

Version 2

Code No. AG11211

# *2X Accurate Taq* HS PCR 预混液（含 UNG，含染料）

# *2X Accurate Taq* HS PCR Master Mix (UNG and 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

本产品中引入了 dUTP/UNG 防污染系统，在 PCR 反应过程中以 dUTP 取代 dTTP，利用 UNG 酶能选择性水解含 dU 的 DNA 链，而对不含 dU 的 DNA 链没有任何影响的特性，除去 PCR 反应体系配制过程中引入的含 dU 的污染模板，从而可有效防止 PCR 假阳性结果的产生，提升结果的准确性。

本产品中添加了在常温状态下能够抑制 *Accurate Taq* 活性的单克隆抗体，可以进行 Hot Start PCR，有效地抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。使用本产品得到的 PCR 产物 3' 端带有一个 A 碱基，可直接克隆于 T 载体。

本产品为 2X PCR 反应预混液，只需要向预混液中加入引物、模板及水即可进行 PCR 反应。同时，本产品中加入了电泳指示剂，产品溶液呈现紫红色，PCR 反应结束后可以直接进行琼脂糖凝胶电泳。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。

## ➤ 产品组成

| 组分名称  | AG11211<br>(200 rxns / 50 $\mu$ l) |
|---|------------------------------------|
| 2X <i>Accurate Taq</i> HS PCR Master Mix (UNG and dye plus) | 1 ml x 5 pcs                       |
| RNase free water  | 1 ml x 5 pcs                       |

## ➤ 保存及运输

保存温度：-20°C 保存

运输温度：干冰运输或 -20°C 冰袋运输

## ➤ 产品优势

1. 本产品中引入了 dUTP/UNG 防污染系统，可除去含 dU 的 PCR 产物污染，从而有效防止出现 PCR 假阳性结果，提升实验结果的准确性。
2. 本产品采用了性能优越的 *Accurate Taq* HS 及优化的反应体系，能够有效抑制非特异性扩增。
3. 本产品是一种 2X 预混液，反应液配制十分简单，仅需加入引物、模板及水即可进行 PCR 反应。
4. 本产品中包含电泳指示剂，可在 PCR 反应结束后直接点样进行电泳，电泳时只有一条指示带，指示带呈现浅紫红色。

## ➤ 实验原理

### 1. PCR 扩增原理

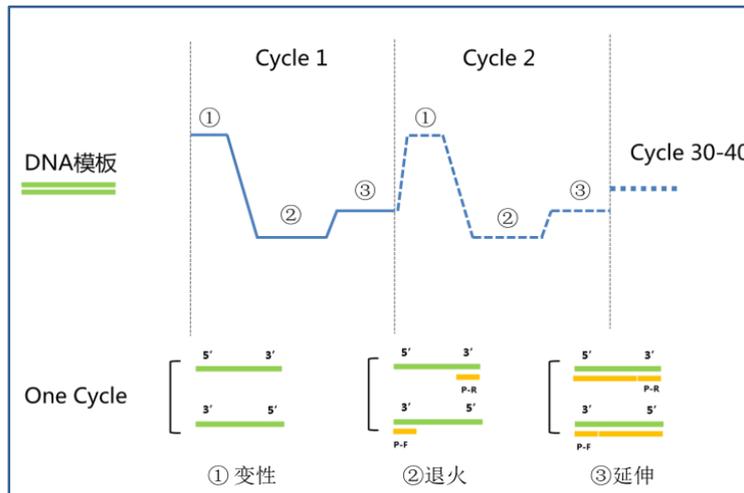
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核糖核苷三磷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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；

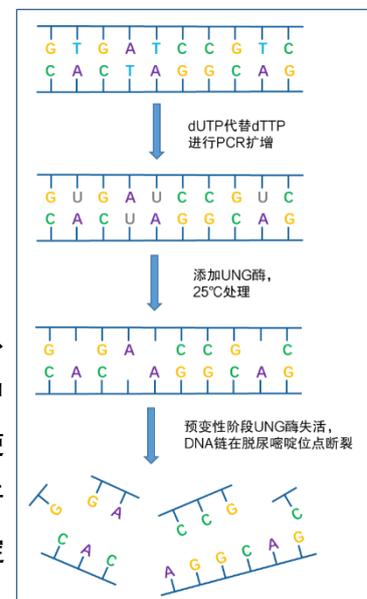
步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下延伸，与单链 DNA 形成互补链；



### 2. dUTP/UNG 防污染系统作用原理

扩增产物气溶胶污染，是 PCR 反应中最主要的污染，因为扩增产物拷贝量大，远远超过 PCR 检测拷贝的上限，所以极微量的 PCR 扩增产物气溶胶，就能造成假阳性结果，由于气溶胶污染难以通过常规方法消除，因此 UNG 酶应运而生。

尿嘧啶-N-糖基化酶 (Uracil-N-glycosylase, UNG) 可以选择性水解双链或单链 DNA 中尿嘧啶脱氧核糖核苷酸 (dU) 中的尿嘧啶糖苷键。如果在 PCR 反应中用 dUTP 代替 dTTP，使 PCR 扩增产物都是带有 dU 的 DNA 链，并在后续 PCR 反应开始前增加 25°C 的恒温步骤，那么 PCR 体系中污染模板的尿嘧啶



