

*ApexHF*HS DNA 聚合酶 预混液-FS (含染料)

*ApexHF*HS DNA Polymerase FS Master Mix (dye plus)

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

本制品是 *ApexHF* HS DNA Polymerase FS 即用型的 2 倍浓度 PCR 反应预混液。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；同时本制品中还加入了电泳检测时所需的色素试剂（浅紫红色），PCR 反应完毕后可以直接进行凝胶电泳，反应液呈现紫红色。这种预混液方案操作简便，可最大限度地减少人为误差，并在较短时间内即可获得检测结果。本制品具有高扩增效率、高灵敏度、高特异性、高退火效率及延伸速度快等特点，可进行快速 PCR 反应，此外，本制品中还添加了在常温状态下能够抑制 DNA polymerase 活性的单克隆抗体，可以进行 Hot Start PCR，有效的抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。

➤ 产品组成

组分名称	AG12206 (100 rxns / 50 μ l)
2X <i>ApexHF</i> FS PCR Master Mix (dye plus)*	500 μ l X 5 pcs

*：溶液中的 Mg^{2+} 浓度为 2 mM，dNTPs 的浓度为 400 μ M。

➤ 保存

保存温度：-20°C

运输温度：干冰运输或者-20°C冰袋运输

➤ 产品优势

1. *ApexHF* HS DNA Polymerase FS 是一种高保真 DNA 聚合酶，具有高扩增效率、高灵敏度、高特异性、高退火效率及延伸速度快等特点，可提高 PCR 反应效率。
2. 本品延伸速度快，以 Human gDNA 为模板，10 sec 的延伸时间，可扩增出长达 4 kb 的 DNA 片段；
3. 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。
4. 本制品是 2X 的预混液，仅需添加模板、引物与水即可进行 PCR 扩增，操作简便，减少人为误差。
5. 体系中包含电泳指示剂，可在 PCR 反应完成后直接点样进行电泳，电泳时只有一条指示带，指示带呈现浅紫红色。

➤ 实验原理

PCR 扩增原理

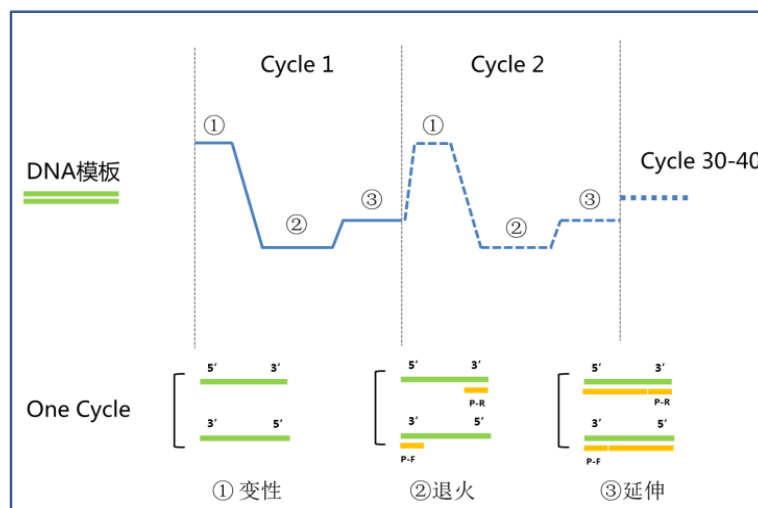
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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；

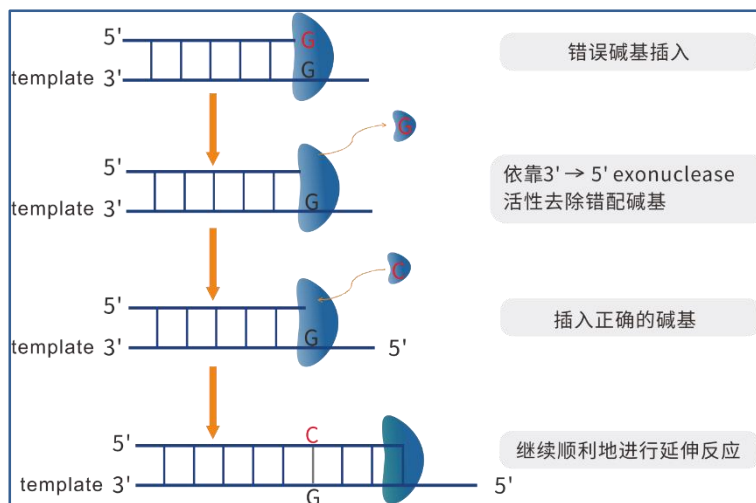
步骤②：引物与单链 DNA 退火；

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；



高保真酶原理

高保真酶具有 3' → 5' Exonuclease 活性 (Proof reading 活性)，PCR 过程中如果出现碱基错配，它能利用其外切酶活性，切除错配的碱基，从而保证了扩增的准确性。



