

Version 2

Cat No. AG12207

ApexHF HS DNA 聚合酶预混液-FL

ApexHF HS DNA Polymerase FL 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

本制品是 *ApexHF* HS DNA Polymerase FL 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。这种预混液方案操作简便, 可最大限度地减少人为误差, 在较短时间内即可获得检测结果。本制品非常适合长片段的扩增, 以 Human gDNA 为模板, 可扩增长达 30 kb 的 DNA 片段; 同时, 具有保真性高、扩增效率高、退火效率高及延伸速度快等特点。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	AG12207 (100 rxns / 50 μ l)
2X <i>ApexHF</i> FL PCR Master Mix*	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: $-20^{\circ}C$

运输温度: 干冰或者 $-20^{\circ}C$ 冰袋运输

➤ 产品优势

1. *ApexHF* HS DNA Polymerase FL 是一种高保真 DNA 聚合酶, 具有扩增效率高、退火效率高及延伸速度快等特点, 提高 PCR 反应效率;
2. 本制品非常适合长片段扩增, 以 λ DNA 为模板, 可扩增长达 40 kb 的 DNA 片段; 以 Human gDNA 为模板, 可扩增长达约 30 kb 的 DNA 片段。
3. 适合复杂结构的 DNA 片段扩增, 如高 GC 的 DNA 片段。
4. 本品中添加了能够抑制 DNA 聚合酶活性的单克隆抗体, 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。
5. 模板的适用性广, 可以进行以 cDNA 为模板的高效 PCR 反应。
6. 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。

➤ 实验原理

PCR 扩增原理

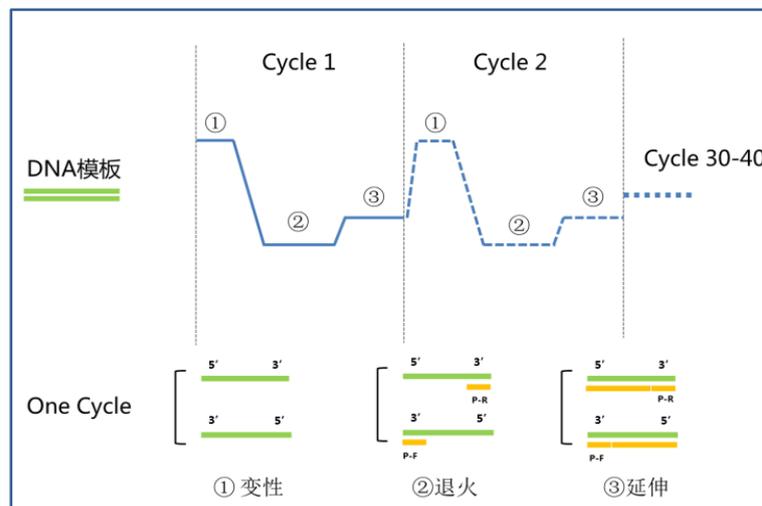
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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；

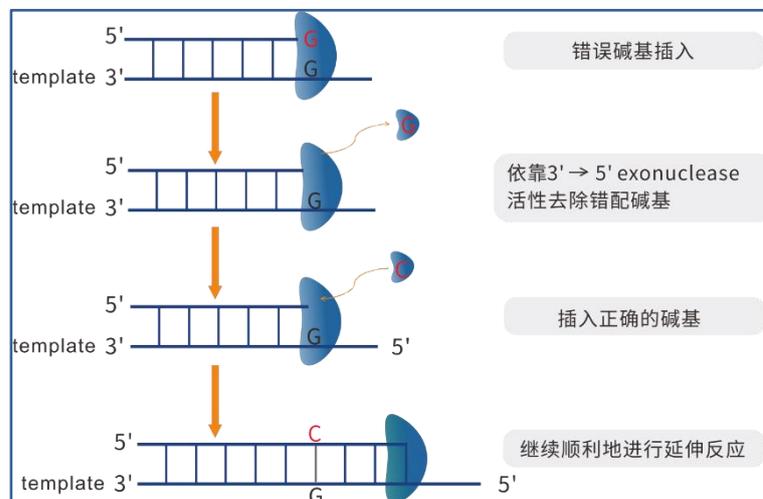
步骤②：引物与单链 DNA 退火；

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

组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
2X <i>ApexHF</i> FL PCR Master Mix ^{*1}	1x	25 μl
Template	≤500 ng ^{*2}	-
Primer F (10 μM)	0.2 μM ^{*3}	1 μl
Primer R (10 μM)	0.2 μM ^{*3}	1 μl
RNase free water	-	Up to 50 μl

*1: *ApexHF* FL PCR Master Mix 避免反复冻融, 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: 通常模板添加量少于 500 ng, 可获得良好的扩增效果。若以 cDNA 为模板时, 建议少于 250 ng (模板量相当于 Total RNA 的量)。

