

Code No. TCH014/TCH015

研究用

TAKARA

Mighty Taq HS DNA Polymerase
(High Sensitivity)

中文名：抗阻害热启动 Taq DNA 聚合酶
(高灵敏度)

说明书

目 录

| 内 容 | 页 码 |
|-----------------|-----|
| ● 制品说明 | 1 |
| ● 试剂原理 | 1 |
| ● 制品内容 | 1 |
| ● 试剂盒外必备主要试剂和仪器 | 2 |
| ● 保 存 | 2 |
| ● 特 长 | 2 |
| ● 操作注意 | 3 |
| ● 使用注意 | 3 |
| ● 操作方法 | 3 |
| ● 关联产品 | 10 |

● 制品说明

本制品由改良后的 Mighty Taq HS DNA Polymerase (High Sensitivity)和 2X Mighty Taq HS Buffer (Mg²⁺ plus) (High Sensitivity)搭配组成, 可以提高阻害物抵抗力, 对粗提样品具有突出的扩增效果; 支持快速反应, 可以在短时间内进行高效扩增、高灵敏度的检出; 含有抗体, 适用于 Hot Start PCR, 能有效防止在热循环前由引物错配或引物二聚体产生的非特异性扩增。

2X Mighty Taq HS Buffer (Mg²⁺ plus) (High Sensitivity)中已添加了 Tli RNaseH (耐热性 RNaseH), 以 cDNA 为模板进行 PCR 反应时, 可以很好抑制由于 cDNA 中残存 mRNA 对 PCR 反应造成的阻害作用。

● 试剂原理

本制品利用耐热性 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增反应, 通过使用探针对 PCR 扩增产物进行实时监测。

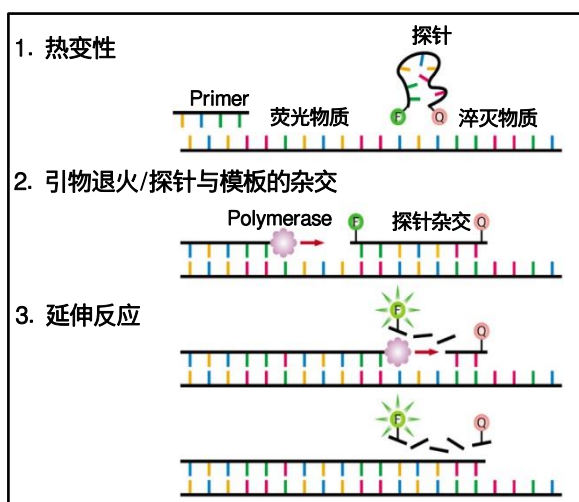
1. PCR

PCR 法是以微量 DNA 进行目的片段扩增的方法。通过 DNA 链的热变性、引物退火、DNA 聚合酶作用下引物的延伸三个步骤循环往复, 可在短时间内扩增 DNA 达 100 万倍以上。

2. 荧光检出

使用 5' 端带有荧光物质 (如: FAM 等), 3' 端带有淬灭物质 (如: TAMRA 等) 修饰的寡核苷酸进行荧光检测的方法。当探针完整时, 5' 端的荧光物质受到 3' 端淬灭物质的制约, 不能发出荧光。而当探针被分解后, 5' 端的荧光物质便会游离出来, 发出荧光。

当 PCR 反应液中加入荧光探针后, 在 PCR 反应的退火过程中, 荧光探针便会和模板杂交。进一步在 PCR 反应的延伸过程中, 耐热性 DNA 聚合酶的 5' → 3' Exonuclease 活性可以分解与模板杂交的荧光探针, 游离荧光物质发出荧光。通过检测反应体系中的荧光强度, 可以达到检测 PCR 产物扩增量的目的。具体原理见右图。



● 制品内容 (TCH014: 250 U; TCH015: 50 U)

| | TCH014 | TCH015 |
|---|----------|--------|
| Mighty Taq HS DNA Polymerase (High Sensitivity) (5 U/μl) | 250 U | 50 U |
| 2X Mighty Taq HS Buffer (Mg ²⁺ plus) (High Sensitivity)* | 1 ml × 5 | 1 ml |

