Version 2

Code 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.

ACCURATE BIOLOGY 艾科瑞生物

➢ 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，本产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。本产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；使用本产品时，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，因此不可用于 TA 克隆。

➢ 产品组成

组分名称	AG12301 （120 rxns / 50μl）
2X Flash HS PCR Master Mix（dye plus）	1 ml 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. 本产品具有高扩增效率、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. 本产品具有超快的延伸速度（可达 5 sec / kb）。
3. 本产品为 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. 本产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

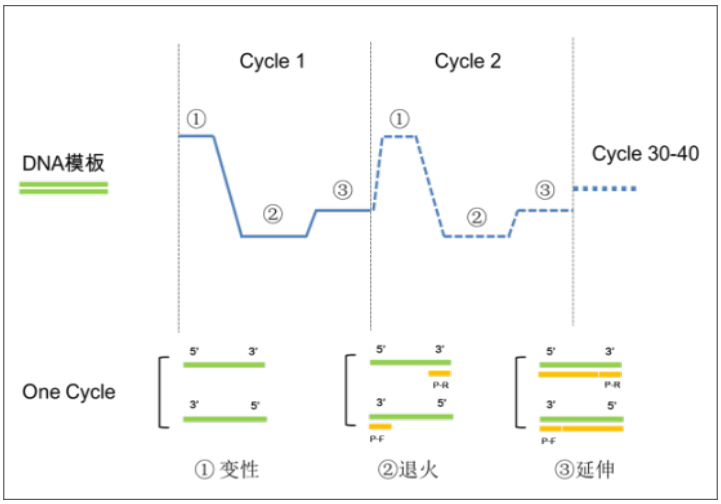
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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 μl）

组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
2X Flash HS PCR Master Mix (dye plus)*1	1 X	25 μl
Primer F (10 μM)*2	0.2 μM	1 μl
Primer R (10 μM)*2	0.2 μM	1 μl
Template*3	< 200 ng	–
RNase free water	–	Up to 50 μl

*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 μM 可以得到较好的结果，也可根据具体实验情况在 0.1 ~ 0.4 μM 范围内调整引物浓度。

*3：通常情况下，建议模板添加量 ＜200 ng；若扩增效果不好，可尝试延长 PCR 反应延伸时间，在 5 ~ 60 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*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*1	94℃	1 min	1
变性*2	98℃	5 sec	30–35
退火*3	55℃	5 sec	
延伸	72℃	5 sec / kb*4	

*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℃ 30 sec ~ 1 min。

*2：变性条件的设定可根据设备进行调整，一般 94℃ 20 ~ 30 sec，98℃ 5 ~ 10 sec。

*3：退火温度主要取决于上下游引物的 Tm 值，通常可按照 Tm ± 5℃ 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 ~ 10 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 ~ 60 sec / kb 。

*5：当引物 Tm 值较高或三步法 PCR 扩增结果不好，也可尝试两步法 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。

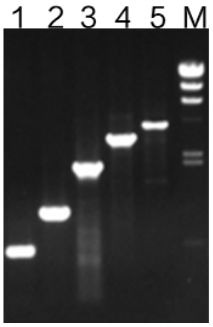
➢ 实验例

1. 以 Human gDNA 为模板，采用本产品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℃	10 sec	
55℃	5 sec	30
72℃	10 sec	

电泳结果如下图所示：



1% TAE 凝胶
上样 5 μl
1：0.5 kb 片段
2：1 kb 片段
3：2 kb 片段
4：3 kb 片段
5：4 kb 片段
M：λ-H*ind* Ⅲ digest

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℃	1 min	1
98℃	5 sec	
55℃	5 sec	30
72℃	5 sec / kb	

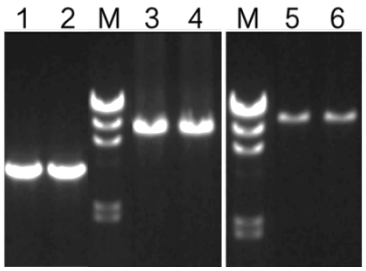
10 kb DNA 片段的反应程序：（理论时长：56 min）

温度	时间	循环数
94℃	1 min	1
98℃	5 sec	
55℃	5 sec	30
72℃	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℃	1 min	1
98℃	5 sec	30
68℃	10 sec / kb	

