

Version 1

Code No. AG12311

AdeptTect 植物快速直接 PCR 预混液（含染料）II

AdeptTect Plant Fast Direct PCR Master Mix (dye plus) II

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

本产品是专门针对植物叶片快速 PCR 反应而研制的预混型试剂, 简单裂解植物叶片即可获得模板进行 PCR 反应, 无需 DNA 纯化步骤; 同时具有较快的延伸速度, 最快可达 5sec/kb, 适用于快速 PCR 反应, 极大地缩短实验时长、节约成本。

本产品的样本兼容性和耐受性强, 对水稻、棉花、拟南芥、大豆、烟草、土豆等叶片粗裂后产生的 PCR 抑制物具有超强耐受性。与此同时, 扩增效率高, 针对不同长度和不同 GC 含量的 DNA 序列均能有效扩增, 非常适用于高通量筛选、转基因检测及基因分型等。

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; 本产品中含有电泳所必需的色素试剂, 制品溶液呈现紫红色; PCR 反应完毕后可以直接进行琼脂糖凝胶电泳。这种预混液操作简便, 可最大限度地减少人为误差, 并在较短时间内获得检测结果。

本产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。本产品扩增得到的产物 3' 端不含 A 碱基, 因此不可直接用于 TA 克隆。

➤ 产品组成

组分名称	(120 rxns / 50 μ l)
2X Plant Fast Direct PCR Master Mix (dye plus) II	500 μ l X 6 pcs
Plant Lysis buffer	12 ml
Proteinase K (20 mg/ml)	120 μ l

➤ 保存及运输

保存温度: -20°C 保存

运输温度: 干冰运输或 -20°C 冰袋运输

➤ 产品优势

- 操作便捷:** 无需进行核酸提取或纯化, 简单裂解即可进行 PCR 扩增。
- 高效快速:** 延伸速度快, 3 kb 以下片段扩增速度最快可达 5 sec/kb。
- 样本兼容性:** 适用于水稻、棉花、拟南芥、大豆、烟草和土豆等多种植物叶片。
- 强耐受性:** 对植物叶片粗裂模板中的 PCR 抑制物具有较强的耐受性。

➤ 实验原理

PCR 扩增原理

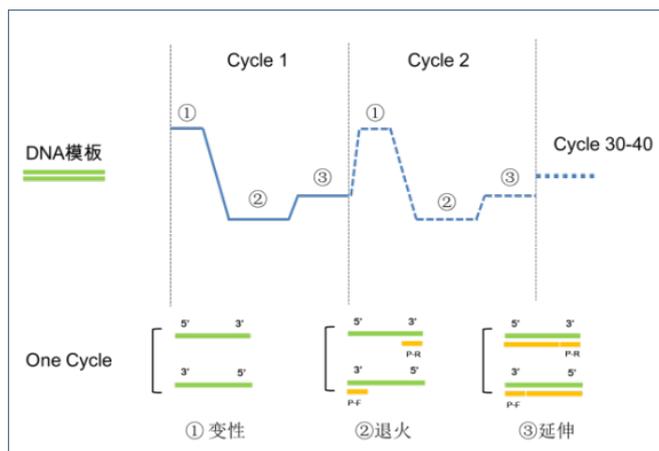
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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。



