

Version 1

Cat No. AG12301

# *AdeptTect* 快速 HS PCR 预混液（含染料）

*AdeptTect* Flash HS PCR 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

*AdeptTect* Flash HS PCR Master Mix (dye plus) 是适用于快速 PCR 反应的 2 倍浓度预混型制品，具有超快的延伸速度 (可达 5 sec / kb)；同时，本制品还具有高扩增效率、高灵敏度、高特异性、高退火效率等特点。本制品中含有电泳所必需的色素试剂 (蓝色和黄色色素)，制品溶液呈现鲜艳的绿色；使用本制品时，只需要在溶液中加入模板、引物和水便可以进行 PCR 反应；PCR 反应后可直接进行电泳，操作便捷，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。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，有效抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。

本制品扩增得到的产物 3' 端不含 A 碱基，因此不可用于 TA 克隆。

## ➤ 产品组成

组分名称	AG12301 (120 rxns / 50 μl)
2X Flash HS PCR Master Mix (dye plus)	500 μl x 6 pc

## ➤ 保存

保存温度：-20℃

运输温度：干冰或者-20℃冰袋运输

## ➤ 产品优势

1. 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，可提高 PCR 扩增效率。
2. 本制品具有超快的延伸速度 (可达 5 sec / kb)。
3. 本制品为 2X 预混液，加入模板、引物和水即可进行 PCR 反应，操作简便，可最大限度地减少人为误差。
4. 本制品含有电泳所必需的色素试剂 (蓝色和黄色色素)，PCR 反应后可以直接进行电泳，在较短时间内即可获得检测结果。

## ➤ 实验原理

PCR 扩增原理

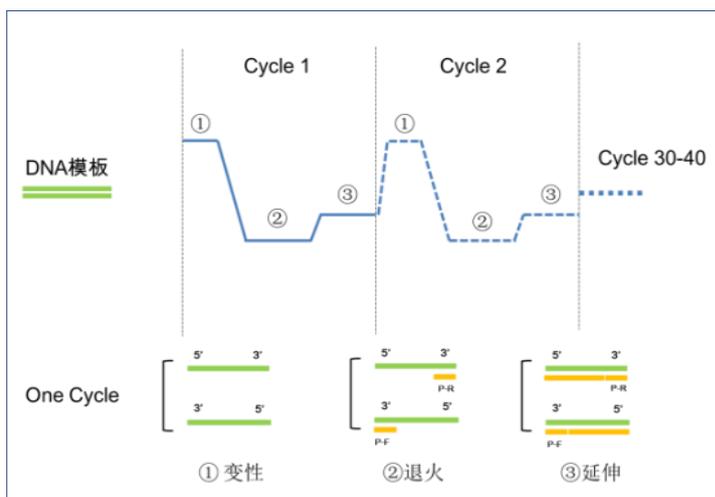
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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 进行退火；

步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下进行延伸，与单链 DNA 形成互补链；



## ➤ 实验前准备

### 1) 试剂 & 耗材：

Primer、DNA 模板、PCR 管、枪头、冰浴或冰盒。

### 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

反应体系 (50  $\mu$ l)

组分名称	反应终浓度	50 $\mu$ l 体系
2X Flash HS PCR Master Mix (dye plus) <sup>1)</sup>	1 X	25 $\mu$ l
Primer F (10 $\mu$ M) <sup>2)</sup>	0.2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Primer R (10 $\mu$ M) <sup>2)</sup>	0.2 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Template <sup>3)</sup>	< 200 ng	-
RNase free water	-	Up to 50 $\mu$ l

\*1: 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。

\*2: 通常引物终浓度为  $0.2 \mu\text{M}$  可以得到较好的结果, 也可根据具体实验情况在  $0.1 \sim 0.4 \mu\text{M}$  范围内调整引物浓度。

\*3: 通常情况下, 建议模板添加量  $< 200 \text{ ng}$ ; 若扩增效果不好, 可尝试延长 PCR 反应延伸时间, 在  $5 \sim 60 \text{ sec / kb}$  内进行调整。

## 2) 反应条件 (以三步法扩增 1 kb DNA 片段为例<sup>5</sup>)

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 <sup>*1</sup>	94°C	1 min	1
变性 <sup>*2</sup>	98°C	5 sec	} 30-35
退火 <sup>*3</sup>	55°C	5 sec	
延伸	72°C	5 sec / kb <sup>*4</sup>	