*3: 引物通常使用终浓度为 0.2 μM, 可根据实验结果在 0.1 - 0.4 μM 范围内调整。

2) 反应条件 (以 3 Step 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	1 min ^{*1}	1
变性	98°C	10 sec ^{*2}	} 25-35
退火	55°C or 60°C ^{*3}	15 sec	
延伸	68°C	1 min / kb ^{*4}	

*1: 对于普通模板, 可省略预变性步骤; 对于复杂模板, 如高 GC 或者长片段, 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: 一般建议 Tm 值高于 55°C 时, 退火温度设置为 60°C; Tm 值低于 55°C 时, 退火温度设置为 55°C。也可根据实际情况进行调整。

*4: 延伸速度一般设置为 30 sec / kb, 可根据实际情况在 5 sec ~ 1 min / kb 内进行调整。片段 ≤ 10 kb, 可在 5 ~ 30 sec / kb 调整; 片段 ≥ 10 kb, 可在 30 sec ~ 1 min / kb 调整。两步法 PCR 和 三步法 PCR, 延伸温度都可以设置为 68°C。

*5: 当 3 Step PCR 扩增结果不好, 也可尝试 2 Step PCR 扩增 (2 Step 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。

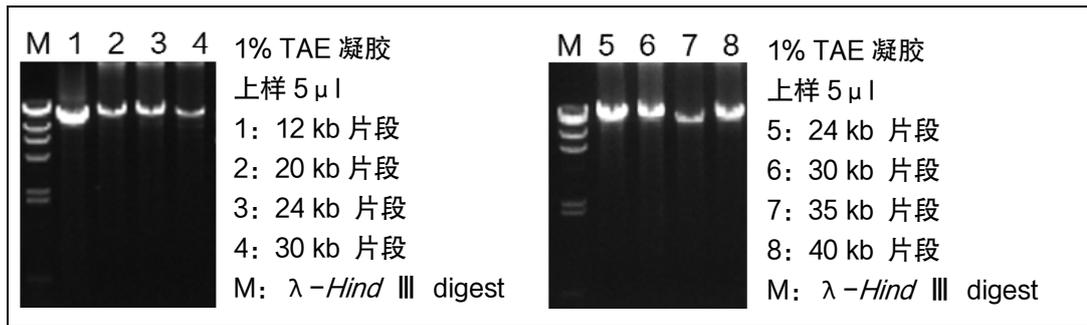
➤ 实验例

1. 以 Human gDNA 为模板 (泳道 1~4), 能够扩增出 30 kb 的 DNA 片段; 以 λ DNA 为模板 (泳道 5~8), 能够扩增出 40 kb 的 DNA 片段。

反应程序:

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

电泳结果如下图所示:

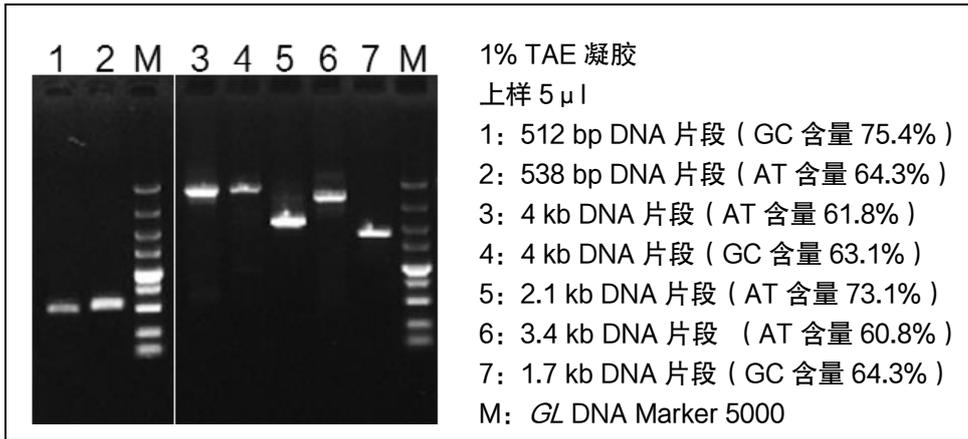


2. 以 Human gDNA 为模板, 扩增 GC 含量不同的 DNA 片段, 对高 GC 与高 AT 的 DNA 片段都有很好的扩增。

反应程序:

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

电泳结果如下图所示:

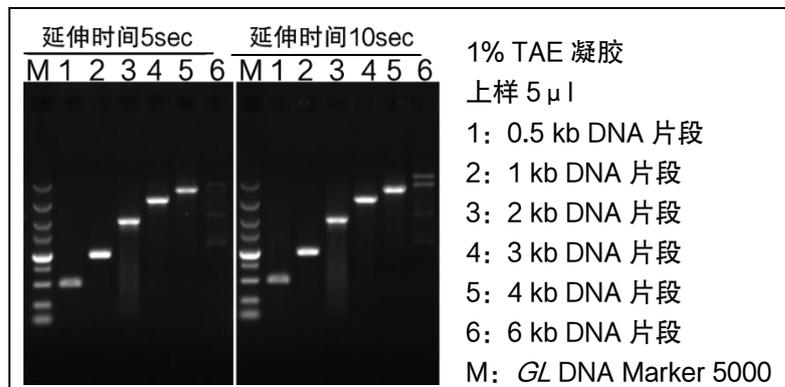


3. 以 Human gDNA 为模板，采用本试剂盒进行快速扩增不同长度的 DNA 片段，以 5 sec 的延伸时间可扩增出 4 kb DNA 片段；以 10 sec 的延伸时间可扩增出 6 kb DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
98°C	10 sec	} 30
55°C	15 sec	
68°C	5 sec / 10 sec	

电泳结果如下图所示:

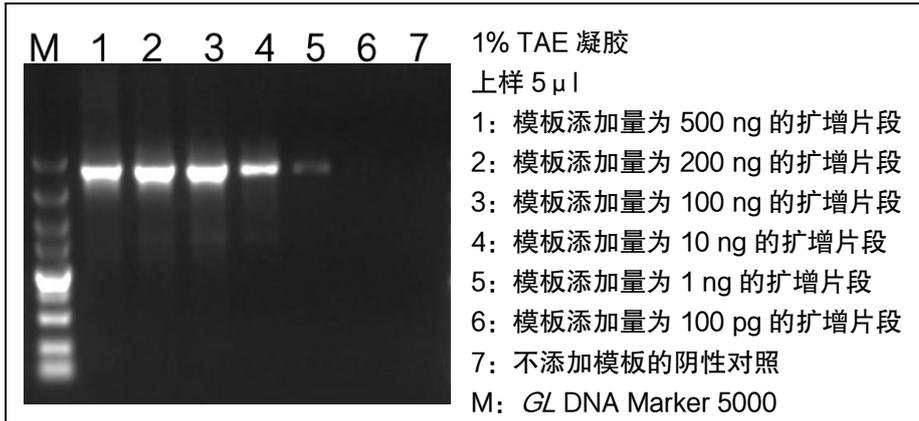


4. 以 Human gDNA 为模板，添加不同模板量 (500 ng、200 ng、100 ng、10 ng、1 ng、100 pg)，扩增 4 kb DNA 片段，模板量低至 1 ng 时，能够以 5 sec / kb 的速度扩增出目的片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
98°C	10 sec	} 30
55°C	15 sec	
68°C	20 sec	

电泳结果如下图所示:

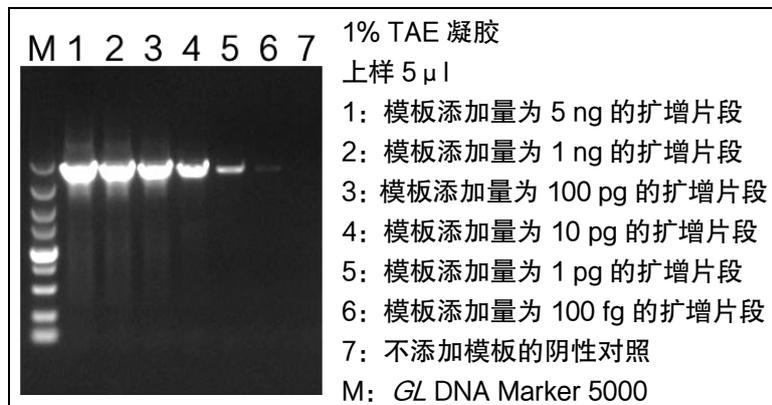


5. 以 λ DNA 为模板，添加不同模板量（5 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg），扩增 4 kb DNA 片段，模板量低至 100 fg 时，能够以 5 sec / kb 的速度扩增出目的片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
98°C	10 sec	} 30
55°C	15 sec	
68°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 Tm 值在 50 ~ 70°C，两引物 Tm 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 μM。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. 合适的变性温度及时间

- ❖ 对于普通模板，可省略预变性步骤；对于复杂模板，如高 GC 或者长片段，建议将预变性设置为 94°C 30 sec~1 min。亦可根据实际情况进行调整，但时间过长，可能会影响 DNA 聚合酶活性。
- ❖ 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。

4. 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，并且可能出现引物二聚体。

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 模板的区域最好分开，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	1 min	1
变性	98°C	10 sec	} 25-35
延伸	68°C	30 sec / kb	