* 内含 dNTP Mixture, Mg²⁺, Tli RNase H 等。

● 试剂盒外必备主要试剂和仪器

1. End Point PCR 扩增仪

【本制品适用的机型】

- TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)
- Clontech PCR Thermal Cycler GP (Code No. WN400)

2. Real Time PCR 扩增仪 (authorized instruments)

【本制品适用的机型】

- Thermal Cycler Dice Real Time System IV (Code No. TP1000)
- Thermal Cycler Dice Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)
- Thermal Cycler Dice Real Time System // (Code No. TP900/TP960: 终卖)
- Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (Code No. TP700/TP760: 终卖)
- CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (Code No. 640231/640232)
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- Applied Biosystems™ QuantStudio™ 3 / 5 Real Time PCR System、7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- LightCycler 96/480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics)
- Gentier 96E/96R 全自动医用 PCR 分析系统 (西安天隆科技)

3. 实验专用反应管或反应板

4. PCR 引物

5. 检测用探针 (Dual Labeled Probe, etc.)

6. PCR 模板

7. 灭菌水

8. 微量移液器和枪头

● 保 存: -20°C保存

● 特 长

1. 抗阻害效果好: 对化学物质耐阻害性强; 可对应多种粗提样品的扩增, 如血液、抗凝血、动物组织、植物组织、土壤等。
2. 灵敏度高: 可满足低拷贝模板检测要求, 搭配优化的 buffer, 特异性和灵敏度更高。
3. 快速扩增: 支持快速反应程序, 最短可在 30 min 内 (仪器快速模式) 进行 Real Time PCR 分析, 提高检测效率。
4. 兼容性广: 对于模板类型、模板 GC 含量和引物 T_m 值等具有广泛的兼容性, 且适合于 End Point PCR 和 qPCR 多种检测场景。
5. 操作灵活: 本品包含酶和 buffer 两种组分, 可以根据样本的阻害程度, 灵活调整酶量以达到更好的扩增效果。

● 操作注意

以下为使用本试剂时的注意事项，使用前请一定认真阅读。

1. 进行 Real Time PCR 反应时，反转录反应所用的试剂推荐使用：
PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)(Code No. RR037Q/A/B)
PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036Q/A/B)
PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Code No. RR047Q/A/B)
PrimeScript™ FAST RT reagent Kit with gDNA Eraser (Code No. RR092A/RR092S)
以上制品与本制品组合使用可以得到可信用度高的结果。
2. 使用前，组分 2X Mighty Taq HS Buffer (Mg²⁺ plus) (High Sensitivity)请上下颠倒轻轻混合，避免产生气泡，试剂混合均匀后再使用。试剂混合不均匀会造成反应效果不佳。请勿涡旋振荡混匀。
3. 融解后的试剂请立即冰上放置。
4. 使用时，请一定保证所有的试剂、耗材没有污染，调制场所也要确保没有污染。
5. 试剂分取、反应液的配制、分装请一定使用新的一次性枪头，尽量避免样品间的污染。
6. 如果探针、引物因混入核酸酶而被降解，则不能准确进行检测。实验者的汗液和唾液也会带入核酸酶，操作时应注意。
7. qPCR 反应管请与 Real Time PCR 扩增仪适配。
8. 各 PCR 扩增仪的分析方法请参见各仪器的使用说明书。当 PCR 扩增仪的 Auto 功能不适合时，将会导致结果判定错误。此时可参照 PCR 扩增仪说明书进行手动设定。

● 使用注意

本制品中使用的 DNA 聚合酶是利用抗 *Taq* 抗体的 Hot Start PCR 酶，与其他公司的化学修饰型 Hot Start PCR 酶相比，不需要 PCR 反应前的 95℃、5–15 min 的酶的活性化反应。如果高温处理时间过长，会使酶的活性下降，其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性，通常设定为 95℃、30 sec。

