

Version 3

Code No. AG12304

AdeptTect 通用型直接 PCR 预混液(含染料)

AdeptTect Universal Direct 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

本产品是通用型直接 PCR 反应的 2 倍浓度预混型试剂，具有较强的扩增性能及广泛的模板适用性，对复杂模板如高 GC 含量、高 AT 含量的模板都能进行有效的扩增。特别适合对各种类型样品直接或简单裂解后进行 PCR 扩增，包括动物、植物、真菌、细菌、血液及细胞等各种样本，无需 DNA 纯化步骤，极大地缩短了实验时长、节约成本。简单裂解可使用碱裂解或蛋白酶 K 裂解方法，如选用蛋白酶 K 裂解方法，可选用公司产品 Lysis Buffer for PCR(Code No. AG12306 和 AG12307)。同时，本产品具有较快的延伸速度(~20 sec / kb)，可在较短时间内获得检测结果。

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；同时本产品中还加入了电泳检测时所需的色素试剂，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。这种预混液方案操作简便，可最大限度地减少人为误差。

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 PCR 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	AG12304 (120 rxns / 50 μl)
2X Universal Direct PCR Master Mix (dye plus)	500 μl X 6 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. 本产品具有较强的扩增性能与广泛的模板适用性，适用于各种类型样本直接或简单裂解后进行 PCR 扩增；无需 DNA 纯化步骤，缩短实验时长、节约成本；直接以水稻叶片为模板，可扩增出长达 12 kb 的 DNA 片段。
2. 本产品是 2 倍浓度的预混液，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，大大提高了实验效率。
3. 本产品具有较快的延伸速度 (~20 sec / kb) ，可在较短时间内获得检测结果。
4. 本产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。

5. 优化的反应体系，对复杂模板的 PCR 扩增具有良好的适应性，对于高 GC 含量、高 AT 含量的模板都能进行有效的扩增。

➤ 实验原理

PCR 扩增原理

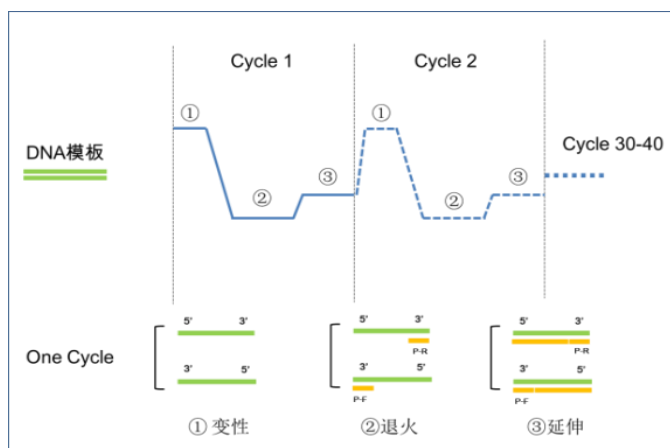
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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、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. 样本的处理：

本产品适用于以下三种模板类型：纯化后的 DNA、直接生物样本及生物样本的简单裂解产物。可根据样本裂解的难易程度及基因的复杂程度，选择合适的模板类型。

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) 直接 PCR 法：

取适量的生物样本直接加入 PCR 反应液中进行反应(样本加入量可参考 Table. 1 直接 PCR 及简单裂解样本加入量表)。

3) 简单裂解方法

① 取适量的生物样本 (样本加入量可参考 Table. 1 直接 PCR 及简单裂解样本加入量表)，选择下述方法之一进行裂解：

a、蛋白酶 K 裂解方法【可以选择本公司产品裂解液 (用于 PCR) (Code No. AG12306 和 AG12307)】：

- ❖ 往样本中加入 100 μ l 的提取液【组分：20 mM Tris-HCl (pH 8.0)，100 mM NaCl，5 mM EDTA，0.1% SDS】和 1 μ l 蛋白酶 K (20 mg / ml)，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 5~15 min 范围内调整)；
- ❖ 98°C 反应 2 min；放置于冰上；

b、碱裂解方法：

- ❖ 加入 90 μ l 的 50 mM NaOH 溶液，充分混匀；
- ❖ 95°C 加热 10 min；
- ❖ 加入 10 μ l 的 1 M Tris-HCl 溶液 (pH 8.0)，充分混匀后置于冰上；