➤ 实验前准备

1) 试剂 & 耗材：

Primer、DNA 模板或植物叶片样本、PCR 管、枪头等。

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. 样本的处理：

本产品适用于以下两种模板类型：纯化后的 DNA 及植物样本的简单裂解产物。

1) 纯化后的 DNA：加入 ≤500 ng 纯化后的 DNA 至 PCR 反应液中进行反应即可。

2) 植物样本简单裂解方法：

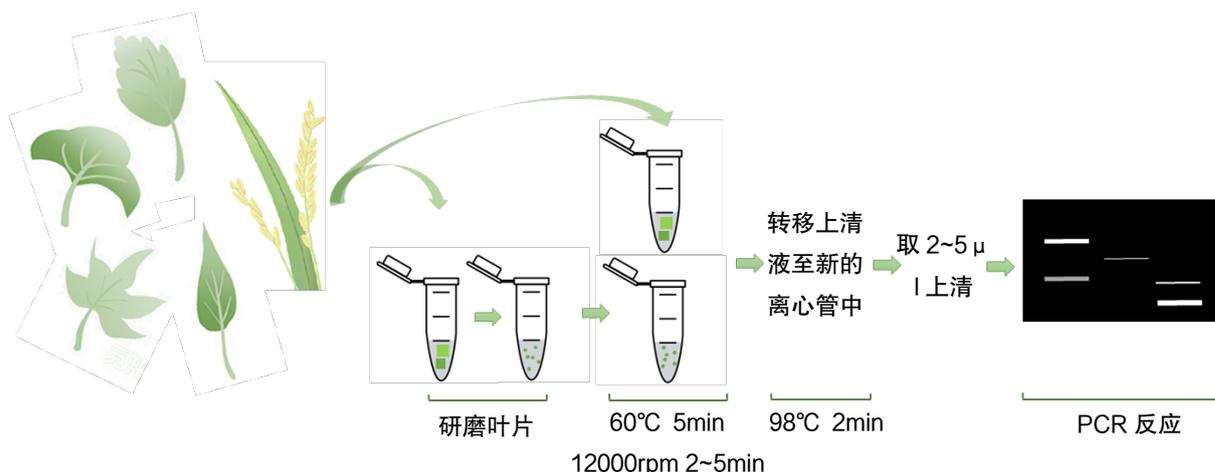
① 样本处理方法^{*2}：取适量大小的植物叶片^{*1}于离心管或研磨管中，按以下三种方式对叶片进行处理：

- a. 直接裂解：向装有叶片的离心管中加入 100 μl 的 Plant Lysis Buffer 浸没叶片即可进行下一步②；
- b. 枪头或研磨杵（推荐公司产品：Code No. AG21304）：向装有叶片的离心管中加入 100 μl 的 Plant Lysis Buffer 浸没叶片，用干净的 200 μl 枪头或研磨杵将叶片样本完全捣碎（溶液中观察不到碎叶即为完全捣碎）；

- c. 研磨珠（推荐公司产品：Code No. AG21305）：向装有叶片的研磨管中加入 $100\ \mu\text{l}$ ³ 的 Plant Lysis Buffer 浸没叶片，用研磨仪⁴ 将样本振荡磨碎。
- ② 向叶片与裂解 Buffer 混合溶液中加入 $1\ \mu\text{l}$ Proteinase K 充分混匀， 60°C 反应 5 min（反应时间一般推荐 5 min，若裂解效果不好，可适当的延长裂解时间，在 5~30 min 范围内调整）。
 - ③ $12000\ \text{rpm}$ 室温离心 2~5 min，将不溶物离心至管底，将上清液转移至新的离心管中，若不小心将沉淀吸入，可再次离心 2~5 min 或将溶液于冰上放置 10~20 min 后再取上清。
 - ④ 98°C ⁵ 反应 2 min，反应完后将裂解样本放置于冰上或 4°C 备用，若当天不使用，可保存于 -20°C 或 -80°C 。
 - ⑤ 上清液即可作为模板进行后续 PCR 反应，按照表 1 模板推荐量添加（ $50\ \mu\text{l}$ 体系）。

表 1 简单裂解样本加入量表

样本类型	处理方式	叶片面积	粗裂模板添加量
水稻	直接裂解或研磨后裂解	$4\sim 50\ \text{mm}^2$	$2\sim 5\ \mu\text{l}$
棉花	直接裂解	$4\sim 25\ \text{mm}^2$	$2\sim 5\ \mu\text{l}$
拟南芥	研磨后裂解	$25\sim 50\ \text{mm}^2$	$2\sim 5\ \mu\text{l}$
大豆	研磨后裂解	$25\sim 100\ \text{mm}^2$	$2\sim 5\ \mu\text{l}$
烟草	研磨后裂解	$25\sim 100\ \text{mm}^2$	$2\sim 5\ \mu\text{l}$
土豆	研磨后裂解	$25\sim 100\ \text{mm}^2$	$2\sim 5\ \mu\text{l}$



*1: 可参考表 1 推荐的叶片大小剪取叶片样本，也可根据实验结果适当在此范围外增大或减小裂解的叶片面积。

*2: 对于需要研磨处理的样本，应保证研磨时叶片完全浸没在裂解液中，同时为得到较好的裂解效果尽量将叶片研磨彻底。

- *3: 若出现研磨不充分的情况, 可适当增加 Plant Lysis Buffer 的添加量至 200~500 μ l。
- *4: 研磨仪的振荡频率可尝试 70 Hz 处理 5 min, 若研磨管出现破碎情况, 可尝试降低振荡频率, 延长振荡时间, 例如 40 Hz 处理 10 min。
- *5: 98°C 反应温度过高, 可将上清液转移至 0.2 ml 管中, 于 PCR 仪中加热反应。