● 操作方法

End Point PCR操作方法

注意：请按照End Point PCR仪器的使用说明书进行操作。

1. 按照下列组分配制PCR反应液（反应液配制，请在冰上进行）。

<反应体系>

| 试剂 | 使用量 | 终浓度 |
|--|-------------|------------|
| 2X Mighty Taq HS Buffer (Mg ²⁺ plus) (High Sensitivity) | 25 μl | 1X |
| PCR Forward Primer | 10–50 pmol | 0.2–1.0 μM |
| PCR Reverse Primer | 10–50 pmol | 0.2–1.0 μM |
| Template | <500 ng | |
| Mighty Taq HS DNA Polymerase (High Sensitivity) (5 U/μl) | 0.25 μl | |
| 灭菌水 | up to 50 μl | |

2. PCR反应条件

Note: 抗 *Taq* 单克隆抗体在PCR反应最初的DNA变性步骤已变性，因此在常规PCR反应条件下即可使用，无需进行特殊的失活处理。

实验例：扩增小鼠尾 542 bp片段的PCR反应条件如下

| | | |
|------|--------|-------------|
| 94°C | 30 sec | } 30 cycles |
| 94°C | 10 sec | |
| 60°C | 15 sec | |
| 65°C | 30 sec | |

注) PCR反应条件视仪器条件不同而各异。推荐变性条件为98°C 5–10 sec或94°C 20–30 sec。

Real Time PCR操作方法

[使用Thermal Cycler Dice Real Time System III、Thermal Cycler Dice Real Time System IV、CronoSTAR 96 Real-Time PCR System、CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System、LightCycler 480 Real-Time PCR Detection System、Gentier 96E/96R 全自动医用PCR分析系统时的操作方法]

注意：请按照Real Time PCR仪器的使用说明书进行操作。

1. 按照下列组分配制PCR反应液（反应液配制请在冰上进行）。

<反应体系>

| 试剂 | 使用量 | 终浓度 |
|--|-------------|----------------------|
| 2X Mighty Taq HS Buffer (Mg ²⁺ plus) (High Sensitivity) | 12.5 μl | 1X |
| PCR Forward Primer (10 μM) | 0.5 μl | 0.2 μM ^{*1} |
| PCR Reverse Primer (10 μM) | 0.5 μl | 0.2 μM ^{*1} |
| Probe ^{*2} | 1 μl | |
| Template ^{*3} | 2 μl | |
| Mighty Taq HS DNA Polymerase (High Sensitivity) (5 U/μl) | 0.25 μl | |
| 灭菌水 | up to 25 μl | |

2. 开始Real Time PCR反应。

PCR反应管用离心机轻轻离心后放入Real Time PCR Detection System中进行PCR反应。

建议采用下面的Shuttle PCR标准操作流程进行PCR反应。

首先尝试使用下面的操作流程，必要时进行PCR反应条件的优化。

有关PCR的具体反应条件请参照「Real Time PCR反应条件概述」。

Shuttle PCR扩增标准程序

Stage 1: 预变性

Cycle: 1

95°C 30 sec

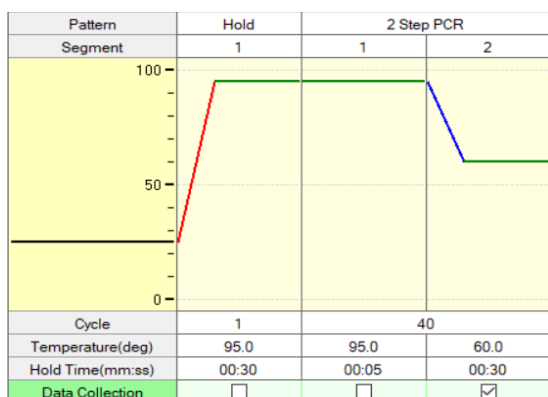
Stage 2: 2 step PCR反应

Cycle: 40

95°C 5 sec

60°C 30 sec

实例：使用Thermal Cycler Dice Real Time System (Code No. TP1000/TP950/TP900/TP700) 操作流程



