

Version 2

Cat No. AG12210

ApexHF HS DNA 聚合酶 预混液-CL (含染料)

ApexHF HS DNA Polymerase CL 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 CL 即用型的 2 倍浓度 PCR 反应预混液。本制品中含有电泳所必需的色素试剂，制品溶液呈现紫红色；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，反应完成后可直接进行琼脂糖凝胶电泳。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。本制品对简单或复杂模板、短片段或长片段 PCR 扩增都具有好的适应性，特别适用于长片段 PCR 扩增；同时，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。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	AG12210 (100 rxns / 50 μ l)
2X <i>ApexHF</i> CL PCR Master Mix (dye plus)	500 μ l X 5 pcs

➤ 保存

保存温度：-20℃

运输温度：干冰运输或者-20℃冰袋运输

➤ 产品优势

1. *ApexHF* HS DNA Polymerase CL 是一种高保真 DNA 聚合酶，扩增效率高。
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 32 kb 的 DNA 片段。
3. 优化的反应体系，对简单或复杂模板、短片段或长片段 PCR 扩增都具有好的适应性。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。
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，对粗提样品有很好的扩增。
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。
7. 本制品中包含电泳指示剂，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

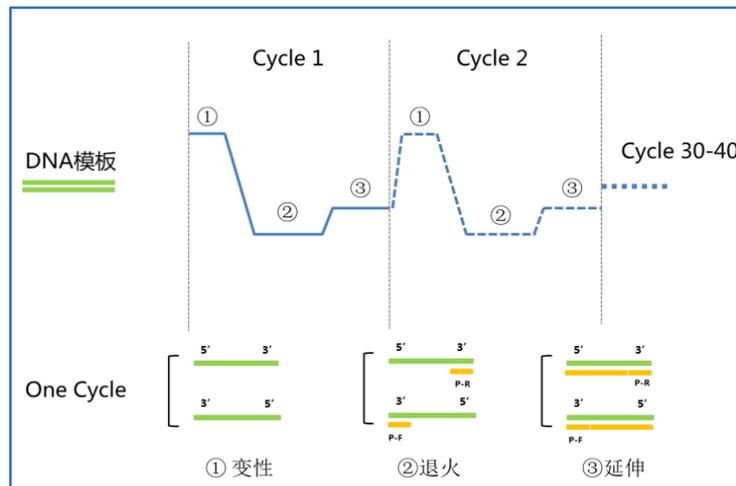
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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；

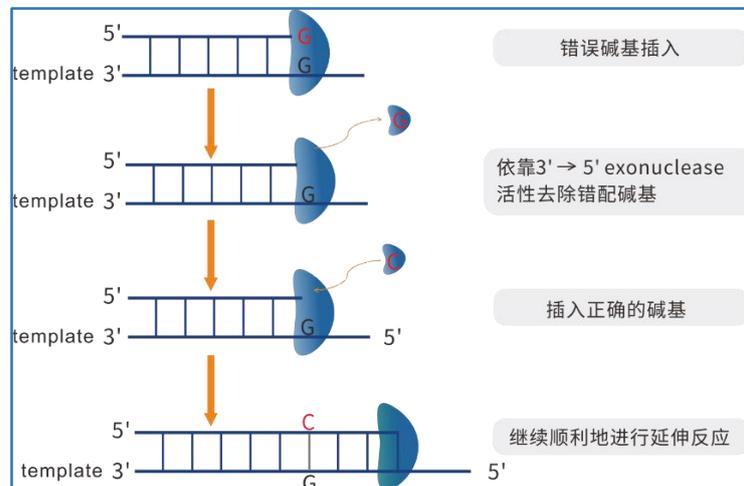
步骤②：引物与单链 DNA 退火；

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

首先按照下表冰上配制反应液:

组分名称	反应终浓度	50 μ l 体系
2X <i>ApexHF</i> CL PCR Master Mix (dye plus) ^{*1}	1x	25 μ l
Template	≤ 500 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: 该溶液要避免反复冻融, 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: 通常模板添加量不高于 500 ng, 可获得良好的扩增效果。若以 cDNA 为模板时, 建议不高于 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 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^{*6})