2. PCR 反应

1) 配制 PCR 反应液^{*1}

按照下表所示配制 PCR 反应液。

组分名称	反应终浓度	50 μ l 体系
2X Plant Fast Direct PCR Master Mix (dye plus) II ^{*2}	1X	25 μ l
Template	-	$\leq 5 \mu$ l ^{*3}
Primer F (10 μ M)	0.2 μ M ^{*4}	1 μ l
Primer R (10 μ M)	0.2 μ M ^{*4}	1 μ l
RNase free water	-	Up to 50 μ l

- *1: 为了获得更好的扩增特异性, 建议在冰上配制反应液。
- *2: 该溶液应避免反复冻融, 防止降低酶活性; 首次使用时, 短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部后进行使用, 减少损失; 使用时应轻柔混匀 (避免起泡), 缓慢吸取。
- *3: 使用纯化的 DNA 模板, 一般推荐 ≤ 500 ng; 简单裂解后的模板推荐用量参考表 1, 具体可根据实验结果调整 (2~5 μ l), 模板添加量不宜超过体系的 15%; 若减少反应总体积, 则相应减少模板添加量, 例如 20 μ l 扩增体系添加的粗裂模板量可尝试 0.5~2 μ l。
- *4: 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 ^{*1}	98°C	2 min	1
变性 ^{*2}	98°C	10 sec	} 30 ~ 35 ^{*5}
退火 ^{*3}	55°C	30 sec	
延伸	68°C	20 sec / kb ^{*4}	

- *1: 若模板为简单裂解产物, 一般可将预变性设置为 98°C 2 min (在 1 ~ 5 min 范围内调整); 若扩增纯化后 DNA 模板, 根据不同的目的片段, 可省略预变性步骤。
- *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: 退火温度主要取决于上下游引物的 T_m 值, 通常可按照 T_m \pm 5°C 设定, 对于特异性较差的引物或 GC 含量较高的片段可适当调高 T_m 值 (推荐 60°C), 或缩短退火时间 (推荐 5 sec)。

- *4: 扩增正常 GC 含量的片段建议延伸速度为 20 sec / kb; 为节省扩增时间, 对于 3kb 以内简单的短片段, 延伸速度可在 5 ~ 20 sec / kb 进行调整, 若片段过长或复杂而导致扩增效果不好, 可尝试将延伸速度延长至 30 ~ 60 sec / kb。
- *5: 一般推荐使用 35 个循环进行扩增, 若扩增特异性不好, 可尝试降低循环数。
- *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。

