Version 3

Code No. AG12211

ApexHF HS DNA 聚合酶预混液-FCL

ApexHF HS DNA Polymerase FCL Master Mix

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

ApexHF HS DNA Polymerase FCL Master Mix 是优化后的兼顾扩增成功率和扩增速度的 2 倍浓度高保真酶预混液。本产品具有高扩增效率、高特异性、高保真性、高退火效率及快速扩增等特点，2 kb 以内片段扩增速度最快可达 1 sec / kb，最长可扩增~ 40 kb 的 DNA 片段，同时对高 GC、高 AT 含量及低起始量的模板都能进行有效的扩增，只需向预混液中加入模板和引物即可进行扩增，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。

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，有效的抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。

➢ 产品组成

组分名称	AG12211 (100 rxns / 50 μl)
ApexHF HS DNA Polymerase FCL Master Mix	850 μl X 3 pcs

➢ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

运输温度：干冰运输或-20℃冰袋运输

➢ 产品优势

1. 延伸速度快：2 kb 以内片段扩增速度最快可达 1 sec / kb，2 ~ 6kb 片段扩增速度最快可达 5 sec / kb，6 ~10kb 片段扩增速度最快可达 10 sec / kb。
2. 模板适用性广：适合各种精提样本，兼容动植物裂解产物、血液、菌液等粗模板。
3. 适合长片段扩增：以 λ DNA 为模板，可扩增长达 40 kb 的 DNA 片段；以 Human gDNA 为模板，可扩增长达约 32 kb 的 DNA 片段。
4. 优化的反应体系，对简单或复杂模板、短片段或长片段 PCR 扩增都具有良好的适应性。对于高 GC 含量、高 AT 含量及低起始量的模板都能进行有效的扩增。
5. 添加了能够抑制 DNA 聚合酶活性的单克隆抗体，在进行 PCR 反应前，抗体与酶结合抑制 DNA 聚合酶的活性，有效抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。
6. 本产品是 2X 的预混液，仅需添加模板和引物即可进行 PCR 扩增，操作简便。

➢ 实验原理

PCR 扩增原理

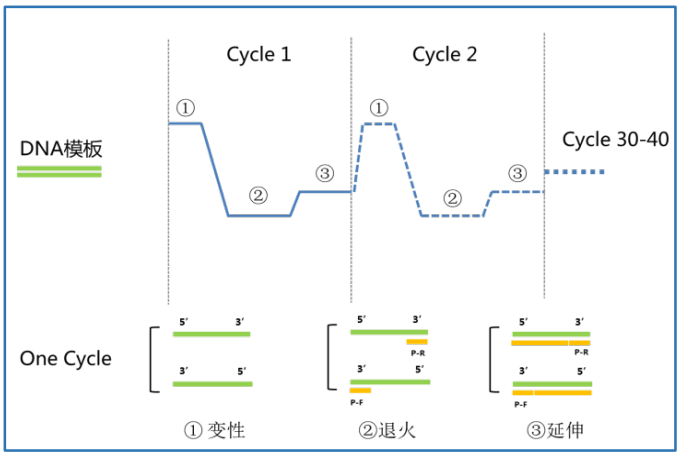
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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；

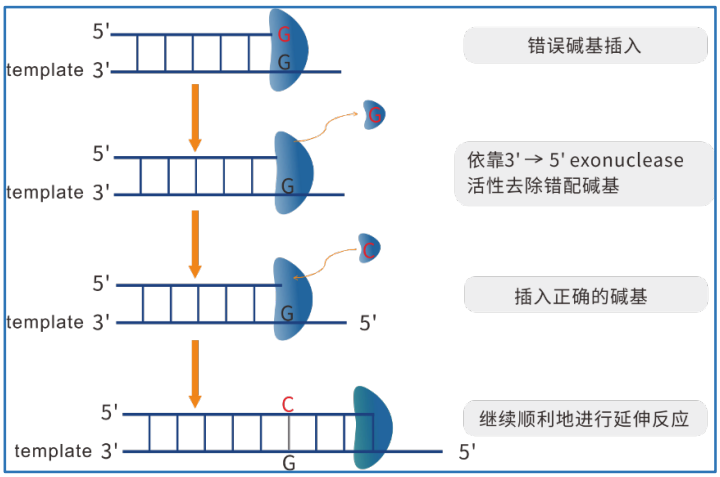
步骤②：引物与单链 DNA 退火；

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。



高保真酶原理

高保真酶具有 3′ → 5′ Exonuclease 活性 (Proof reading 活性)，PCR 过程中如果出现碱基错配，它能利用其外切酶活性，切除错配的碱基，从而保证了扩增的准确性。