Shuttle PCR扩增标准程序

Hold: 预变性

Cycle: 1

95°C 30 sec

2 step PCR

Cycle: 40

95°C 5 sec

60°C 30 sec

3. 反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线，进行PCR定量时制作标准曲线。

分析方法参见Real Time PCR各仪器的使用说明书。

*1~*3: 请参考「Real Time PCR反应条件概述」

【使用Applied Biosystems QuantStudio5 Real-Time PCR System时的操作方法】

注意：请按照Real Time PCR仪器的使用说明书进行操作。为减少仪器孔间产生的荧光信号误差，反应体系中需要添加ROX Reference Dye进行校正。

1. 按照下列组分配制PCR反应液（反应液配制请在冰上进行）。

<反应体系>

| 试剂 | 使用量 | 终浓度 |
|--|-------------|---------------------|
| 2X Mighty Taq HS Buffer (Mg ²⁺ plus) (High Sensitivity) | 12.5 μl | 1 x |
| PCR Forward Primer (10 μM) | 0.5 μl | 0.2 μM ¹ |
| PCR Reverse Primer (10 μM) | 0.5 μl | 0.2 μM ¹ |
| Probe ^{*2} | 1 μl | |
| ROX Reference Dye II (50X) | 0.25 μl | 0.5X |
| Template ^{*3} | 2 μl | |
| Mighty Taq HS DNA Polymerase (High Sensitivity) (5 U/μl) | 0.25 μl | |
| 灭菌水 | up to 25 μl | |

2. 开始Real Time PCR反应。

PCR反应管请用离心机轻轻离心后放入Real Time PCR Detection System中进行PCR反应。

建议采用下面的Shuttle PCR标准操作流程进行PCR反应。

首先尝试使用下面的操作流程，必要时进行PCR反应条件的优化。

有关PCR的具体反应条件请参照「Real Time PCR反应条件概述」。

<QuantStudio5 Real-Time PCR System>

Shuttle PCR标准操作流程

Stage 1: 预变性

Cycle: 1

95°C 30 sec

Stage 2: 2 step PCR反应

Cycle: 40

95°C 5 sec

60°C 30 sec

3. 反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线，进行PCR定量时制作标准曲线。

分析方法参见Real Time PCR仪器的使用说明书。

*1~*3: 请参考「Real Time PCR反应条件概述」

<Real Time PCR反应条件概述>

| 阶段 | 温度 | 时间 | 检测 | 备注 |
|-----|------|--------|-----|--|
| 预变性 | 95°C | 30 sec | OFF | 通常情况下，预变性95°C、30 sec即可，即使是环装质粒或基因组DNA等难以变性的模板，大部分在95°C、30 sec条件下都可以进行良好的PCR反应。也可以依据模板情况适当延长变性时间至95°C、1-2 min，但变性时间过长可能会导致酶失活，所以不建议超过2 min。 |

Shuttle PCR (二步法PCR)

循环数: 30-45 cycles

| 阶段 | 温度 | 时间 | 检测 | 备注 |
|-------|---------|-----------|-----|---|
| 变性 | 95°C | 3-5 sec | OFF | 因一般Real Time PCR的目的片段长度低于300 bp，95°C、3-5 sec即可。 |
| 退火/延伸 | 56-64°C | 10-30 sec | ON | 优化反应条件时，在56-64°C范围内调整。如果反应效果不好，适当延长反应时间可以得到改善。 |

*1: 通常引物终浓度为0.2 μM可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在0.1-1.0 μM范围内调整引物浓度。

