

Version 3

Cat No. AG12205

ApexDirect DNA 聚合酶

ApexDirect DNA Polymerase

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

ApexDirect DNA Polymerase 是一种反应性能高的 DNA 聚合酶，具有极强的扩增性能及广泛的模板适用性，可用于常规 PCR 扩增。同时该制品对抑制剂有很好的抵抗力，特别适合对血液、动植物组织等样品直接进行 PCR 反应。对于高 GC 含量、高 AT 含量及低起始量的模板都能进行有效的扩增。

➤ 产品组成

组分名称	AG12205 (100 rxns / 50 μ l)
<i>ApexDirect</i> DNA Polymerase (1 U / μ l)	100 μ l
2X <i>ApexDirect</i> Buffer (Mg^{2+} and dNTP plus) *	1.25 ml $\times$ 2 pcs

*: *ApexDirect* Buffer (Mg^{2+} and dNTP plus) 中的 Mg^{2+} 浓度为 4 mM，dNTP 浓度各 800 μ M。

➤ 保存

保存温度：-20℃

运输温度：干冰运输或者-20℃冰袋运输

➤ 活性定义

在 74℃、30 分钟内，以活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物，将 10 nmol 脱氧核苷酸摄入到酸不溶物质所需的酶活性定义为 1 个活性单位（U）。

➤ 产品优势

1. *ApexDirect* DNA Polymerase 是一种反应性能高的 DNA 聚合酶，具有极强的扩增性能及广泛的模板适用性。
2. 该制品对抑制剂有很好的抵抗力，特别适合对血液及动植物组织等直接进行 PCR 反应。
3. 优化的反应体系，对复杂模板的 PCR 扩增具有良好的适应性，对于高 GC 含量、高 AT 含量及低起始量的模板都能进行有效的扩增。

➤ 实验原理

PCR 扩增原理

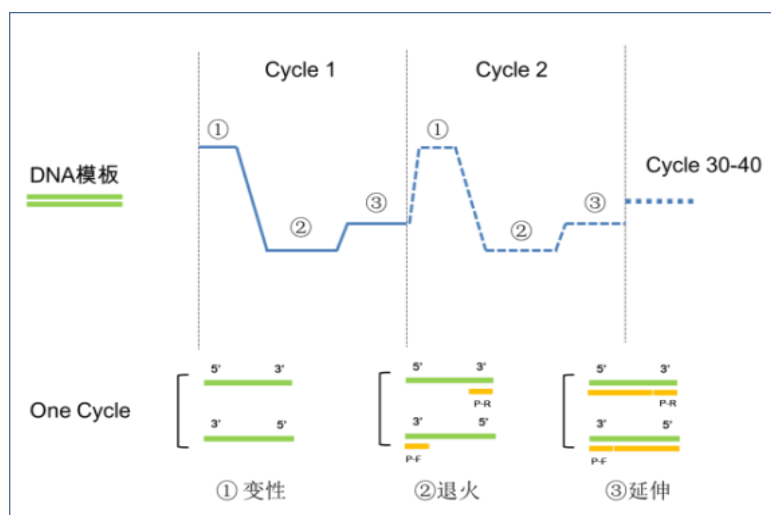
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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 退火；

步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下延伸，与单链 DNA 形成互补链；



➤ 使用注意事项

- 1) *ApexDirect* DNA Polymerase 使用前先离心，将所有的酶液收集至离心管底部，然后再进行使用，减少损失；酶保存液中甘油浓度较高，使用时应轻柔混匀（避免起泡），缓慢吸取。
- 2) 本产品各组分需要在-20℃保存，使用前于冰上溶解后，轻柔混匀并离心后再进行使用。