② 室温下桌面离心将不溶物离心至管底，将上清液转移至新的离心管中；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 (针对不同的样本，保存时间存在差异；如需长期保存，可针对不同样本进行研讨实验)。

③ 取 2 μ l 的上清液，按照本产品进行 PCR 反应 (上清液体积根据实验结果进行调整，如在 1~4 μ l 范围内调整)。

Table. 1 直接 PCR 及简单裂解样本加入量表^{*4}

样本类型	直接 PCR 样本添加量	简单裂解样本添加量
血液 ^{*3}	$\leq 5 \mu$ l	-
动物组织 ^{*4}	5-10 mm ³	5-10 mm ³
鼠耳 ^{*4}	4-10 mm ²	4-10 mm ²
鼠尾 ^{*4}	2-3 mm	2-3 mm
鼠趾 ^{*4}	1-2 根鼠趾	1-2 根鼠趾
植物叶片 ^{*5}	4-10 mm ²	4-10 mm ²
植物组织 ^{*5}	5-10 mm ³	5-10 mm ³

*1: 血液样本直接 PCR 即可获得较好的扩增效果。

- *2: 动物组织、鼠组织等推荐简单裂解后 PCR 扩增；若扩增片段比较短或容易扩增，也可以尝试进行直接 PCR 扩增。
- *3: 植物样本推荐直接 PCR 扩增；若扩增效果不好，可简单裂解后 PCR 扩增。
- *4: 本产品实验例展示在本公司官网 (www.agbio.com.cn) 此产品页：实验列表。使用前可参考该表格；我们后续还在不断拓展样本种类，持续更新该表格。

2. PCR 反应

1) 配制 PCR 反应液

首先按照下表所示配制 PCR 反应液^{*5}。然后将配制好的反应液放置于 PCR 仪中反应。

组分名称	反应终浓度	50 μ l 体系
2X Universal Direct PCR Master Mix (dye plus) ^{*6}	1X	25 μ l
Template	≤ 500 ng ^{*7}	-
Primer F (10 μ M)	0.2 μ M ^{*8}	1 μ l
Primer R (10 μ M)	0.2 μ M ^{*8}	1 μ l
RNase free water	-	Up to 50 μ l

*5: 为了获得更好的扩增特异性，建议在冰上配制反应液。

*6: 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。

*7: 使用纯化的 DNA 模板，一般推荐不超过 500 ng；直接 PCR 样本用量或简单裂解后的产物用量请参考上述“样本的处理”步骤中的推荐量。

*8: 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^{*14}）

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 ^{*9}	98°C	2 min	1
变性 ^{*10}	98°C	10 sec	} 30-35 ^{*13}
退火 ^{*11}	55°C	5 sec	
延伸 ^{*12}	72°C	30 sec / kb	
最终延伸	72°C	2 min	1

*9: 若扩增直接样本或简单裂解样本，一般可将预变性设置为 98°C 2 min（可在 1~5 min 范围内调整）。若扩增纯化后的 DNA 模板，根据不同的目的片段，可省略预变性步骤。

*10: 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。

*11: 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，退火时间可在 5 sec ~ 30 sec 范围内调整。