\*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  $94^\circ\text{C}$  30 sec~1 min。

\*2: 变性条件的设定可根据设备进行调整, 一般  $94^\circ\text{C}$  20-30 sec,  $98^\circ\text{C}$  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  $T_m \pm 5^\circ\text{C}$  设定。

\*4: 扩增 10 kb 以下片段建议延伸时间为 5 sec / kb; 10 kb 以上片段建议延伸时间为 10 sec / kb (可在  $5 \sim 10 \text{ sec / kb}$  调整); 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  $10 \sim 60 \text{ sec / kb}$ 。

\*5: 当引物  $T_m$  值较高或 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。

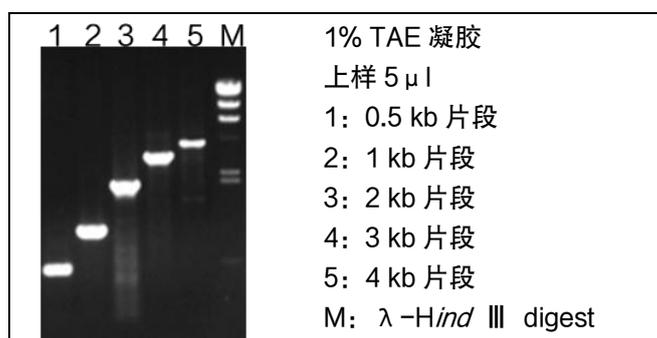
## ➤ 实验例

1. 以 Human gDNA 为模板，采用本试剂盒以不同的延伸速度扩增不同长度的 DNA 片段，能以 10 sec 的延伸时间扩增出 4 kb DNA 片段。

反应程序: ( 理论时长: 12.5 min )

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

电泳结果如下图所示:



2. 以 Human Total RNA 反转录获得的 cDNA 为模板，扩增不同长度的 DNA 片段。

4 kb DNA 片段的反应程序: ( 理论时长: 16 min )

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	5 sec	} 30
55°C	5 sec	
72°C	5 sec / kb	

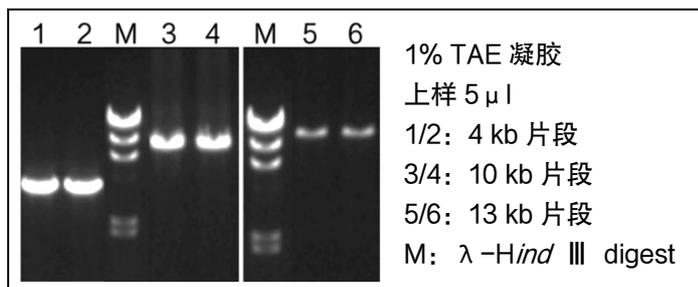
10 kb DNA 片段的反应程序: ( 理论时长: 56 min )

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	5 sec	} 30
68°C	5 sec	
72°C	10 sec / kb	

13 kb DNA 片段的反应程序: ( 理论时长: 68.5 min )

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	5 sec	} 30
68°C	10 sec / kb	

电泳结果如下图所示:

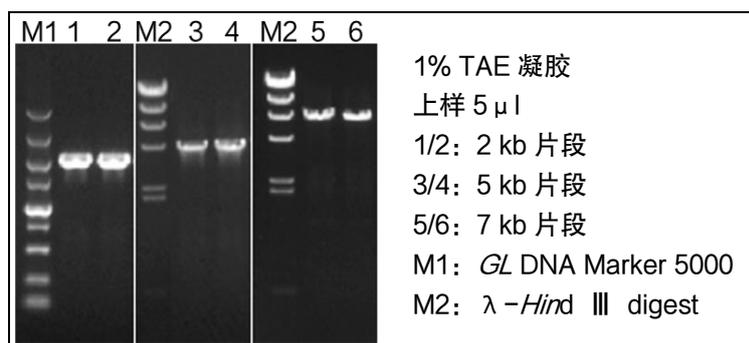


3. 挑取 *E.coli* 单菌落加入至 20  $\mu$ l RNase free water 中，混匀后取 1  $\mu$ l 菌液为模板，扩增不同长度的 DNA 片段，能以 3 sec / kb 扩增出 7 kb DNA 片段

**反应程序：**

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	5 sec	} 30
55°C	5 sec	
72°C	3 sec / kb	