➤ 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
2X <i>ApexHFFS</i> PCR Master Mix (dye plus) ^{*1}	1X	25 μ l
Template	≤ 200 ng ^{*2}	-
Primer F (10 μ M)	0.2 μ M ^{*3}	1 μ l
Primer R (10 μ M)	0.2 μ M ^{*3}	1 μ l
RNase free water	-	Up to 50 μ l

*1: 2X *ApexHFFS* PCR Master Mix (dye plus) 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: 通常模板添加量不高于 200 ng (以 cDNA 为模板时, 模板量相当于 Total RNA 的量)。若模板量高于 200 ng, PCR 扩增效果不好时, 可尝试延长延伸时间, 可在 5 ~ 60 sec / kb 内调整。

*3: 引物通常使用终浓度为 0.2 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^{*5})

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	30 sec ^{*1}	1
变性	98°C	10 sec ^{*2}	} 25 ~ 35
退火	55°C	5 or 15 sec ^{*3}	
延伸	72°C	5 sec / kb ^{*4}	

*1: 对于普通模板, 可省略预变性步骤; 对于复杂模板, 建议将预变性设置为 94°C 30 sec ~ 1 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: 退火时间一般推荐 5 sec 或 15 sec, 过长可能会导致 smear 带产生。T_m 值高于 55°C 时, 退火时间可设为 5 sec; T_m 值低于 55°C 时, 退火时间可设为 15 sec (可在 5 ~ 15 sec 内调整)。

*4: 延伸速度: 一般延伸速度设置为 5 sec / kb, 可获得良好的扩增结果; 若片段过长、模板复杂或模板量过多导致的扩增效果不好, 可尝试将延伸时间延长至 10 ~ 60 sec / kb。

*5: 当引物 Tm 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)。

3) 结果检测

反应结束后, 取适量反应产物直接进行琼脂糖凝胶电泳检测。

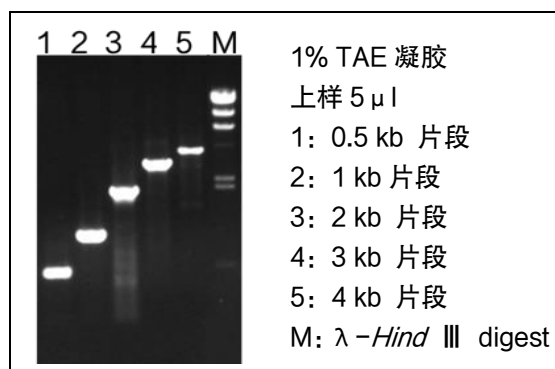
➤ 实验例

1. 以 Human gDNA 为模板, 以不同的延伸速度扩增不同长度的 DNA 片段, 以 10 sec 的延伸时间能够很好地扩增出 4 kb DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
98°C	10 sec	30
55°C	15 sec	
72°C	10 sec	

电泳结果如下图所示:

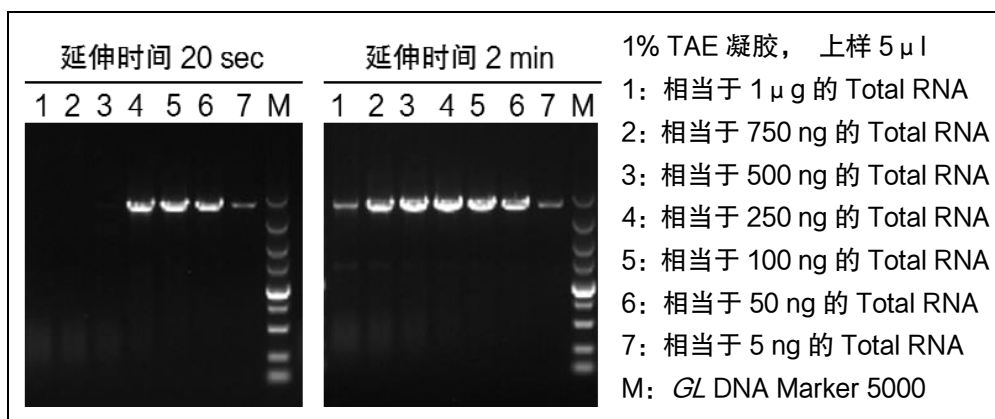


2. 以 cDNA 为模板, 添加不同模板量 (相当于 Total RNA 的量), 采用本试剂盒扩增 4 kb DNA 片段, 在进行快速扩增时 (延伸时间 20 sec), 模板量 5 ng (相当于 Total RNA 量), 可以扩增出目的片段; 当延伸时间延长, 扩增出的 DNA 量会增加, 同时, 高模板量也可以得到很好地扩增。

