

Version 1

Cat No. AG11514

2X L-Exp Taq HS PCR 预混液

2X L-Exp Taq HS PCR Master Mix

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。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

本品为即用型 *L-Exp Taq* Enzyme PCR 反应 2 倍浓度的预混液，包含 *L-Exp Taq* HS DNA Polymerase、dNTPs 以及优化的 Buffer 体系，进行 PCR 反应时，只需向预混液中加入模板、引物和水即可进行扩增。这种预混液方案操作简便，可最大限度的减少人为误差，减少多步操作可能带来的污染，在较短时间内即可获得检测结果。

其中的 *L-Exp Taq* enzyme 是利用 LA PCR 原理，精心优化得到的 DNA PCR 反应体系，非常适合长片段和较复杂 DNA 序列的 PCR 扩增。同时在酶体系中还混合了 Taq 单克隆抗体，可以进行 Hot Start PCR。反应开始前抗体会与 Taq 酶结合并抑制其活性，从而可以抑制低温条件下引物非特异性退火或者引物二聚体引起的非特异性扩增。当 PCR 反应开始后，抗体会在最初的 DNA 变性步骤中失活，因此在常规 PCR 反应条件下即可使用。使用本品得到的大部分 PCR 产物 3' 端带有一个 A 碱基，可直接克隆于 T 载体。

➤ 产品组成

组分名称	AG11514 (60 rxns / 50 μ l)
2X <i>L-Exp Taq</i> HS PCR Master Mix	500 μ l X 3 pc
RNase free water	1 ml X 2 pc

➤ 保存

保存温度：-20°C

运输温度：干冰或者-20°C冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本制品为 2X 的预混液，只需向预混液中加入模板、引物和水即可进行扩增，操作简便，可最大限度的减少人为误差，减少多步操作可能带来的污染，在较短时间内即可获得检测结果。
2. 本制品具有非常强的长片段扩增性能，以 Human 基因组 DNA 为模板可扩增 ~24 kb 的 DNA 片段。
3. 本制品具有扩增复杂模板的能力，对于难以扩增的较高 GC 含量模板 (~75%)，扩增成功率高。
4. 本品中添加了能够抑制 DNA polymerase 活性的单克隆抗体，可以进行热启动反应。在进行 PCR 反应前，抗体与酶结合抑制 DNA 聚合酶的活性，有效抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。

➤ 实验原理

PCR 扩增原理

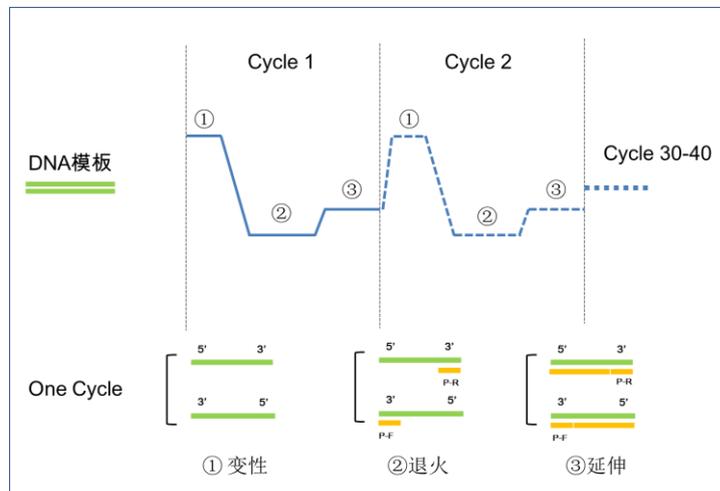
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

扩增详情如下，一般将步骤①②③称为一个循环，每次进行 DNA 扩增时以此循环 30-40 次。进行 PCR 扩增时，可根据引物的不同调整退火温度，进而获得最优 PCR 扩增反应条件。

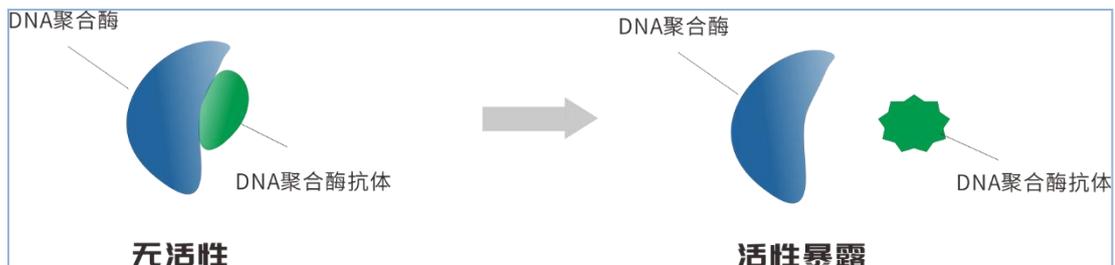
步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