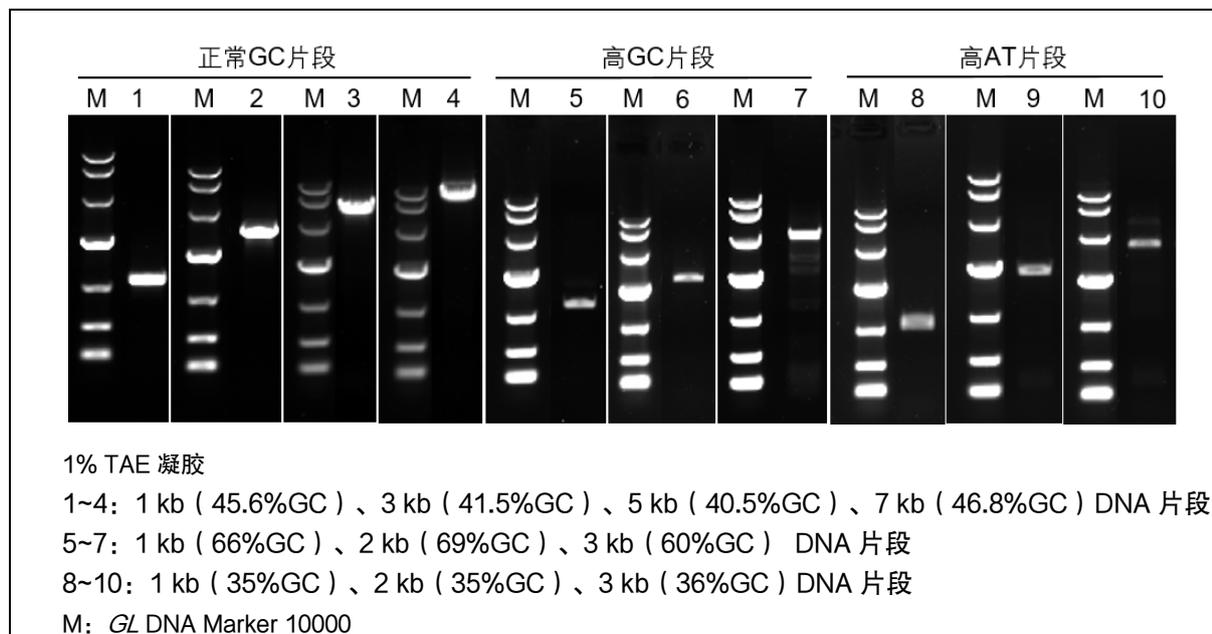
➤ 实验例

- 以水稻叶片粗裂液的扩增为例, 50 μ l 体系中添加 5 μ l 粗裂模板, 采用本产品扩增不同复杂程度及不同长度的片段, 都能获得很好的扩增效果。

反应程序:

温度	时间	循环数
98°C	2 min	1
98°C	10 sec	} 35
55°C	30 sec	
68°C	20 sec / kb	

电泳结果如下图所示:

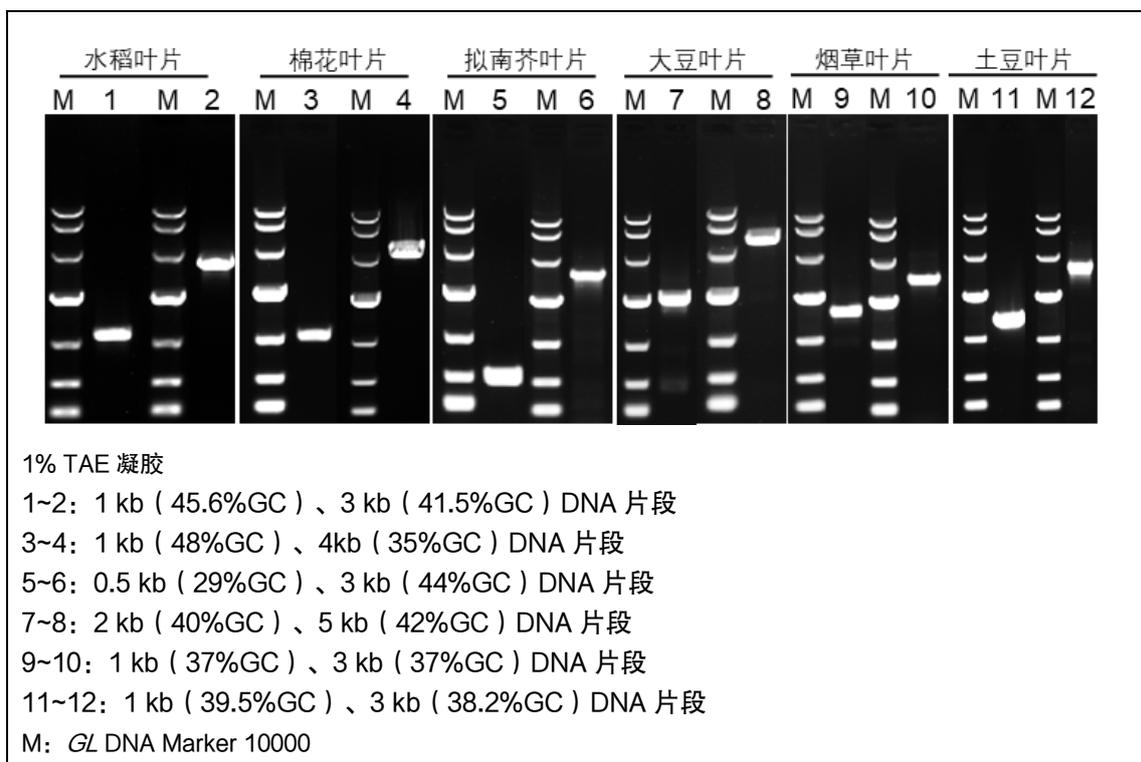


2. 以多种植物叶片粗裂液为模板进行 PCR 反应，50 μ l 体系添加 2 ~ 5 μ l 粗裂模板，采用本产品都能获得很好的扩增效果。

反应程序：

温度	时间	循环数
98°C	2min	1
98°C	10 sec	} 35
55°C	30 sec	
68°C	20 sec / kb	

电泳结果如下图所示：

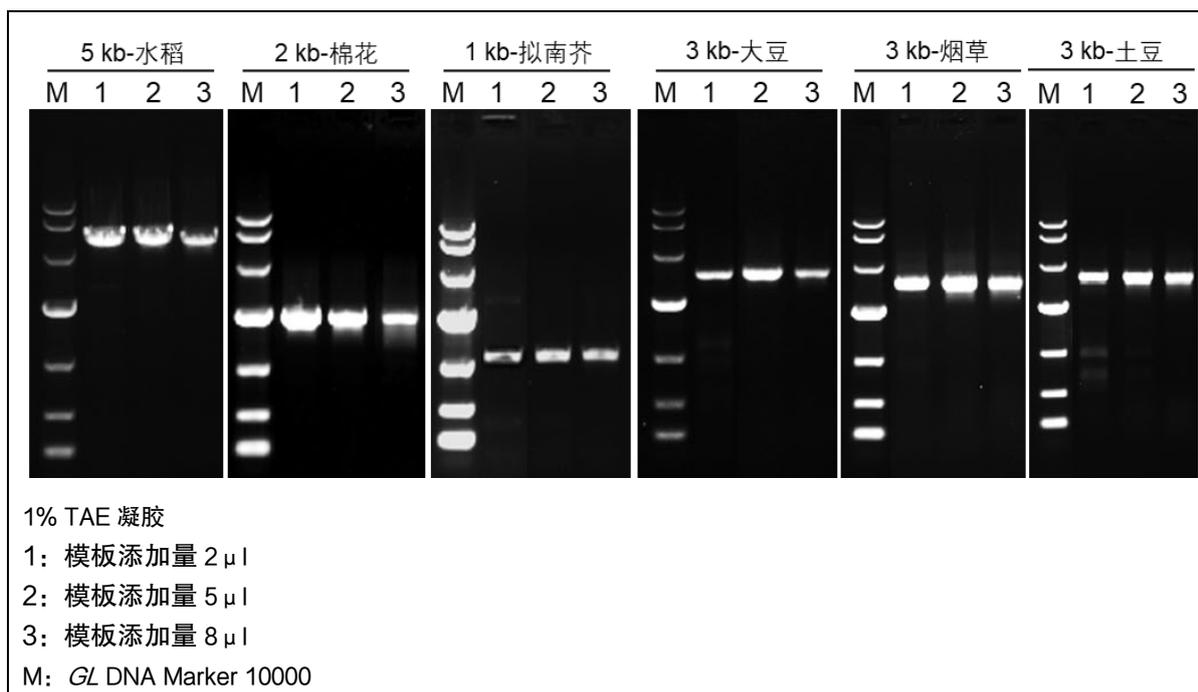


3. 向扩增体系中添加不同量的植物粗裂液 (50 μ l 体系中添加 2 μ l ~ 8 μ l)，采用本产品都能获得很好的扩增效果。

反应程序：

温度	时间	循环数
98°C	2min	1
98°C	10 sec	} 35
55°C	30 sec	
68°C	20 sec / kb	

电泳结果如下图所示：



➤ 产品注意事项

1. 合适的模板

- ❖ 建议使用健康的、新鲜及幼嫩的植物叶片，若为长期冷冻组织，应尽量避免反复冻融，否则会导致模板的降解，提取的基因组 DNA 不完整或提取量降低，影响后续的 PCR 效率。
- ❖ 为尽量避免粗裂模板中抑制物过多残留，在样本裂解过程中，请注意以下几点：
 - 1) 植物叶片样本组织尽量磨碎，不应使用过大面积的叶片进行裂解处理，具体请参考表 1；
 - 2) 反应结束后的产物，必须充分离心（离心越充分，管底的沉淀越多），取上清作为 PCR 反应模板，若离心取上清后仍存在较多杂质，可将裂解产物冰上放置 10~20 min，待杂质沉降至管底再取上清。
- ❖ 植物叶片简单裂解的产物中存在一定的 PCR 抑制物，反应时加入量过多可能会抑制反应导致扩增失败，可尝试减少粗裂模板加入量或将模板稀释后使用，推荐添加裂解模板不超过体系的 15%。
- ❖ 使用研磨管搭配研磨珠的方式磨碎叶片样本时，若出现研磨管破碎的情况，可将添加的 Plant Lysis buffer 体积增大至 500 μl，以缓解管壁受到的冲击力；相应地可将叶片面积增大一倍，具体可根据实验结果进行调整。