*2: 使用的探针浓度，根据使用的Real Time PCR扩增仪及探针的荧光标记物不同而不同。

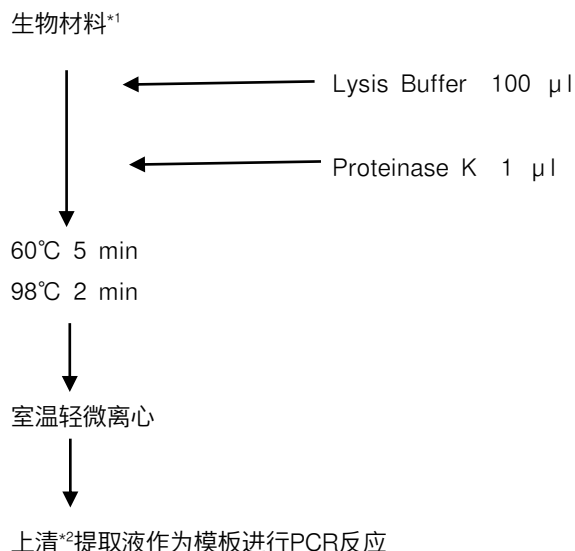
请参照仪器说明书或荧光探针的具体使用要求进行。使用Thermal Cycler Dice Real Time System III (//和Lite: 终卖)时，通常探针终浓度在0.1-0.5 μM范围内进行调整。

*3: 模板添加量因模板溶液中存在的靶基因的拷贝数不同而不同，进行梯度稀释研讨适当的模板添加量。在20 μl反应体系中，模板DNA添加量最好在100 ng以下。以RT-PCR反应的cDNA (RT反应液)为模板时，添加量不要超过PCR反应液总体积的10%。

<生物材料模板制备>

使用生物材料等提取液进行PCR时，按照以下方法配制提取液。

【Lysis Buffer for PCR (Code No. 9170) 提取方法】



*1: 生物材料种类和标准量

| 分类 | 种类 | 标准量 |
|------|----------|--------------------|
| 动物组织 | 小鼠尾 | ≤2 mm (尖端) |
| | 牛肉 | 10 mg (肌肉组织) |
| | 猪肉 | 10 mg (肌肉组织) |
| 动物血液 | 猪血(加抗凝剂) | 10 μl |
| 植物组织 | 番茄叶 | ≤5 mm ² |
| | 玉米叶 | ≤5 mm ² |
| | 小麦叶 | ≤5 mm ² |
| 微生物 | 土壤*3 | 1 mg |

*2: 通常取量≤2.5 μl (添加量不要超过PCR反应液总体积的10%)；需要保存时，请将上清转移到新Tube中，于-20℃保存。用于PCR反应前，室温下充分融解，确认没有沉淀再作为模板使用。

*3: 为获得更好反应效果，1 mg土壤建议先使用20 μl灭菌水进行初溶解（必要时可以扩大土壤称重量和灭菌水加入量），再取20 μl土壤水溶液进行9170提取。

<推荐酶添加范围>

当使用推荐的最低酶量进行PCR反应、扩增效果不理想时，可以提高酶的添加量。

| 模板种类 | | 推荐最低酶添加量 |
|-------|--------------------|----------|
| 化学阻害物 | SDS、腐殖酸、高铁血红素 | 1.25 U |
| 动物组织 | 小鼠尾、牛肉、猪肉 | 1.25 U |
| 动物血液 | 抗凝猪血（柠檬酸钠、肝素、EDTA） | 2.5 U |
| 植物组织 | 番茄叶、玉米叶、小麦叶 | 1.25 U |
| 微生物 | 土壤 | 1.25 U |