➤ 实验前准备

1) 试剂 & 耗材：

Primer、DNA 模板、PCR 管、枪头。

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

首先按照下表所示在冰上配制 PCR 反应液：

组分名称	反应终浓度	50 μ l 体系
<i>ApexDirect</i> DNA Polymerase (1 U / μ l) ^{*1}	1 U	1 μ l
2X <i>ApexDirect</i> Buffer (Mg ²⁺ and dNTP plus)	1 X	25 μ l
Template	$\leq$ 500 ng ^{*2}	–
Primer F (10 μ M)	0.3 μ M ^{*3}	1.5 μ l
Primer R (10 μ M)	0.3 μ M ^{*3}	1.5 μ l
RNase free water	–	Up to 50 μ l

*1: *ApexDirect* DNA Polymerase 使用前先离心，将所有的酶液收集至离心管底部，然后再进行使用，减少损失；酶保存液中甘油浓度较高，使用时应轻柔混匀（避免起泡），缓慢吸取。

*2: 通常情况下模板量不高于 500 ng，可获得很好的扩增效果。如进行直接 PCR，血液、动植物组织等样本添加量可参考附录 1。

*3: 引物通常使用终浓度为 0.3 μ M，可根据实验结果在 0.1 ~ 0.4 μ M 范围内调整。

2) 反应条件（以三步法 PCR 扩增为例^{*4}）

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	98°C	2 min ^{*1}	1
变性	98°C	10 sec ^{*2}	} 30 ~ 40
退火	60°C	15 sec	
延伸	68°C ^{*3}	1 min / kb	

*1: 对于普通模板，可省略预变性步骤；对于复杂模板（如高 GC）或血液、动植物组织等样本直接进行 PCR，建议可将预变性设置为 98°C 1 ~ 2 min。

*2: 变性条件的设定可根据设备进行调整，一般 94°C 10 ~ 15 sec，98°C 5 ~ 10 sec。

*3: 两步法 PCR 与三步法 PCR，延伸温度都可设定为 68°C。

*4: 当引物 T_m 值较高或三步法 PCR 扩增结果不好，可尝试两步法 PCR 扩增（两步法 PCR 反应程序可参考附录 2）。

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

1. 采用本试剂盒扩增 GC 含量不同的 DNA 片段，对高 GC 与高 AT 的 DNA 片段都有很好的扩增。

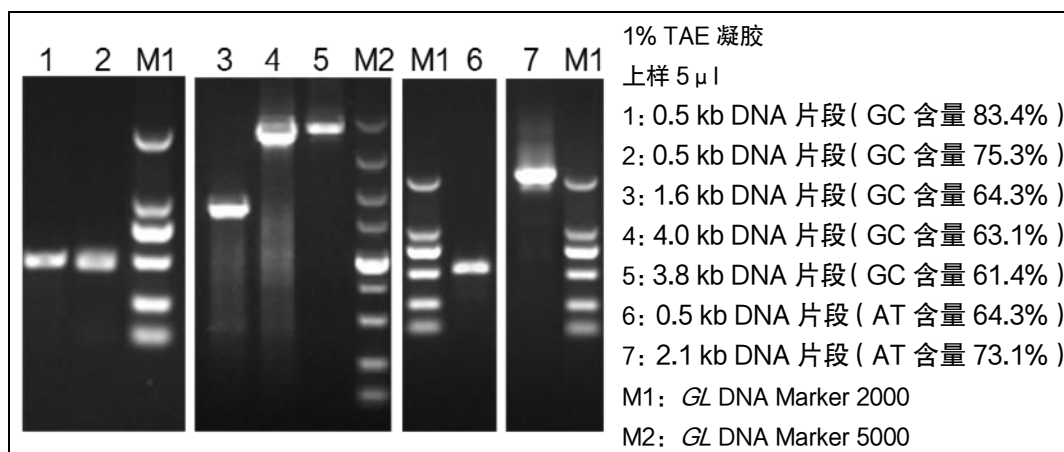
GC 含量高于 50% 的反应程序:

温度	时间	循环数
98°C	2min	1
98°C	10 sec	} 30
68°C	2 min	

AT 含量高于 50% 的反应程序:

温度	时间	循环数
98°C	2min	1
98°C	10 sec	} 30
60°C	15 sec	
68°C	2 min	

电泳结果如下图所示:

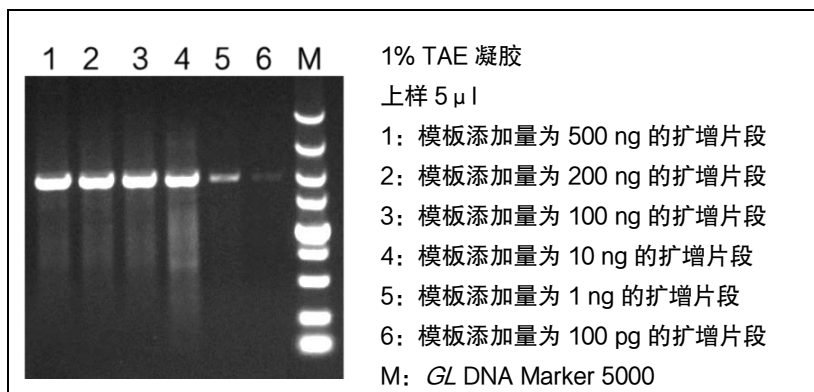


2. 以 Human gDNA 为模板，添加不同模板量 (500 ng、200 ng、100 ng、10 ng、1 ng、100 pg)，采用本试剂盒扩增 2 kb 的 DNA 片段，可扩增出 100 pg 模板量的 DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
98°C	2 min	1
98°C	10 sec	} 30
55°C	15 sec	
68°C	2 min	