步骤②：引物与单链 DNA 进行退火；

步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下进行延伸，与单链 DNA 形成互补链。



Hot Start PCR 是一种特异性较高的 PCR 扩增方法。相较于普通 PCR，添加了能够抑制 DNA 聚合酶活性的单克隆抗体，抗体在高温加热前与 DNA 聚合酶特异性结合，抑制 DNA 聚合酶的活性，从而可以有效抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。在反应开始时，抗体会在最初的 DNA 变性步骤中失活；DNA 聚合酶活性恢复，进行正常的 PCR 反应。



➤ 使用注意事项

- 1) 2X *L-Exp Taq* HS PCR Master Mix 使用前先离心，将所有的溶液收集至离心管底部，然后再进行使用，减少损失；使用时应轻柔混匀（避免起泡），缓慢吸取。
- 2) 反应体系建议在冰上配制，以减少配制反应液过程中的非特异性扩增。
- 3) 本制品避免反复冻融，以免降低酶活性。

➤ 实验前准备

- 1) **试剂 & 耗材：**
Primer、DNA 模板、PCR 管、枪头、冰浴或冰盒。
- 2) **仪器：**
PCR 仪、移液器、旋涡振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪。

➤ 操作方法

1) 配制 PCR 反应液

首先按照下表配制 PCR 反应液，反应体系建议在冰上配制。

组分名称	反应终浓度	50 μ l 体系
2X <i>L-Exp Taq</i> HS PCR Master Mix	1X	25 μ l
Template	$\leq 500 \text{ ng}^{-1}$	-
Primer F (10 μ M)	0.2 μ M ²	1 μ l
Primer R (10 μ M)	0.2 μ M ²	1 μ l
RNase free water	-	Up to 50 μ l

*1: 模板用量一般 $\leq 500 \text{ ng}$ ；同时，可根据实际需要调整模板用量；

*2: 引物通常使用终浓度为 0.2 μ M；同时，可根据实际需要 0.2 - 1.0 μ M 范围内调整。

2) 反应条件（以三步法扩增 1 kb DNA 片段为例⁷）

将加好样的 Tube 放置于 PCR 仪中，然后按照下表条件进行 PCR 反应：

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	1 min ³	1
变性	98°C	10 sec ⁴	} 25~35
退火	55°C	30 sec ⁵	
延伸	72°C	1 min / kb ⁶	
最终延伸	72°C	2 min	1

- *3: 一般建议将预变性设置为 94°C 30 sec~1 min; 对于复杂模板, 如高 GC 或者长片段, 可尝试延长预变性时间。
- *4: 变性条件的设定可根据设备进行调整, 一般 98°C 5~20 sec 或 94°C 30 sec。
- *5: 退火温度主要取决于上下游引物的 T_m 值, 通常可按照 T_m ± 5°C 设定。
- *6: 延伸温度一般设定为 72°C, 延伸速度 1 min / kb; 同时, 可在 30 sec / kb ~1 min / kb 范围内进行调整。
- *7: 当引物 T_m 值较高或三步法 PCR 扩增结果不好时, 可尝试两步法 PCR 扩增 (两步法 PCR 反应程序可参考附录)。

3) 结果检测

反应结束后, 取适量反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

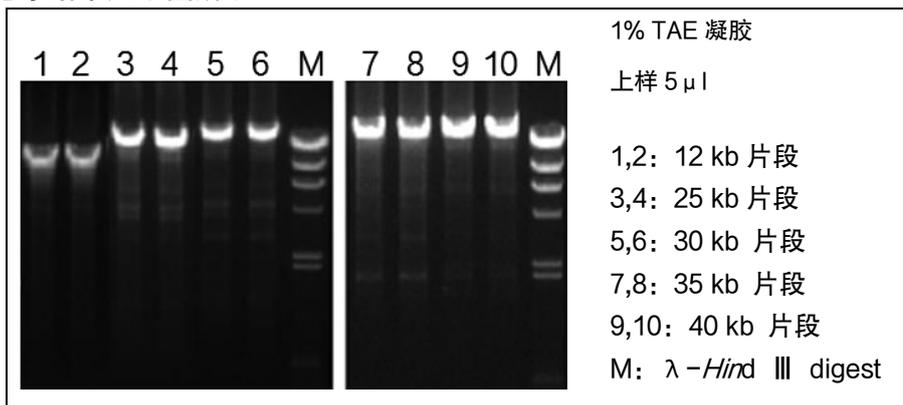
➤ 实验例

- 以 λ DNA 为模板, 采用本试剂盒扩增不同长度的 DNA 片段, 能很好地扩增出 40 kb 的 DNA 片段。

反应程序如下:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	5 sec	} 30
68°C	15 min	
72°C	10 min	1