反应程序:

温度	时间	循环数
98°C	10 sec	30
55°C	15 sec	
72°C	20 sec / 2 min	

电泳结果如下图所示：

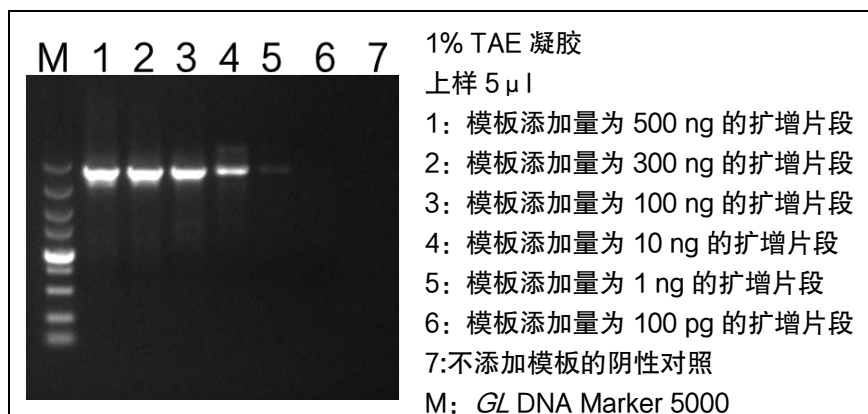


3. 以 Human gDNA 为模板，添加不同模板量 (500 ng、300 ng、100 ng、10 ng、1 ng、100 pg)，扩增 4 kb DNA 片段，模板量低至 1 ng 时，能够以 5 sec / kb 的速度扩增出目的片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
98°C	10 sec	} 30
55°C	15 sec	
72°C	20 sec	

电泳结果如下图所示：

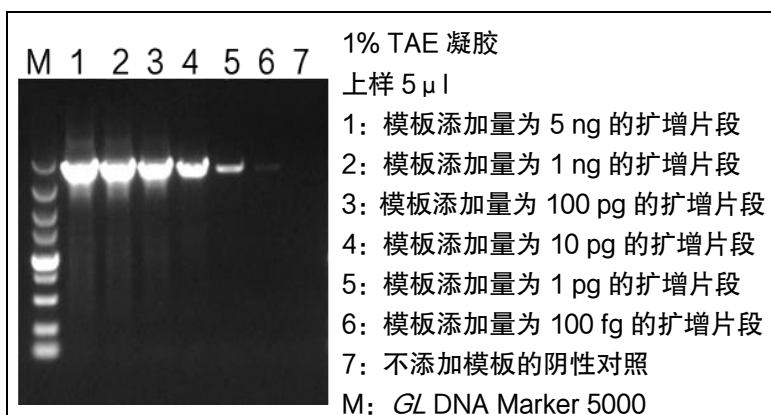


4. 以 λ DNA 为模板，添加不同模板量 (5 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg)，扩增 4 kb DNA 片段，模板量低至 100 fg 时，能够以 5 sec / kb 的速度扩增出目的片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
98°C	10 sec	30
55°C	15 sec	
72°C	20 sec	

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

- ❖ 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 T_m 值在 50 ~ 70°C, 两引物 T_m 值相差不超过 5°C。
- ❖ 引物 A、T、C、G 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。减少正反向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 μ M。引物浓度降低时, 扩增效率降低, 反应特异性升高。引物浓度升高时, 扩增效率升高, 反应特异性降低。

3. 合适的退火温度及时间

- ❖ 退火温度越高，扩增特异性越高，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，并且可能会出现引物二聚体。

4. 延伸温度及时间

- ❖ 一般将延伸温度设置为 72°C 可获得很好的扩增。通常延伸速度设置为 5 sec / kb，可获得良好的扩增结果；若片段过长、模板复杂或模板量过多导致的扩增效果不好，可尝试将延伸时间延长至 10 ~ 60 sec / kb。

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：

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	30 sec	1
变性	98°C	10 sec	} 25 ~ 35
延伸	68°C	5 sec / kb	