➢ 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） 配制 PCR 反应液

首先按照下表冰上配制反应液：

组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
ApexHF HS DNA Polymerase FCL Master Mix[*1]	1x	25 μl
Template	≤500 ng[*2]	–
Primer F (10 μM)	0.2 μM[*3]	1 μl
Primer R (10 μM)	0.2 μM[*3]	1 μl
RNase free water	–	up to 50 μl

*1：该溶液要避免反复冻融，使用前先离心，将所有的溶液收集至离心管底部，然后再进行使用，减少损失；使用时应轻柔混匀（避免起泡），缓慢吸取。

*2：通常模板添加量不高于 500 ng，可获得良好的扩增效果。若以 cDNA 为模板时，建议不高于 250 ng（模板量相当于 Total RNA 的量）。

*3：引物通常使用终浓度为 0.2 μM，可根据实验结果在 0.1 ~ 0.4 μM 范围内调整。

2） 反应条件（以三步法 PCR 扩增为例[*7]）

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	94℃	1 min[*1]	1
变性[*2]	98℃	10 sec	30 ~ 35[*6]
退火	55℃ or 60℃[*3]	15 sec	
延伸	68℃[*5]	–[*4]	

*1：对于普通模板，可省略预变性步骤；对于复杂模板，如高 GC 或者长片段，建议将预变性设置为 94℃ 30 sec ~ 2 min。

*2：变性条件的设定可根据设备进行调整，一般 94℃ 10 ~ 15 sec，98℃ 5 ~ 10 sec。

*3：一般建议 Tm 值高于 55℃ 时，退火温度设置为 60℃；Tm 值低于 55℃ 时，退火温度设置为 55℃。也可根据实际情况进行调整，如扩增产量低可尝试降低退火温度，扩增特异性差可适当提升退火温度或者使用两步法扩增。

*4：延伸时间可以根据需求进行调整：6 kb 以内片段延伸速度为 5 sec / kb，如追求更快速度，2 kb 以内可尝试 1 sec / kb；6~10 kb 片段延伸速度为 10 sec / kb；10 kb 以上片

段延伸速度为 20 ~ 30 sec / kb；较复杂片段（如 GC 含量较高、粗裂模板）、模板量较低或者扩增结果不理想时建议延长延伸时间。

*5：两步法 PCR 与三步法 PCR，延伸温度都可以设置为 68℃。

*6：一般推荐使用 30 个循环进行扩增，若扩增条带较弱，可尝试增加循环数至 35 个循环。

*7：当引物 Tm 值较高或三步法 PCR 扩增结果不好时，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。

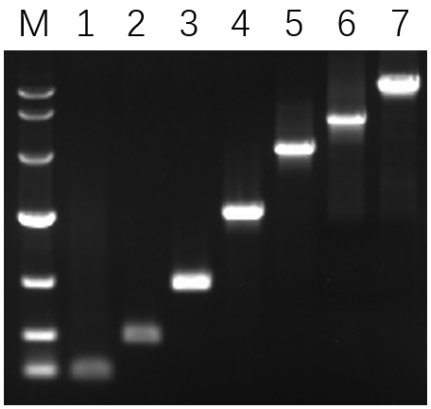
➢ 实验例

1. 以人基因组 DNA 为模板，使用本产品可以用不同延伸速度扩增不同长度的 DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
98℃	10 sec	30
55℃	15 sec	
68℃	–	

电泳结果如下图所示：



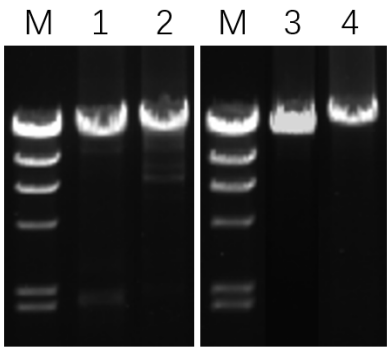
1% TAE 凝胶
上样 5 μl
1：人基因组 DNA – 248bp – 1s/kb
2：人基因组 DNA – 500bp – 1s/kb
3：人基因组 DNA – 1kb – 1s/kb
4：人基因组 DNA – 2kb – 1s/kb
5：人基因组 DNA – 4kb – 5s/kb
6：人基因组 DNA – 6kb – 5s/kb
7：人基因组 DNA – 10kb – 10s/kb
M：*GL* DNA Marker 10000

2. 以 Human gDNA 和 λ DNA 为模板，用本产品扩增不同长度的 DNA 片段，分别能够扩增出 32 kb 和 40 kb 的 DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
98℃	10 sec	30
68℃	10 min	

