Version 1

Cat No. AG12302

AdeptTect 快速 HS PCR 预混液（含染料）-I

AdeptTect Speed HS PCR Master Mix (dye plus) I

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 Speed HS PCR Master Mix (dye plus) Ⅰ 是适用于快速 PCR 反应的 2 倍浓度预混型制品，延伸速度可达 10 sec / kb；本制品扩增性能强，适用于复杂模板的扩增，可扩出长达 10 kb 的 DNA 片段扩增；使用时，只需要在溶液中加入模板、引物和水即可进行 PCR 反应；同时本制品中还加入了电泳检测时所需的色素试剂，试剂呈现紫红色，PCR 反应完毕后可以直接进行琼脂糖凝胶电泳；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，因此不可直接用于 TA 克隆。

➢ 产品组成

组分名称	AG12302 （120 rxns / 50μl）
2X Speed HS PCR Master Mix（dye plus）Ⅰ	500μl x 6 pc

➢ 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. 本制品具有较快的延伸速度（可达 10 sec / kb），可在较短时间内获得检测结果。
2. 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，大大提高了实验效率。
3. 本制品中含有紫红色染料，PCR 结束后可直接进行琼脂糖凝胶电泳，无需添加电泳上样缓冲液，电泳时有一条浅紫红色指示带。

➢ 实验原理

PCR 扩增原理

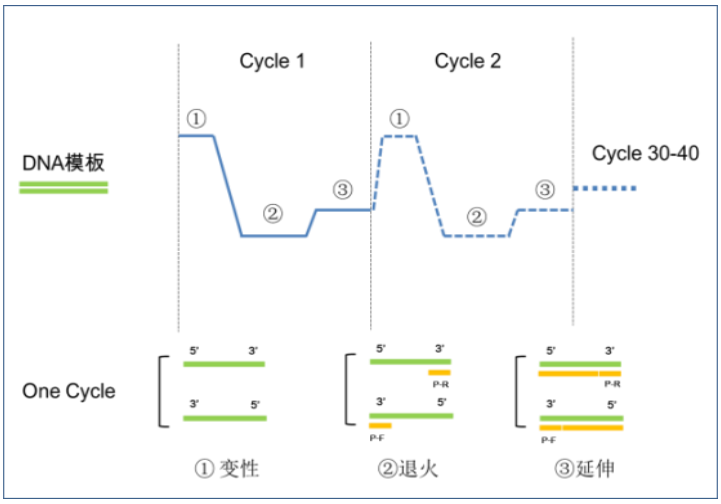
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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**

首先按照下表所示配制 PCR 反应液[*1]。然后将配制好的反应液放置于 PCR 仪中反应。

反应体系（50 μl）

组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
2X Speed HS PCR Master Mix（dye plus）I [*2]	1 X	25 μl
Primer F（10 μM）	0.2 μM[*3]	1 μl
Primer R（10 μM）	0.2 μM[*3]	1 μl
Template[*4]	≤500 ng	–
RNase free water	–	Up to 50 μl

*1：为了获得更好的扩增特异性，可在冰上配制反应液。

*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：通常引物终浓度为 0.2μM 可以得到较好的结果，也可根据具体实验情况在 0.1 ~0.4μM 范围内调整引物浓度。

*4：通常情况下，建议模板添加量 ≤500 ng，可根据实际情况进行调整。

2） 反应条件（以三步法扩增 1 kb DNA 片段为例[*9]）

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[*5]	94℃	1 min	1
变性[*6]	98℃	10 sec	30-35
退火[*7]	55℃	5 sec	
延伸[*8]	72℃	10 sec / kb	
最终延伸	72℃	2 min	1

*5：预变性一般可设置为 94℃ 30 sec~1 min；根据扩增目的片段或样本不同，可省略预变性步骤。

*6：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。

*7：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，退火时间可在 5 sec ~ 30 sec 范围内调整。

*8：扩增 5 kb 以下 DNA 片段建议延伸速度为 10 sec / kb；扩增 5 kb 以上的 DNA 片段或复杂模板，延伸速度可在 10 ~ 60 sec / kb 范围内调整。

*9：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。

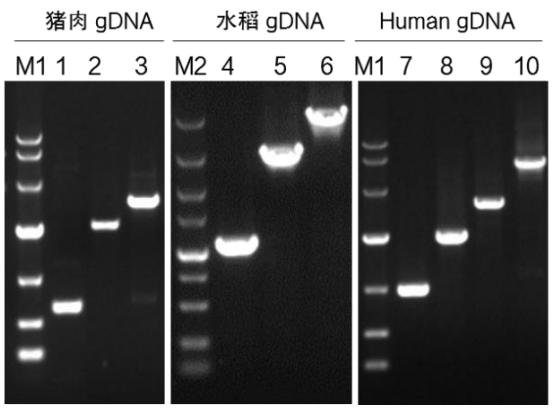
➢ 实验例

1. 以不同物种 gDNA 为模板，采用本试剂盒以 10 sec / kb 的延伸速度扩增不同长度的 DNA 片段，都能获得很好地扩增效果。

反应程序:

温度	时间	循环数
98℃	10 sec	30
55℃	5 sec	
72℃	10 sec / kb	

电泳结果如下图所示：



1% TAE 凝胶
上样 5 μl

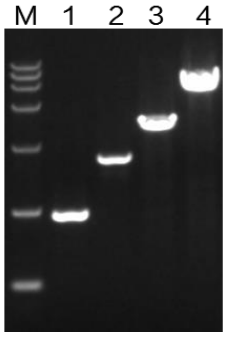
1~3：0.6 kb、2 kb、2.9 kb DNA 片段
4~6：1 kb、3 kb、5 kb DNA 片段
7~10：1 kb、2 kb、3 kb、6 kb DNA 片段
M1：*GL* DNA Marker 10000
M2：*GL* DNA Marker 5000

2. 挑取 *E.coli* 单菌落加入至 10 μl RNase free water 中，混匀后取 2 μl 菌液为模板，扩增不同长度的 DNA 片段，都能获得很好地扩增效果。

反应程序：

温度	时间	循环数
98℃	10 sec	30
55℃	5 sec	
72℃	10 sec / kb	

电泳结果如下图所示：



1% TAE 凝胶
上样 5 μl

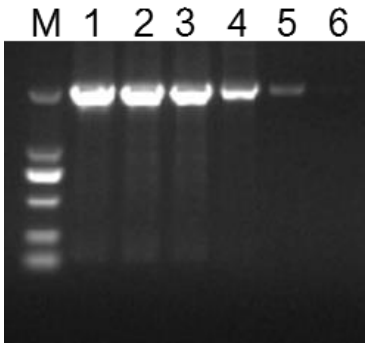
1：1 kb DNA 片段
2：2 kb DNA 片段
3：3.5 kb DNA 片段
4：6.7 kb DNA 片段
M：*GL* DNA Marker 15000

3. 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），采用本试剂盒扩增 2 kb DNA 片段，模板量低至 1 ng 时，能扩增出目的片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
98℃	10 sec	30
55℃	5 sec	
72℃	30 sec / kb	

电泳结果如下图所示：



1% TAE 凝胶
上样 5μl
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
M：*GL* DNA Marker 2000

➢ 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 反应扩增效率较低，PCR 反应产物产量少。建议更换模板，重新实验。

2. 合适的引物

- ❖ 合适的引物浓度为 0.1 ~ 0.4μM。
- ❖ 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℃，两引物 Tm 值相差不超过 5℃。

  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，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 30-35 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

（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	30-35
延伸	68℃	10 sec / kb	