电泳结果如下图所示：

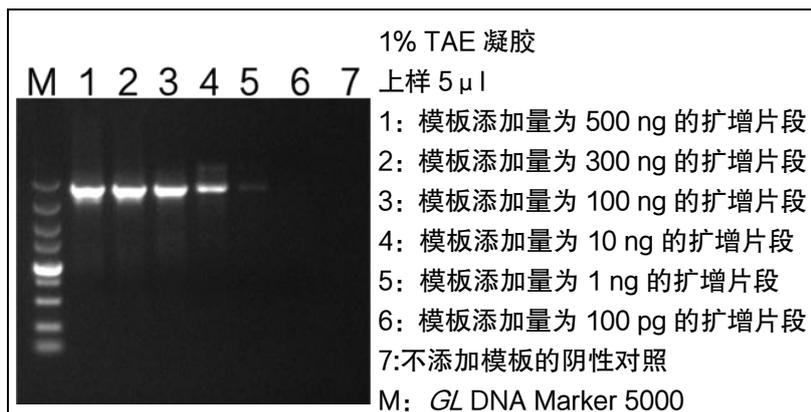


4. 以 Human gDNA 为模板，添加不同模板量 ( 500 ng、300 ng、100 ng、10 ng、1 ng、100 pg )，采用本试剂盒扩增 4 kb DNA 片段，模板量低至 1 ng 时，能以 5 sec / kb 的延伸速度扩增出目的片段。

**反应程序：** ( 理论时长：17.5 min )

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

电泳结果如下图所示：

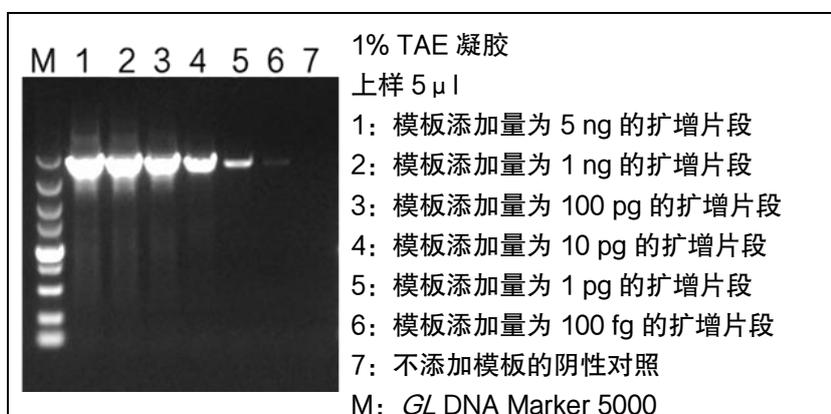


5. 以 λ DNA 为模板，添加不同模板量（5 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg），采用本试剂盒扩增 4 kb DNA 片段，模板量低至 100 fg 时，能以 5 sec / kb 的延伸速度扩增出目的片段。

反应程序：（理论时长：17.5 min）

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

电泳结果如下图所示：

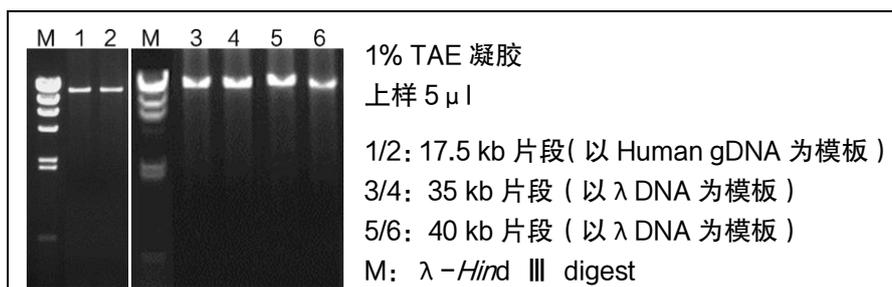


6. 以 Human gDNA(泳道 1~2)为模板，可扩增 17.5 kb 的 DNA 片段；以 λ DNA(泳道 3~6)为模板，能够很好地扩增 40 kb 的 DNA 片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
94°C	1 min	} 30
98°C	10 sec	
68°C	10 sec / kb	

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，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严重影响 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 $^{\circ}$ C，两引物  $T_m$  值相差不超过 5 $^{\circ}$ 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 个连续互补序列。
- ❖ 合适的引物浓度为 0.1 ~ 0.4  $\mu$ 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，并且可能出现引物二聚体。

### 4. 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。

### 5. 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	5 sec	30-35
延伸	68°C	5 sec / kb	