伸阶段。
- ③ 确认引物是否降解：长时间未用的引物应先通过PAGE电泳检测完整性，以排除其降解的可能。
- ④ 模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- ⑤ 模板降解：重新制备模板，重复实验。

◇ C_T 值出现太晚

- ① 扩增效率极低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或者重新设计合成引物。
- ② 模板浓度太低：降低稀释倍数重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- ③ 模板降解：重新制备模板，重复实验。
- ④ PCR产物太长：推荐PCR产物长度为80 - 150 bp。
- ⑤ 体系中存在PCR抑制剂：一般为模板带入，提高模板稀释倍数或者重新制备模板重复实验。

◇ 阴性对照出现明显扩增

- ① 反应体系污染：更换新的酶、Buffer、ddH₂O、引物、探针重复实验。

◇ 绝对定量时标准曲线线性关系不佳

- ① 加样误差：提高模板稀释倍数，提高加样体积。
- ② 标准品降解：重新制备标准品，重复实验。
- ③ 模板浓度太高：提高模板稀释倍数。

◇ 实验重复性差

- ① 加样体积失准：使用性能较好的移液枪；提高模板稀释倍数，提高加样体积。
- ② 定量PCR仪温度控制孔间差异大：定期校准仪器。
- ③ 模板浓度太低：模板浓度越低，重复性越差，减少模板稀释度或提高加样体积。