电泳结果如下图所示：



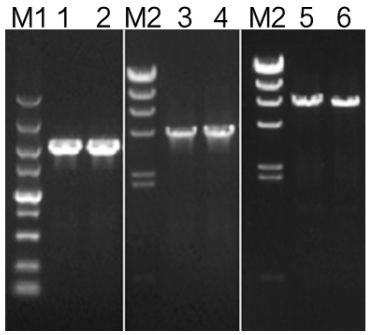
1% TAE 凝胶
上样 5 μl
1/2：4 kb 片段
3/4：10 kb 片段
5/6：13 kb 片段
M：λ-H*ind* Ⅲ digest

3. 挑取 *E.coli* 单菌落加入至 20 μl RNase free water 中，混匀后取 1 μl 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℃	1 min	1
98℃	5 sec	30
55℃	5 sec	
72℃	3 sec / kb	

电泳结果如下图所示：



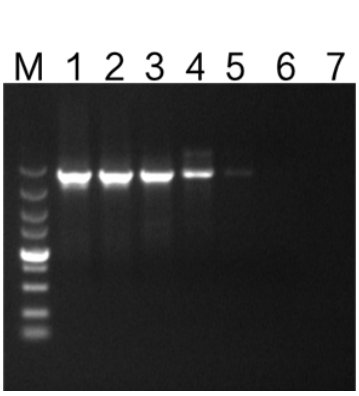
1% TAE 凝胶
上样 5 μl
1/2：2 kb 片段
3/4：5 kb 片段
5/6：7 kb 片段
M1：*GL* DNA Marker 5000
M2：λ-*Hin*d Ⅲ digest

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），采用本产品扩增 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℃	10 sec	30
55℃	5 sec	
72℃	5 sec / kb	

电泳结果如下图所示：



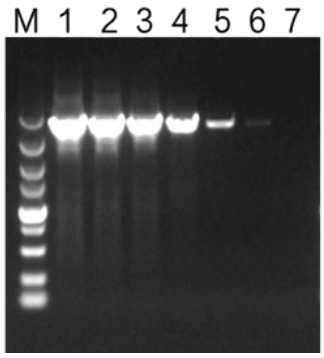
1% TAE 凝胶
上样 5 μl
1：模板添加量为 500 ng 的扩增片段
2：模板添加量为 300 ng 的扩增片段
3：模板添加量为 100 ng 的扩增片段
4：模板添加量为 10 ng 的扩增片段
5：模板添加量为 1 ng 的扩增片段
6：模板添加量为 100 pg 的扩增片段
7：不添加模板的阴性对照
M：*GL* DNA Marker 5000

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），采用本产品扩增 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℃	10 sec	30
55℃	5 sec	
72℃	5 sec / kb	

电泳结果如下图所示：



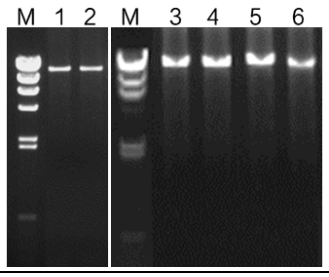
1% TAE 凝胶
上样 5 μl
1：模板添加量为 5 ng 的扩增片段
2：模板添加量为 1 ng 的扩增片段
3：模板添加量为 100 pg 的扩增片段
4：模板添加量为 10 pg 的扩增片段
5：模板添加量为 1 pg 的扩增片段
6：模板添加量为 100 fg 的扩增片段
7：不添加模板的阴性对照
M：*GL* DNA Marker 5000

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℃	1 min	30
98℃	10 sec	
68℃	10 sec / kb	

电泳结果如下图所示：



1% TAE 凝胶
上样 5μl

1/2：17.5 kb 片段（以 Human gDNA 为模板）
3/4：35 kb 片段（以λDNA 为模板）
5/6：40 kb 片段（以λDNA 为模板）
M：λ-*Hin*d Ⅲ digest

➢ 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 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℃	1 min		1
变性	98℃	5 sec	}	30-35
延伸	68℃	5 sec / kb		