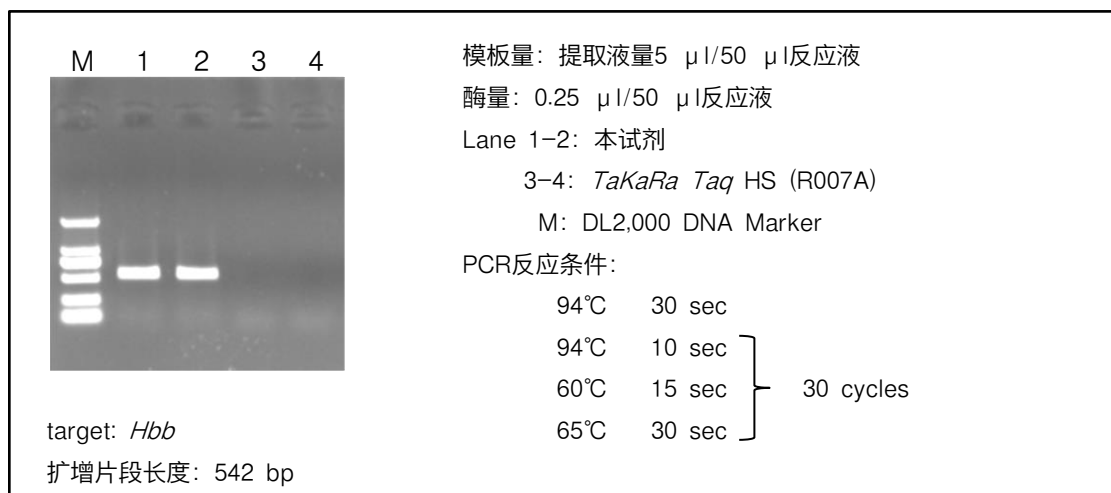
<实验例>

粗提样品扩增实验例

本制品对化学物质耐阻害性强，可对多种粗提样品（如血液、抗凝血、动物组织、植物组织、土壤等）进行良好的扩增。较同类产品 *TaKaRa Taq Hot Start Version* (Code No. R007A) 的抗阻害效果明显提升。

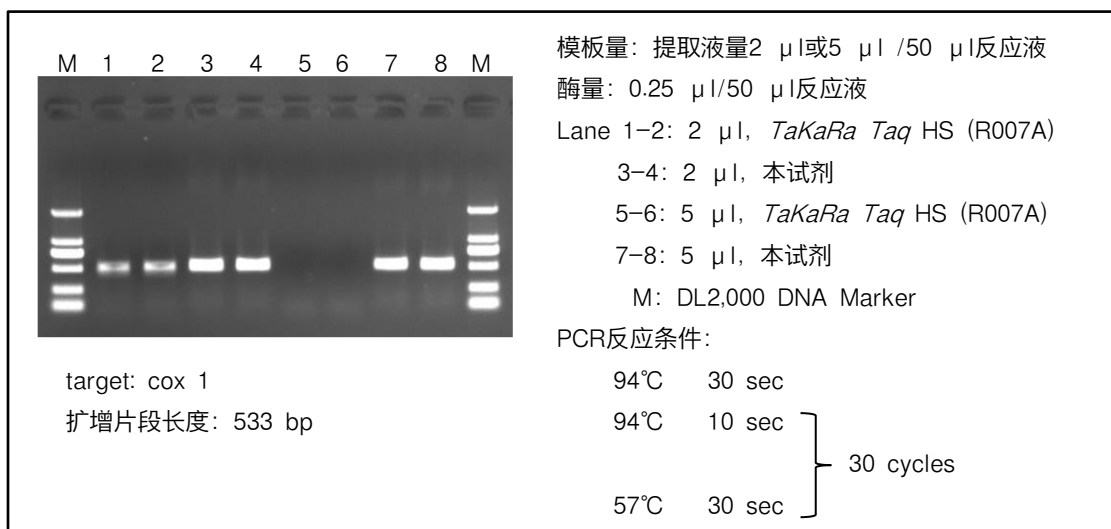
1) 小鼠尾的DNA提取及PCR扩增

取约1 mm小鼠尾的前端，用Lysis Buffer for PCR (Code No. 9170)进行DNA提取。取部分离心后的上清液进行50 μ l PCR反应。按照推荐的反应条件进行小鼠*Hbb*基因的PCR扩增（约542 bp），获得了良好的扩增结果。同类产品 *TaKaRa Taq Hot Start Version* (Code No. R007A) 扩增效果不好。



2) 番茄叶的DNA提取及PCR扩增

取直径2 mm的番茄叶，用Lysis Buffer for PCR (Code No. 9170)进行DNA提取。取部分离心后的上清液进行50 μ l PCR反应。按照推荐的反应条件进行*cox1*基因的PCR扩增（533 bp），获得了良好的扩增结果。同类产品 *TaKaRa Taq Hot Start Version* (Code No. R007A) 扩增效果不好：添加2 μ l提取液时，扩增性能弱于本试剂；添加5 μ l提取液时，没有扩增。