碱基会因 UNG 酶特异性切割  $\beta$ -N 尿嘧啶糖苷键而从 DNA 链上脱离，产生脱嘧啶位点。当反应经过预变性阶段 95°C，2 min 热处理后，DNA 污染模板在脱嘧啶位点处断裂，从而无法被扩增，避免了假阳性结果的产生，同时 UNG 酶被灭活，不再降解新产生的含有 dU 的 DNA 产物。

## ➤ 使用注意事项

1. 产品 2X *Accurate Taq* HS PCR Master Mix (UNG and dye plus) 使用前可短暂离心，将溶液收集至离心管底部，减少损失。
2. 产品中各组分均需要在 -20°C 保存，使用前于冰上充分溶解，轻柔混匀后再进行使用。
3. 反应体系建议在冰上配制，配制完成后放入 PCR 仪中进行反应。

## ➤ 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、涡旋振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪。

## ➤ 使用方法

### 1. 配制反应体系

按照下表在冰上配制反应液：

| 组分名称  | 反应终浓度                       | 50 $\mu$ l 体系    |
|---|-----------------------------|------------------|
| 2X <i>Accurate Taq</i> HS PCR Master Mix (UNG and dye plus) <sup>*1</sup> | 1 X                         | 25 $\mu$ l       |
| Primer F ( 10 $\mu$ M )   | 0.2 $\mu$ M <sup>*2</sup>   | 1 $\mu$ l        |
| Primer R ( 10 $\mu$ M )   | 0.2 $\mu$ M <sup>*2</sup>   | 1 $\mu$ l        |
| Template  | $\leq$ 500 ng <sup>*3</sup> | -                |
| RNase free water  | -                           | Up to 50 $\mu$ l |

\*1: 2X *Accurate Taq* HS PCR Master Mix (UNG and dye plus) 使用前可短暂离心，将溶液收集至离心管底部，减少损失。

\*2: 引物使用终浓度通常为 0.2  $\mu$  M；可根据实际需要在 0.1 ~ 1.0  $\mu$  M 范围内调整。

\*3: 通常情况下，建议模板添加量不高于 500 ng；可根据实际需要调整模板用量。

### 2. 反应条件（以三步法扩增为例<sup>\*4</sup>）

将含有反应液的 PCR 管放置于 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  |
|----------------------|------|------------|------|
| UNG 处理 <sup>*1</sup> | 25°C | 10 min     | 1    |
| 预变性                  | 95°C | 2 min      | 1    |
| 变性 <sup>*2</sup>     | 94°C | 30 sec     | } 30 |
| 退火                   | 55°C | 30 sec     |      |
| 延伸 <sup>*3</sup>     | 72°C | 1 min / kb |      |
| 最终延伸                 | 72°C | 2 min      | 1    |

\*1: 建议在 25°C, 10 min 条件下进行 UNG 处理, 能够充分降解含 dU 的污染模板; 可根据实际需求在 2 ~ 10 min 范围内调整处理时间。

\*2: PCR 变性条件可根据设备及反应管种类进行设定。一般设定为 98°C 5 ~ 10 sec 或 94°C 20 ~ 30 sec。

\*3: 使用 dUTP 替代 dTTP, 有时 PCR 扩增效率会有所下降, 当扩增效率较低时, 可适当延长延伸时间。

\*4: 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 2 ~ 5 μl PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测产物浓度及特异性。

### ➤ 实验例

- 以 100 ng 的 HL60 gDNA 为模板, 利用本产品扩增 500 bp 的 DNA 片段, 同时用 RNase free water 代替 2X *Accurate Taq* HS PCR Master Mix (UNG plus) 进行 PCR 扩增, 作为残留模板对照组 (第一轮 PCR 扩增)。

取 2 μl 第一轮 PCR 扩增产物作为第二轮 PCR 扩增的模板。第二轮 PCR 扩增中, 分为三个组别: 组别 1 试剂未处理, 以第一轮利用本产品进行 PCR 扩增得到的产物作为模板; 组别 2 试剂进行 UNG 失活处理 (95°C 2 min), 以第一轮利用本产品进行 PCR 扩增得到的产物作为模板; 组别 3 试剂未处理, 以第一轮利用 RNase free water 进行 PCR 扩增得到的残留模板产物作为模板; 扩增方法和第一轮 PCR 扩增保持一致, 结果的差异确认了本产品的模板消除能力。

反应程序:

| 温度   | 时间     | 循环数  |
|------|--------|------|
| 25°C | 10 min | 1    |
| 95°C | 2 min  | 1    |
| 94°C | 30 sec | } 30 |
| 55°C | 30 sec |      |
| 72°C | 30 sec |      |
| 72°C | 2 min  | 1    |

