

产品概述

Robustart Taq HD 是经过基因改造筛选而来的高特异性重组 DNA 聚合酶，可以催化 5' 至 3' 方向严格依赖于 DNA 模板和碱基配对原则的高特异性的扩增反应。本品是通过大肠杆菌重组表达、多步分离纯化后获得高纯度酶蛋白，然后进行热启动修饰得到常温下封闭活性的热启动酶。本品适用于特异性要求更高的突变位点检测，尤其适合于 ARMS PCR 荧光定量检测。

规格

5 U/ μ L

试剂组成

1. 5 U/ μ L Robustart Taq HD
2. 10 $\times$ HD Buffer III (dNTP free, Mg²⁺ free) (选配)
3. 25 mM MgCl₂ (选配)

活性定义

在 74°C、30 min 内，以活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物，将 10 nmol 脱氧核苷酸掺入到酸不溶物质所需要的酶量为 1 个活性单位 (U)。

储存缓冲液

20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, Stabilizer, 50% Glycerol。

保存条件

-20°C 长期保存，使用前应混匀，避免反复冻融。

质量控制

1. SDS-PAGE 电泳纯度大于 98%。
2. 扩增灵敏度、批间差异、稳定性。
3. 无外源核酸酶活性，无外源内切、外切核酸酶污染。

PCR 反应体系配制

Component	Volume per Reaction	Concentration in Master Mix
10 $\times$ HD Buffer III (dNTP free, Mg ²⁺ free) ¹	5 μ L	1 $\times$
dNTPs (10 mM each dNTP)	0.5~1 μ L	100~200 μ M
25 mM MgCl ₂	2~8 μ L	1~4 mM
5 U/ μ L Robustart Taq HD	0.25~0.5 μ L	1.25~2.5 U
25 $\times$ Primer Mix ²	2 μ L	1 $\times$
Template	—	< 1 μ g/reaction
ddH ₂ O	To 50 μ L	—

1. 对于不含 Mg^{2+} 的 Buffer，必须同时加入 $MgCl_2$ 使用。
2. 若用于 qPCR/qRT-PCR，则需加入荧光探针到反应体系中。通常引物终浓度为 $0.2 \mu M$ 可以得到较好结果；反应性能较差时，可以在 $0.2 \sim 1 \mu M$ 范围内调整引物浓度。通常探针浓度在 $0.1 \sim 0.3 \mu M$ 范围内优化。可进行浓度梯度的实验，寻找引物和探针的最佳组合。

反应条件

两步法				三步法			
步骤	温度	时长	循环数	步骤	温度	时长	循环数
热启动	95°C	1~5 min	1	热启动	95°C	1~5 min	1
变性	95°C	10~20 s	35~50	变性	95°C	10~20 s	35~50
退火延伸	56~64°C	20~60 s		退火延伸	56~72°C	10~60 s	

技术说明

1. 特别适合于 ARMS PCR 荧光定量检测。
2. 适用于普通 PCR、荧光定量 PCR 检测。
3. 具有 5' -3' 聚合酶，5' -3' 外切核酸酶活性；无 3' -5' 外切酶活性，无校对功能。
4. PCR 产物 3' 端为 A，产物可直接进行 T 载体克隆。