3) 动物组织DNA提取及PCR扩增

取10 mg猪肉，用Lysis Buffer for PCR (Code No. 9170)进行DNA提取。取部分离心后的上清液进行25 μ l qPCR反应。按照推荐的反应条件进行cox 1基因的PCR扩增，获得了良好的扩增结果。同类产品 *TaKaRa Taq* Hot Start Version (Code No. R007A) 扩增效果不好。

Target Gene: cox 1

模板量: 提取液量2 μ l/25 μ l反应液

PCR反应条件: Stage 1: 预变性

Cycle: 1

95°C 10 sec

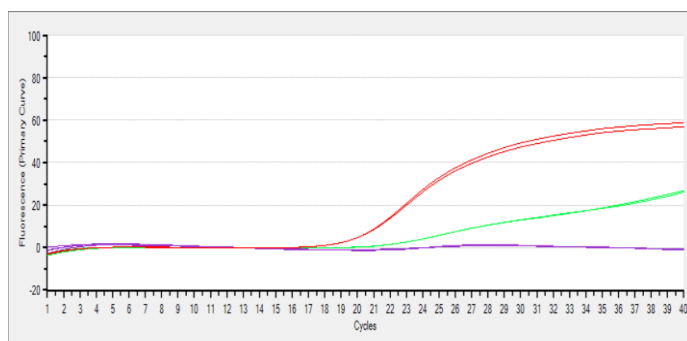
Stage 2: 2 step PCR反应

Cycle: 40

95°C 5 sec

60°C 10 sec

结果:



— 本产品的扩增结果

— *TaKaRa Taq* HS (Code No. R007A)的扩增结果

4) 植物组织DNA提取及PCR扩增

取约5 mm²大小的玉米叶片，用Lysis Buffer for PCR (Code No. 9170)进行DNA提取。取部分离心后的上清液进行25 μ l qPCR反应。按照推荐的反应条件进行HMG基因的PCR扩增，获得了良好的扩增结果。同类品 *TaKaRa Taq* Hot Start Version (Code No. R007A) 扩增效果不好。

Target Gene: HMG

模板量: 提取液量5 μ l/25 μ l反应液

PCR反应条件:

Stage 1: 预变性

Cycle: 1

95°C 10 sec

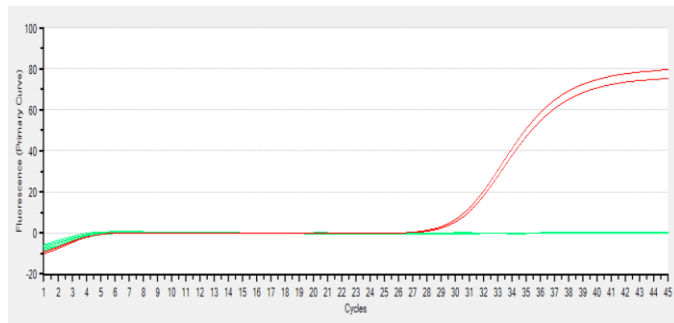
Stage 2: 2 step PCR反应

Cycle: 45

95°C 5 sec

60°C 10 sec

结果:



— 本产品的扩增结果

— TaKaRa Taq HS (Code No. R007A)的扩增结果

● 关联产品

PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037Q/A/B)

PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Code No. RR047Q/A/B)

PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036Q/A/B)

PrimeScript™ FAST RT reagent Kit with gDNA Eraser (Code No. RR092A/RR092S)

Lysis Buffer for PCR (Code No. 9170)

Thermal Cycler Dice™ Real Time System IV (Code No. TP1000)

Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)

CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (Code No. 640231/640232)

CronoSTAR™ Portable Real-Time PCR System (Code No. 640245/640247/640249)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Touch (Code No. TP350)

Clontech PCR Thermal Cycler GP (Code No. WN400)

PrimeScript, *TaKaRa Taq*, Thermal Cycler Dice, and CronoSTAR are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

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。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日生物技术（北京）有限公司制作，最新版本文件请参考 Takara Bio（中国）网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

V202310Da