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 ^{*2}	98°C	10 sec	} 25 ~ 35
退火	55°C or 60°C ^{*3}	5 sec	
延伸	68°C ^{*5}	30 sec / 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 ~ 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: 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 10 sec ~ 1 min / kb 内进行调整。片段小于 10 kb, 可在 10 sec ~ 30 sec / kb 内进行调整; 片段大于 10 kb, 可在 30 sec ~ 1 min / kb 内进行调整。若是粗提样品, 建议将延伸速度设置为 1 min / kb。
- *5: 两步法 PCR 与三步法 PCR, 延伸温度都可以设置为 68°C。
- *6: 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, 取适量反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

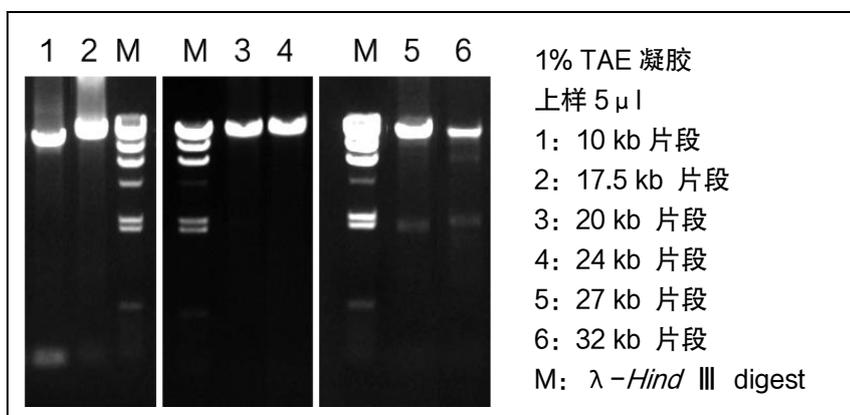
➤ 实验例

- 以 Human gDNA 为模板, 用本试剂盒扩增不同长度的 DNA 片段, 能够扩增出 32 kb 的 DNA 片段。

反应程序:

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

电泳结果如下图所示:

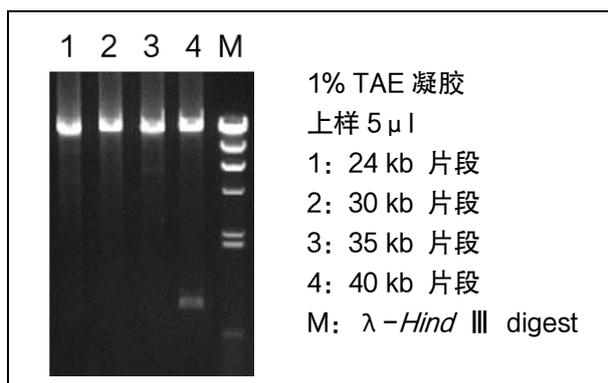


- 以 λ DNA 为模板, 用本试剂盒扩增不同长度的 DNA 片段, 能够扩增出 40 kb 的 DNA 片段。

反应程序:

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

电泳结果如下图所示：

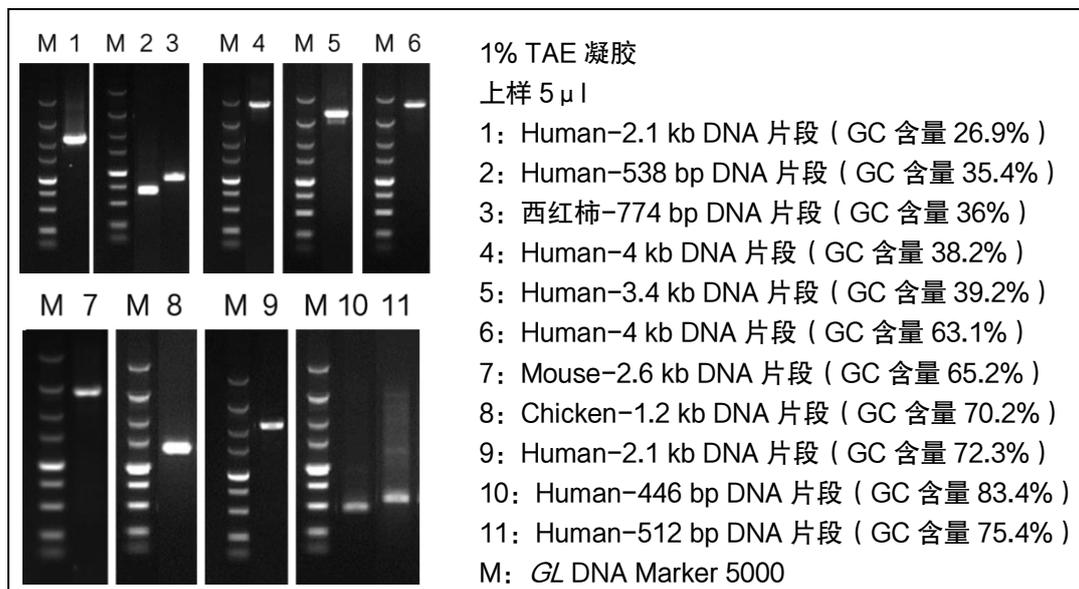


3. 以 Human、Tomato、Mouse、Chicken gDNA 为模板，扩增 GC 含量不同的 DNA 片段，对高 GC 与高 AT 的 DNA 片段都有很好的扩增。

反应程序：

温度	时间	循环数
98°C	10 sec	} 30
68°C	30 sec / kb	

电泳结果如下图所示：

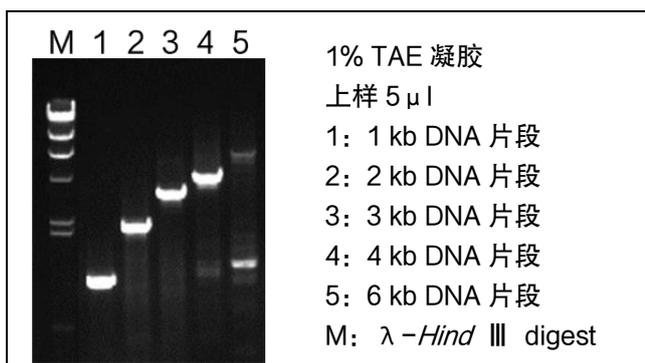


4. 以 Human gDNA 为模板，用本试剂盒进行快速扩增不同长度的 DNA 片段，以 30 sec 的延伸时间可扩增出 6 kb DNA 片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
98°C	10 sec	} 30
55°C	5 sec	
72°C	30 sec	

电泳结果如下图所示：

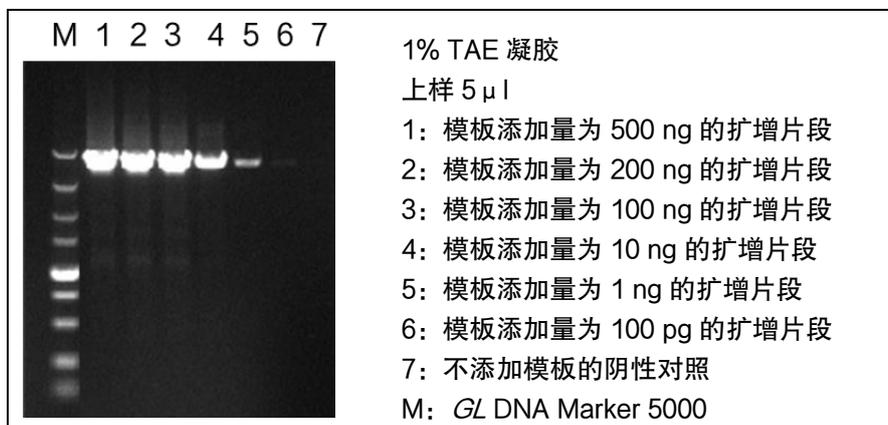


5. 以 Human gDNA 为模板，添加不同模板量（500 ng、200 ng、100 ng、10 ng、1 ng、100 pg），用本试剂盒扩增 4 kb DNA 片段，模板量低至 1 ng 时，能够以 5 sec / kb 的速度扩增出目的片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
98°C	10 sec	} 30
55°C	5 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，或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	1 min	1
变性	98°C	10 sec	} 25 ~ 35
延伸	68°C	30 sec / kb	