电泳结果如下图所示：

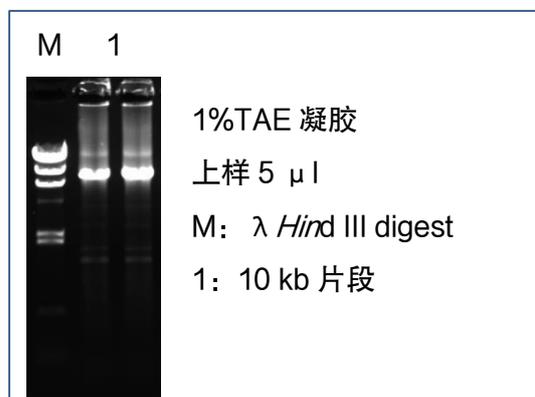


2. 以  $\lambda$  DNA 为模板，利用本产品能扩增出约 10 kb 的 DNA 片段。

反应程序：

| 温度   | 时间     | 循环数 |
|------|--------|-----|
| 25°C | 10 min | 1   |
| 95°C | 2 min  | 1   |
| 98°C | 5 sec  | 30  |
| 68°C | 10 min |     |
| 72°C | 10 min | 1   |

电泳结果如下图所示：

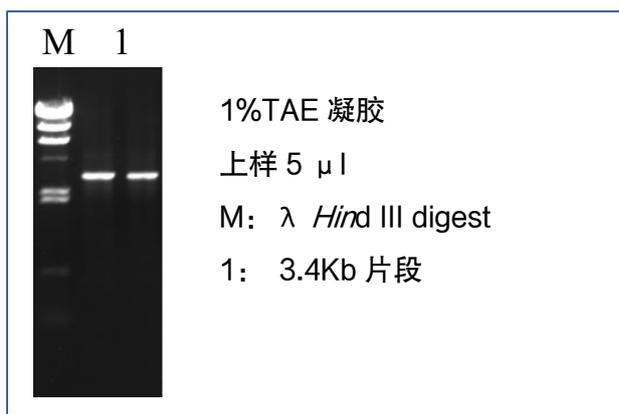


3. 以 HL 60 gDNA 为模板，利用本产品扩增约 3.4 kb 的 DNA 片段，得到明亮且单一的目的条带。

反应程序：

| 温度   | 时间     | 循环数 |
|------|--------|-----|
| 25°C | 10 min | 1   |
| 95°C | 2 min  | 1   |
| 98°C | 10 sec | 30  |
| 68°C | 5 min  |     |
| 72°C | 6 min  | 1   |

电泳结果如下图所示：

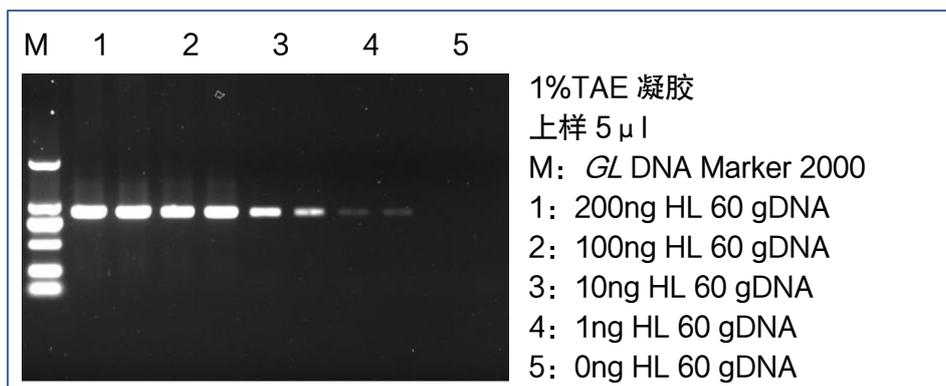


4. 以 HL 60 gDNA 为模板，添加不同模板量（200 ng、100ng、10ng、1ng），利用本产品扩增约 1 kb 的 DNA 片段，模板量低至 1 ng 时仍然能扩增出目的条带。

反应程序：

| 温度   | 时间     | 循环数  |
|------|--------|------|
| 25°C | 10 min | 1    |
| 95°C | 2 min  | 1    |
| 94°C | 30 sec | } 30 |
| 55°C | 30 sec |      |
| 72°C | 1 min  |      |
| 72°C | 2 min  | 1    |

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，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、完整性会严重影响 PCR 反应。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。采用高质量高纯度的 DNA 模板，可提高 PCR 反应的成功率。

## 2. 合适的引物

- ❖ 引物浓度低：可能会导致反应效率低。
- ❖ 引物浓度高：可能会导致反应特异性不好。
- ❖ 引物完整性不好：可能会导致无扩增产物。
- ❖ 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，尽量减小两者的 Tm 值差，并使差值不超过 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，尤其是 3' 端，否则可能会形成引物二聚体而产生非特异的扩增条带。
- ❖ 合适的引物浓度为 0.1~ 1.0 μM。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

- ❖ 变性时间过长或温度过高，可能导致 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  |
|--------|------|------------|------|
| UNG 处理 | 25°C | 10 min     | 1    |
| 预变性    | 95°C | 2 min      | 1    |
| 变性     | 94°C | 30 sec     | } 30 |
| 延伸     | 68°C | 1 min / kb |      |
| 最终延伸   | 72°C | 2 min      | 1    |