Version 3

Code No. AG12209

ApexHF HS DNA 聚合酶预混液-CL

ApexHF HS DNA Polymerase CL 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.

ACCURATE BIOLOGY 艾科瑞生物

➢ 产品概述

本产品是 *ApexHF* HS DNA Polymerase CL 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。本产品对简单或复杂模板、短片段或长片段 PCR 扩增都具有良好的适应性，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。

➢ 产品组成

组分名称	AG12209 (100 rxns / 50 μl)
2X *ApexHF* CL PCR Master Mix	850 μl X 3 pcs

➢ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

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. 本产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。
4. 本产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. 本产品是 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

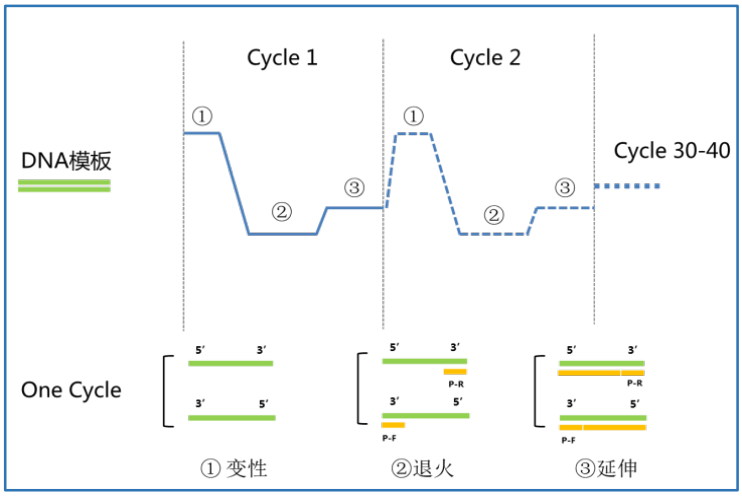
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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；

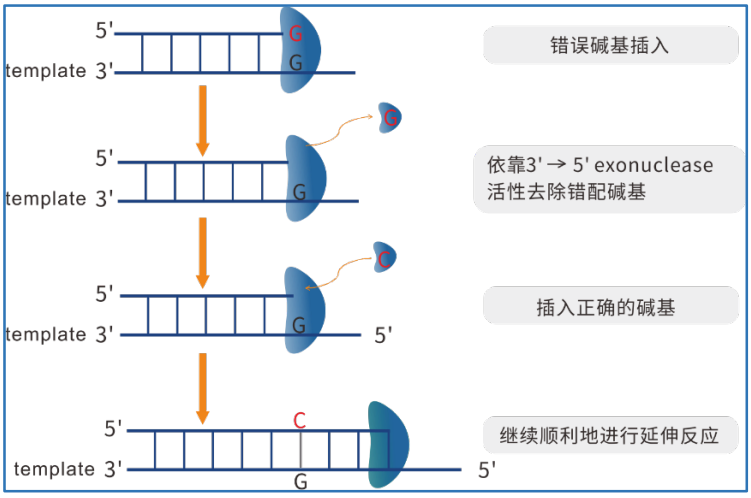
步骤②：引物与单链 DNA 退火；

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 (Proofreading 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

首先按照下表在冰上配制反应液。

组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
2X *ApexHF* CL 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：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℃	1 min[*1]	1
变性	98℃	10 sec[*2]	25-35
退火	55℃ or 60℃[*3]	5 sec	
延伸	68℃[*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℃ 30 sec~2 min。

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

*3：一般建议 Tm 值高于 55℃时，退火温度设置为 60℃；Tm 值低于 55℃时，退火温度设置为 55℃。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℃。

*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。

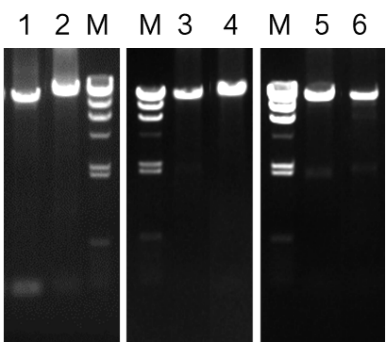
➢ 实验例

1. 以 Human gDNA 为模板，用本产品扩增不同长度的 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℃	10 sec	30
68℃	10 min	

电泳结果如下图所示：



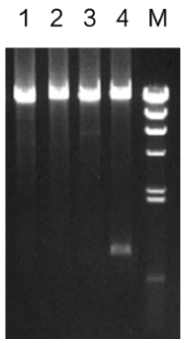
1% TAE 凝胶
上样 5 μl
1：12 kb 片段
2：17.5 kb 片段
3：20 kb 片段
4：24 kb 片段
5：27 kb 片段
6：32 kb 片段
M：λ-*Hind* Ⅲ digest