*12: 延伸速度一般推荐 30 sec / kb，可以在 10 sec ~ 1 min / kb 范围内调整。

*13: 一般推荐使用 30 个循环进行扩增, 若扩增条带较弱, 可尝试增加循环数。若为血液样本直扩, 推荐用 35 个循环。

*14: 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。

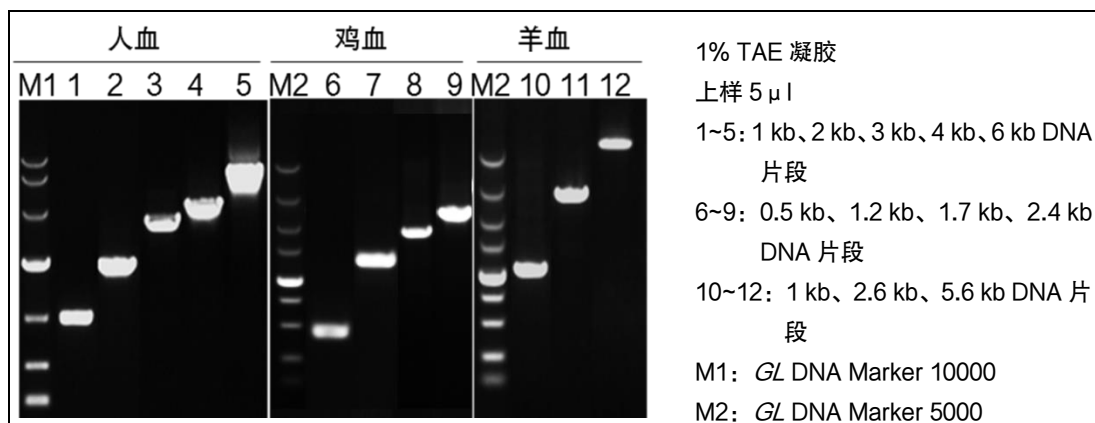
➤ 实验例

1. 采用本产品直接扩增不同物种的血液(含 EDTA 抗凝血剂), 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	15 sec	
72°C	3 min	

电泳结果如下图所示:

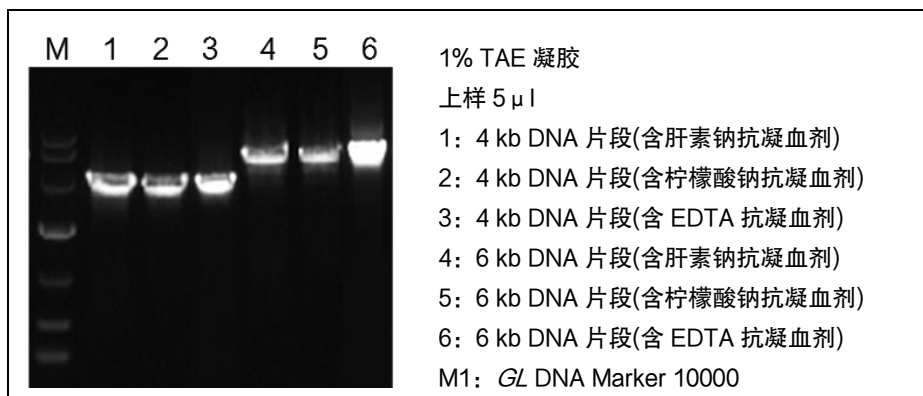


2. 采用本产品直接扩增不同抗凝血剂保存的人血, 都能获得很好的扩增效果。

反应程序:

温度	时间	循环数
98°C	2 min	1
98°C	10 sec	} 35
55°C	15 sec	
72°C	3 min	

电泳结果如下图所示:

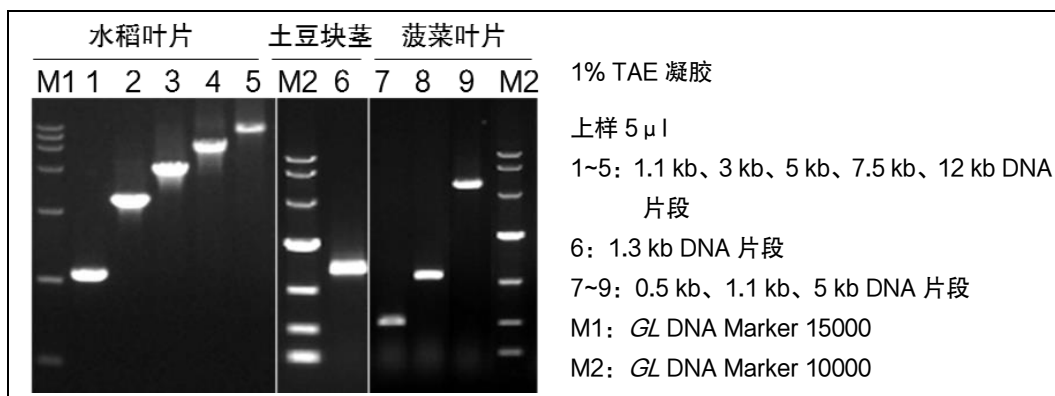


3. 采用本产品直接扩增不同植物样本，都能获得很好的扩增效果。

反应程序: 水稻叶片

温度	时间	循环数
98°C	2 min	1
98°C	10 sec	} 30
55°C	5 sec	
72°C	30 sec / kb	

电泳结果如下图所示：



4. 将水稻叶片、菠菜叶片、鼠尾等材料用蛋白酶K法简单裂解【使用公司产品 Lysis Buffer for PCR (Code No. AG12306)】，酵母用碱裂解法简单裂解；并以裂解产物为模板，采用本产品扩增不同的 DNA 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	2min	1
98°C	10 sec	} 30
55°C	5 sec	
72°C	18 sec ~ 40 sec / kb *	