电泳结果如下图所示：

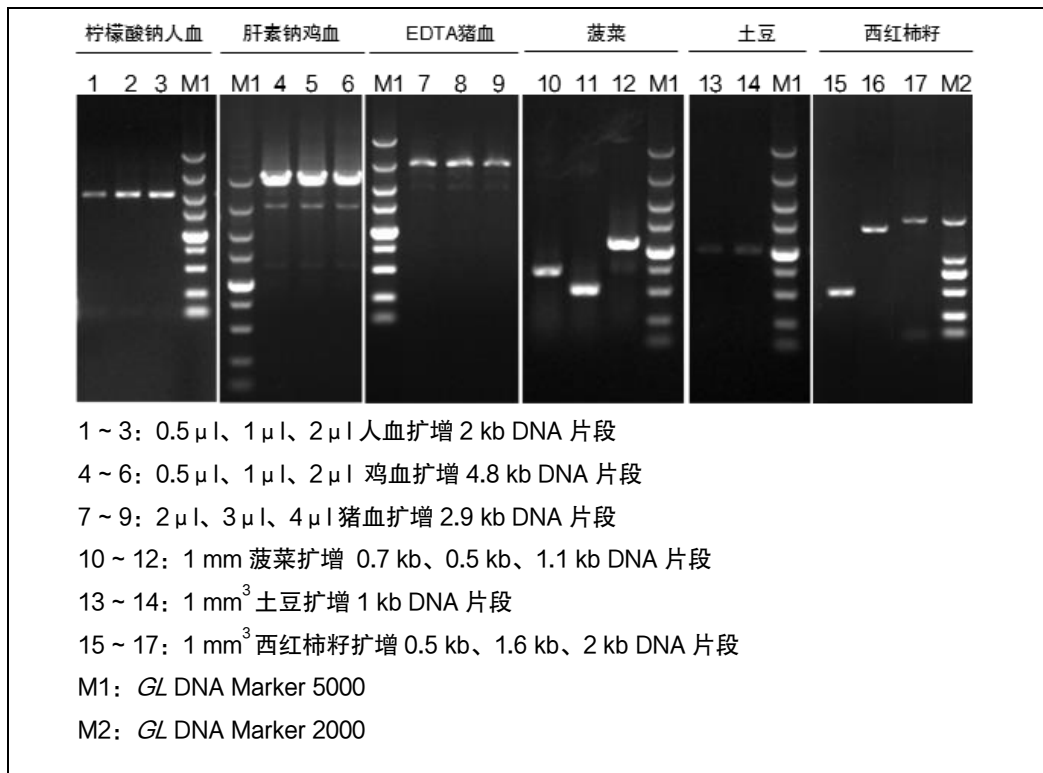


3. 采用本试剂盒对生物样本直接进行 PCR 扩增。

反应程序：

温度	时间	循环数
98℃	2 min	1
98℃	10 sec	} 30
55℃	15 sec	
68℃	1 min / kb	

电泳结果如下图所示：



➤ 产品注意事项

1. 合适的模板

- ❖ 模板加入量低时，扩增效率低，扩增特异性高；模板加入量高时，扩增效率高，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 反应扩增效率低，PCR 反应产物产量少，建议更换模板，重新实验。

2. 合适的引物

- ❖ 引物一般是 15 ~ 30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40 ~ 60% 之间。
- ❖ 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。
- ❖ 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。
- ❖ 引物 3' 端避免出现发夹结构。
- ❖ 减少引物之间的互补序列，最好不要超过 4 个碱基连续互补序列。
- ❖ 合适的引物浓度为 0.1 ~ 0.4 μM 。引物浓度降低时，扩增效率降低，反应特异性提高。引物浓度升高时，扩增效率提高，反应特异性降低。

3. DNA 聚合酶浓度

- ❖ *ApexDirect* DNA Polymerase 的酶量添加推荐浓度是 1U / 50 μl 的反应体系。酶量过多，可能会导致扩增特异性降低；酶量减少，可能会导致扩增效率降低。可根据实验结果进行调整优化。

4. Mg^{2+} 浓度

- ❖ 用 *ApexDirect* DNA Polymerase 进行 PCR 反应，较理想的 Mg^{2+} 浓度是 2.0 mM。 Mg^{2+} 浓度过低，会影响 PCR 扩增，导致 PCR 产物产量低；浓度过高，则可能会降低 PCR 的特异性。

5. dNTPs 浓度

- ❖ 本产品的反应体系中，推荐的 dNTPs 终浓度 400 μM 。
- ❖ dNTPs 浓度过高，可能会与 Mg^{2+} 结合，影响 DNA 聚合酶活性；同时，高浓度的 dNTPs 会降低扩增特异性，产生 smear 带。
- ❖ dNTPs 浓度过低，可能会降低扩增效率。

6. 合适的退火温度及时间

- ❖ 退火温度越高，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。

7. 延伸温度及时间

- ❖ *ApexDirect* DNA Polymerase 一般将延伸温度设置为 68°C 可获得很好的扩增。延伸速度推荐设置为 1 min / kb。

8. 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。

9. 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。
- ❖ 每次实验建议设置不添加模板的阴性对照，以检查是否存在污染。

10. Cool Start 法

- ❖ 本试剂盒采用 Cool Start 法进行 PCR 反应，反应液配制在冰上操作，可减少 PCR 过程中的非特异性扩增。

操作过程：

- 使用前将试剂放置于冰上融解；
- 在冰上配制反应混合液；
- 设定反应程序进行 PCR 扩增；
- 电泳检测结果。

➤ 附录 1：直接 PCR 样本添加量

样本类型	建议样本添加量
EDTA / 肝素钠 / 柠檬酸钠抗凝血液	≤ 5 μl
鼠耳	≤ 1.5 mm ²
鼠尾	≤ 1 mm
植物叶（如豆芽叶尖、菠菜叶等）	≤ 直径 2 mm
土豆	≤ 1 mm ³
西红柿籽	≤ 1 mm ³

➤ 附录 2：两步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	2 min	1
变性	98°C	10 sec	} 30 ~ 40
延伸	68°C	1 min / kb	