2. 以 λ DNA 为模板，用本产品扩增不同长度的 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℃	10 sec	30
68℃	10 min	

电泳结果如下图所示：



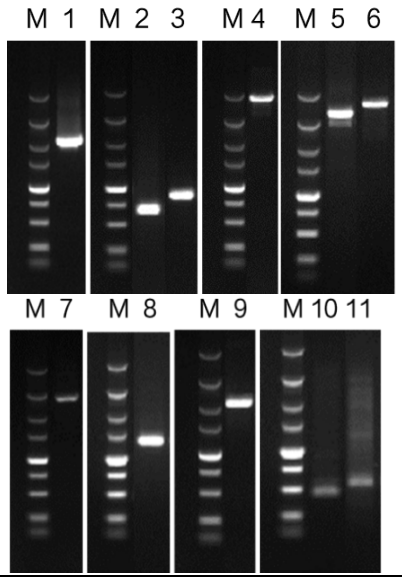
1% TAE 凝胶
上样 5μl
1：25 kb 片段
2：30 kb 片段
3：35 kb 片段
4：40 kb 片段
M：λ -*Hind* Ⅲ digest

3. 以 Human、Tomato、Mouse、Chicken gDNA 为模板，使用本产品扩增不同 GC 含量的 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℃	10 sec	30
68℃	30 sec / kb	

电泳结果如下图所示：



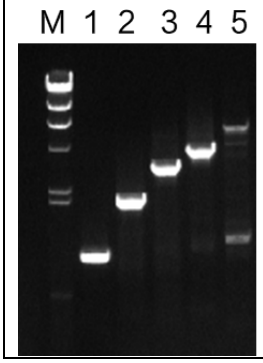
1% TAE 凝胶
上样 5μl
1：Human-2.1 kb DNA 片段（GC 含量 26.9%）
2：Human-538 bp DNA 片段（GC 含量 35.4%）
3：Tomato-774 bp DNA 片段（GC 含量 36%）
4：Human-4 kb DNA 片段（GC 含量 38.2%）
5：Human-3.4 kb DNA 片段（GC 含量 39.2%）
6：Human-4 kb DNA 片段（GC 含量 63.1%）
7：Mouse-2.6 kb DNA 片段（GC 含量 65.2%）
8：Chicken-1.2 kb DNA 片段（GC 含量 70.2%）
9：Human-2.1kb DNA 片段（GC 含量 72.3%）
10：Human-446 bp DNA 片段（GC 含量 83.4%）
11：Human-512 bp DNA 片段（GC 含量 75.4%）
M：*GL* DNA Marker 5000

4. 以 Human gDNA 为模板，采用本产品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℃	10 sec	30
55℃	5 sec	
68℃	30 sec	

电泳结果如下图所示：



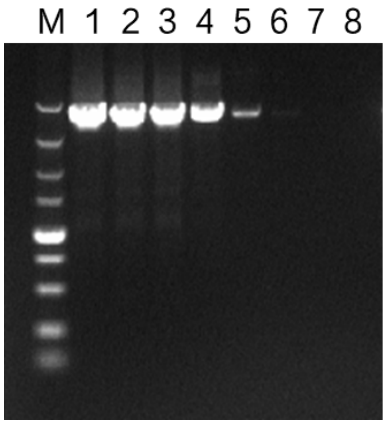
1% TAE 凝胶
上样 5 μl
1：1 kb DNA 片段
2：2 kb DNA 片段
3：3 kb DNA 片段
4：4 kb DNA 片段
5：6 kb DNA 片段
M：λ－*Hind* Ⅲ digest

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），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℃	10 sec	30
55℃	5 sec	
68℃	20 sec	

电泳结果如下图所示：



1% TAE 凝胶
上样 5 μl
1：模板添加量为 500 ng 的扩增片段
2：模板添加量为 200 ng 的扩增片段
3：模板添加量为 100 ng 的扩增片段
4：模板添加量为 10 ng 的扩增片段
5：模板添加量为 1 ng 的扩增片段
6：模板添加量为 100 pg 的扩增片段
7：模板添加量为 10pg 的扩增片段
8：不添加模板的阴性对照
M：*GL* DNA Marker 5000

➢ 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℃，两引物 Tm 值相差不超过 5℃。
- 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~ 0.4μM。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℃ 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

- 建议配制反应液与添加 DNA 模板的区域分开，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℃	1 min	1
变性	98℃	10 sec	25-35
延伸	68℃	30 sec / kb	