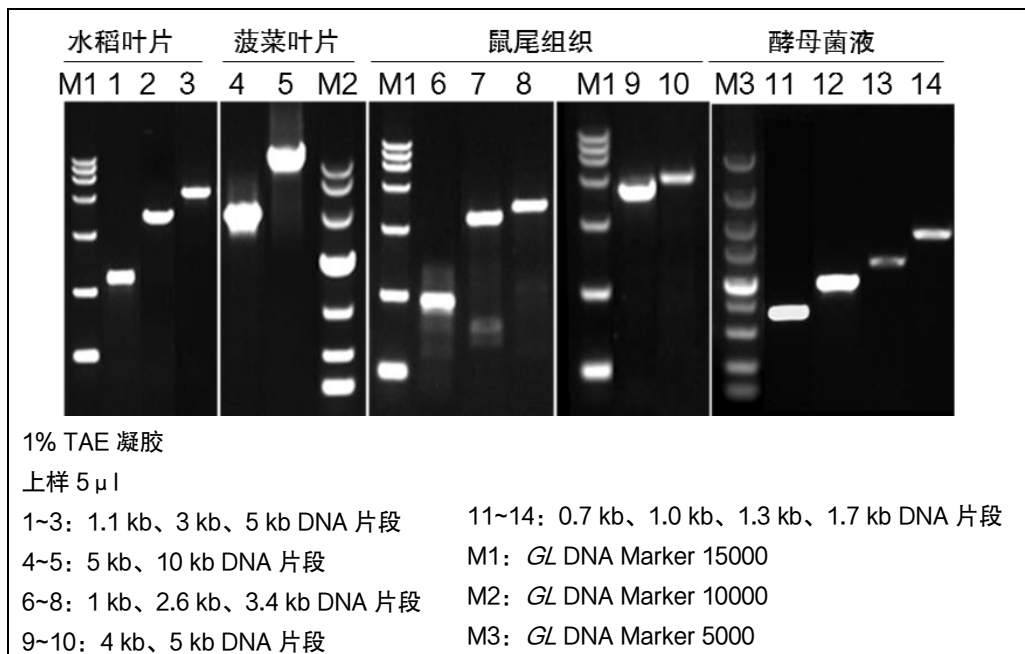
*: 水稻叶片延伸速度为 20 sec ~ 24 sec / kb;

*: 菠菜叶片延伸速度为 18 sec ~ 24 sec / kb;

*: 鼠尾组织延伸速度为 20 sec ~ 36 sec / kb;

*: 酵母菌液延伸速度为 20 sec ~ 40 sec / kb。

电泳结果如下图所示:



➤ 产品注意事项

1. 合适的模板

- ❖ 选择合适的模板类型和样本加入量: 根据样本核酸释放难易程度及基因扩增的难易程度, 选择合适的模板类型, 调整样本的加入量。可参考本公司官网上 (www.agbio.com.cn) 本产品的首页: 实验列表。若样本或基因容易扩增, 直接 PCR 即可获得较好的实验结果, 如血液样本; 若样本较难扩增, 选择简单裂解后扩增可获得更好的实验结果, 如鼠尾组织等。
- ❖ 直接生物样本或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, 可尝试减少样本加入量或将样本稀释后使用。
- ❖ 选择合适的裂解方式: 针对不同的样本, 碱裂解与蛋白酶 K 裂解效果存在一定差异, 如鼠尾组织使用蛋白酶 K 裂解效果更好, 而酵母菌丝则碱裂解效果更好。若扩增效果不好, 可尝试调整裂解方式。

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。

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。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：两步法 PCR 反应程序

(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	30 sec / kb	