- ❖ 若一次性处理样本过多，操作不能保持一致或较粗糙，为保证良好的 PCR 效果，使用本产品时有以下建议：
 - 1) 统一使用研磨珠搭配研磨仪振荡的方式碾碎叶片，进行裂解反应；
 - 2) 每次添加粗裂模板前，充分离心，将抑制物沉淀管底，取上清；
 - 3) 减少模板添加量，以 5 μl 为基础下调 (2 ~ 5 μl / 50 μl 体系)；
 - 4) 反应体系配制完成后充分混匀，但请勿剧烈震荡，以免影响聚合酶的活性；
 - 5) 裂解后的模板及配制的反应体系于冰上放置，防止模板的降解或聚合酶失活。

2. 合适的引物

- ❖ 合适的引物浓度为 0.1 ~ 0.4 μM。
- ❖ 引物浓度低：导致反应效率低。可尝试提高 PCR 扩增引物反应浓度。
- ❖ 引物浓度高：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：可能会导致无扩增曲线，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。
- ❖ 若设计的引物特异性较差，且不便更换引物时，建议升高退火温度，推荐 60°C 左右。

4. 扩增循环数

- ❖ 扩增循环数取决于模板的初始浓度，一般推荐 30~35 个循环。若扩增条带较弱，可尝试增加循环数；若存在非特异性扩增，可尝试减少循环数。

5. 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 1: 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	} 30-35
延伸	68°C	10 sec / kb	

➤ 附录 2: 常见问题和解决方法

问题	可能的原因	解决方法
产物扩增 无条带或 条带较弱	实验操作不当	1. 确认样本裂解处理步骤、反应程序是否正确； 2. 确认反应体系配制是否正确，包括各组分的用量及引物浓度、用量等； 3. 确认反应程序的设置是否正确。
	引物设计不合适	1. 可使用对应样本的精提 DNA 模板验证引物是否能正常扩增； ❖ 若能正常扩增，则可能是样本裂解的问题； ❖ 若不能正常扩增，则可能是引物的问题，建议重新设计引物。可参考产品注意事项“2. 合适的引物”。
	反应体系不合适	1. 本产品推荐反应体系为 50 μl 体系，反应体系改变时各组分的添加量需对应改变； 2. 反应体积过小时，模板添加可对应减少，避免体系中的干扰物质增加从而影响 PCR 扩增。
	反应程序不合适	1. 可根据不同基因片段或引物优化退火温度； 2. 扩增条带较弱时，建议增加循环数 (30-35 Cycles) 或增加延伸时间 (1min / kb)；
	模板添加量不合适	1. 模板添加量过高可能引入干扰物质增加，影响 PCR 扩增； 2. 模板添加量过低可能加入的裂解模板太少，影响 PCR 扩增，建议尝试不同的模板使用量 (50 μl 体系: 2 μl~5 μl, 20 μl 体系: 0.5 μl~2 μl)，或将模板进行适当的稀释后再使用。
	试剂保存不当	1. 2X Plant Fast Direct PCR Master Mix (dye plus) II 和 Proteinase K 保存于 -20°C，使用时尽量避免反复冻融，若使用频繁，可于 4°C 放置 1~2 周； 2. 裂解后模板应尽快使用，若长时间保存，建议保存于 -20°C； 3. 尽量使用新鲜制备的粗裂解模板进行 PCR 扩增。
	未选取合适的样本	1. 粗裂模板尽量选择新鲜健康的植物嫩叶片； 2. 建议参考表 1 推荐面积剪取植物叶片；样本面积过大可能导致裂解得到的粗裂模板含杂质较多，会影响体系的扩增，样本面积过小会导致裂解释放的 DNA 含量较少，影响 PCR 扩增。

	裂解时研磨处理不充分	1. 对于需要研磨处理的样本（参考表 1），保证叶片充分研磨后再进行裂解处理。
	裂解后离心不充分	2. 样本裂解处理后，应充分离心取上清，尽量减少将杂质混入上清液。
非特异性扩增	引物不合适	1. 重新设计引物，注意引物的特异性； 2. 可适当降低引物用量。
	程序设置不合适	1. 建议改变退火温度，尝试设置退火温度梯度进行测试； 2. 适当减少退火时间，减少引物错配的概率； 3. 建议设置 30-35 循环，若特异性较差可适当减少循环数； 4. 根据片段大小设置延伸时间，建议设置 30sec-1min/kb，避免延伸时间设置过长。
	模板使用量	1. 建议尝试不同的模板用量，可适当增大模板使用量。
	实验环境影响	1. 配制 PCR 反应体系时保证在低温或冰上进行； 2. 配制操作尽量快速且完成后尽快上机进行 PCR 扩增反应。