电泳结果如下图所示:



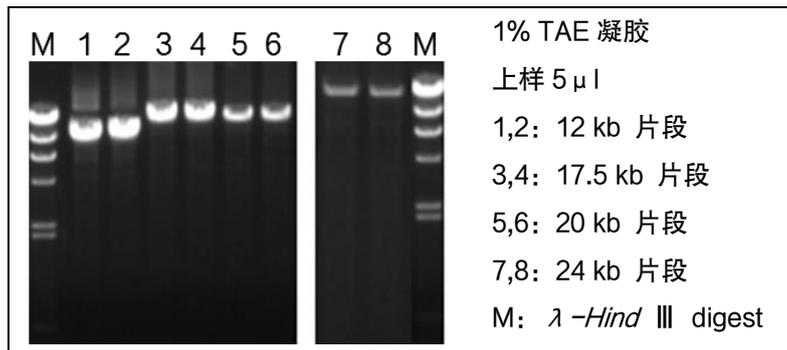
- 以 Human 的 gDNA 为模板, 采用本试剂盒扩增不同长度的 DNA 片段, 能很好地扩增出 24 kb 的 DNA 片段。

反应程序如下：

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	20 sec	} 30
68°C	1 min / kb	
72°C	10 min	1

*: 12 kb 延伸时间为 12 min; 17.5 kb 延伸时间为 17 min; 20 kb 延伸时间为 20 min;
24 kb 延伸时间为 24 min;

电泳结果如下：



➤ 产品注意事项

1. 合适的模板

- ❖ 模板加入量降低时，扩增效率降低，产物量减少，扩增特异性升高；模板加入量升高时，扩增效率升高，扩增特异性降低；可根据实际情况调整模板加入量。
- ❖ 模板的纯度及完整性严重影响 PCR 反应，采用高质量高纯度的 DNA 模板，可提高 PCR 反应的成功率，降低外源污染。模板不纯、降解或模板中含有抑制 PCR 反应的物质等，都可能会导致 PCR 反应扩增效率降低，PCR 反应产物产量减少。建议更换模板，重新实验。

2. 合适的引物

- ❖ 合适的引物浓度为 0.2 ~ 1.0 μM。
- ❖ 引物浓度降低：可能会导致反应效率降低。可尝试提高 PCR 扩增引物反应浓度。
- ❖ 引物浓度升高：导致反应特异性不好，可适当降低引物浓度。
- ❖ 引物完整性不好：可能会导致无扩增，可通过 PAGE 电泳确认引物的完整性，如引物有降解，建议更换引物。
- ❖ 引物设计的原则：
 - ① 引物一般是 15-30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40 - 60 %之间。
 - ② 建议正反向引物 Tm 值在 50-70°C，两引物 Tm 值相差不超过 5°C。

- ③ 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。
- ④ 引物 3' 端避免出现发夹结构。
- ⑤ 减少引物之间的互补序列，一般不要超过 4 个碱基连续互补序列。

3. 合适的变性温度及时间

变性时间过长或温度过高，可能导致非特异性扩增、DNA 聚合酶活性降低等问题发生；变性时间过短或温度过低，可能导致扩增效率低，电泳条带弥散。

- ❖ 简单模板 PCR，进行 94°C，30 秒的预变性。
- ❖ 困难模板的 PCR，如 GC-rich 序列，建议在 94°C 下进行 1-5 分钟的预变性。
- ❖ 菌落 PCR，建议在 94°C 下进行 1-5 分钟的预变性。
- ❖ 变性温度一般推荐 98°C，5~20 sec 或 94°C，30 sec。

4. 合适的退火温度及时间

- ❖ 退火温度越高，引物特异性越高，但一定程度上扩增效率会降低。
- ❖ 退火温度过低，可能导致反应特异性不好，出现引物二聚体。可适当提高退火温度。

5. 扩增循环数

- ❖ 扩增循环数取决于模板的初始拷贝数。如果模板的初始拷贝数少于 10 个，则需要大约 40 个循环。对于初始拷贝数较高的模板，一般推荐 25-35 个循环。

6. 防止污染措施

- ❖ 配制反应液与添加 DNA 模板的区域建议分开，避免交叉污染。
- ❖ 每次实验可设置不添加模板的阴性对照，以检查是否存在污染。

➤ 附录：两步法 PCR 反应程序

两步法 PCR 程序：

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	1 min	1
变性	98°C	10 sec	} 25~35
延伸	68°C	1 min / kb	
最终延伸	72°C	2 min	1