

2 × EpiArt™ HS Taq Master Mix

EM201/EM202

Version 9.2



Vazyme biotech co., Ltd.

产品概述

本产品包含EpiArt™ HS Taq DNA Polymerase、dNTP以及优化的缓冲体系，适用于亚硫酸氢盐转化处理DNA的PCR反应。相比于普通DNA，亚硫酸氢盐转化后的DNA损伤严重，会影响PCR反应性能。本产品使用酶工程学改造后的热启动EpiArt™ HS Taq DNA Polymerase，配合优化的缓冲体系，相比普通PCR试剂，对亚硫酸氢盐转化后的DNA有更优的扩增效率、灵敏度和特异性。预先配制的2 × Master Mix用于PCR反应时只需加入引物和模板即可进行扩增，减少了移液操作，提高了检测通量和结果的重现性。EM202含有蓝色染料，可在反应结束后直接进行电泳，使用方便。本产品可与EpiArt™ DNA Methylation Bisulfite Kit (Vazyme #EM101)配套使用，PCR产物的3'端带A，可直接克隆至T载体，并适用于ClonExpress®快速克隆试剂盒(Vazyme #C112/C113/C115)以及5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit(Vazyme #C601)。

产品组分

组 分	EM201-01	EM201-02	EM201-03
2 × EpiArt HS Taq Master Mix	1 ml	5 × 1 ml	15 × 1 ml

组 分	EM202-01	EM202-02	EM202-03
2 × EpiArt HS Taq Master Mix (Dye Plus)	1 ml	5 × 1 ml	15 × 1 ml

保存条件

-30 ~ -15°C 储存，可于-20 ~ 0°C 运输。

质量控制

核酸外切酶残留检测：20 μl本品与50 pmol单链DNA底物和双链DNA底物在37°C下孵育16 h，经变性PAGE电泳，DNA的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测：20 μl本品和0.3 μg pBR322 DNA在37°C下孵育4 h，经琼脂糖凝胶电泳，质粒的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌DNA残留检测：20 μl本品中残留的核酸经*E.coli* gDNA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，分别以经亚硫酸氢盐转化后的人基因组DNA为模板，扩增长度为200 bp和500 bp的2个不同目的片段。35个循环后取1/10 PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳，EB染色，可见有单一的目的条带。

实验流程

反应体系

ddH ₂ O	To 50 μl
2 × EpiArt HS Taq Master Mix	25 μl
Primer1 (10 μM)	2 μl
Primer2 (10 μM)	2 μl
Template DNA*	X μl

*亚硫酸氢盐转化产物，每个反应0.5 - 200 ng。

反应程序

95°C	5 min (预变性)	} 30 - 45 cycles
95°C	30 sec	
60°C ^a	30 sec	
72°C	30 sec / 60 sec ^b	
72°C	5 - 10 min (彻底延伸)	

a. 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。

b. 扩增片段≤ 500 bp时，选择30 sec延伸；扩增片段500 - 1000 bp时，选择60 sec延伸；扩增片段 > 1000 bp时，选择60 sec/kb延伸。

注意事项

引物设计

1. 对于亚硫酸氢盐转化后的DNA模板，引物设计需根据转化后产物序列来设计，即未甲基化的C在转化后应为U，设计引物时视为T；推荐使用引物设计程序设计，如MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>)；
2. 亚硫酸氢盐转化后的正义链和反义链不互补，设计引物时需注意与一般DNA设计引物不同；
3. 引物长度在20 - 40 nt之间；建议扩增产物不超过600 bp；
4. 引物3'端应避免出现发夹结构；
5. 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)；
6. 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；
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。

常见问题及解决方案

	无产物或产物量少	有杂带或弥散条带
引物	检查和优化引物设计	优化引物设计
引物浓度	适当提高引物浓度	降低引物浓度至终浓度为0.2 μM
退火温度	设置退火温度梯度，找到合适的退火温度	尝试提高退火温度，可间隔2°C设置温度至65°C
延伸时间	适当增加延伸时间	有大于目标条带的杂带时可以减少延伸时间
反应条件	适当提高Mg ²⁺ 浓度(终浓度0.5 - 1 mM)或降低dNTP浓度(终浓度0.05 - 0.1 mM)	适当降低Mg ²⁺ 浓度(终浓度0.5 - 1 mM)或提高dNTP浓度(终浓度0.05 - 0.1 mM)
循环数	增加循环数至40 - 45个循环	减少循环数至30 - 35个循环
模板纯度	使用高质量模板，避免反复冻融	使用高质量模板，避免反复冻融
模板使用量	样品使用量参照反应体系推荐量并适量增加	样品使用量参照反应体系推荐量调整



ISO 9001: 2015