电泳结果如下图所示：



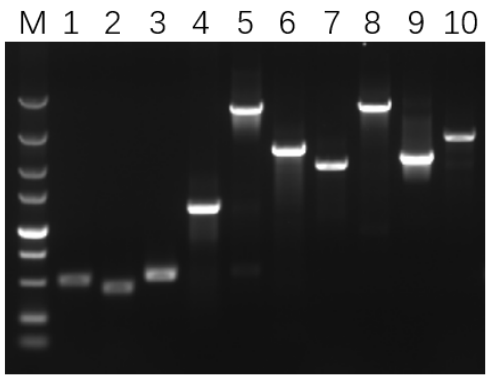
1% TAE 凝胶
上样 5 μl
1：人基因组 DNA – 20 kb 片段
2：人基因组 DNA – 32 kb 片段
3：λ DNA – 32 kb 片段
4：λ DNA – 40 kb 片段
M：λ –*Hind* Ⅲ digest

3. 以 Human、Mouse、Chicken gDNA 为模板，使用本产品以 5 sec / kb 的扩增速度，扩增 GC 含量不同的 DNA 片段，对高 GC 与高 AT 的 DNA 片段都有很好的扩增。

反应程序：

温度	时间	循环数
98℃	10 sec	30
60℃	15 sec	
68℃	5 sec / kb	

电泳结果如下图所示：



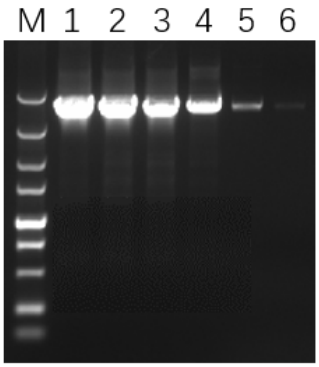
1% TAE 凝胶
上样 5 μl
1：Human–512 bp DNA 片段（GC 含量 75.4%）
2：Human–446 bp DNA 片段（GC 含量 83.4%）
3：Human–538 bp DNA 片段（GC 含量 35.7%）
4：Chicken–1.2 kb DNA 片段（GC 含量 70.2%）
5：Human–4 kb DNA 片段（GC 含量 38.2%）
6：Human–2.3 kb DNA 片段（GC 含量 70%）
7：Human–2.1 kb DNA 片段（GC 含量 72.3%）
8：Human–4 kb DNA 片段（GC 含量 63.1%）
9：Human–2.1 kb DNA 片段（GC 含量 26.9%）
10：Mouse–2.6 kb DNA 片段（GC 含量 65.2%）
M：*GL* DNA Marker 5000

4. 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），用本产品扩增 4 kb DNA 片段，可扩增出 100 pg 模板量的 DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
98℃	10 sec	30
55℃	15 sec	
68℃	2 min	

电泳结果如下图所示：



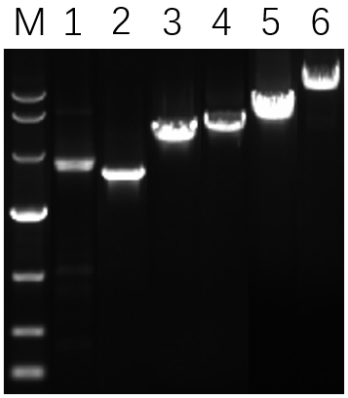
1% TAE 凝胶
上样 5μl
1：模板添加量为 500 ng 的扩增片段
2：模板添加量为 200 ng 的扩增片段
3：模板添加量为 100 ng 的扩增片段
4：模板添加量为 10 ng 的扩增片段
5：模板添加量为 1 ng 的扩增片段
6：模板添加量为 100 pg 的扩增片段
M：*GL* DNA Marker 5000

5. 将鼠尾、水稻叶片等样本用蛋白酶 K 法简单裂解【使用本公司产品 Lysis Buffer for PCR（Code No. AG12306）】，取 2μl 简单裂解产物使用本产品进行扩增，均能获得很好的扩增效果；同时使用本产品直接扩增 2μl 人血样本和大肠杆菌菌液样本也能获得很好的扩增效果。

反应程序:

温度	时间	循环数
98℃	10 sec	30
55℃	15 sec	
68℃	30 sec / kb	

电泳结果如下图所示：



1% TAE 凝胶
上样 5μl
1：鼠尾裂解液 －3.4 kb
2：水稻裂解液 －3 kb
3：水稻裂解液 －5 kb
4：人血模板 －6 kb
5：大肠杆菌菌液 －6.7kb
6：大肠杆菌菌液 －11kb
M：*GL* DNA Marker 10000

➢ 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。
   - ❖ 模板的纯度及完整性影响 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 个碱基连续互补序列。
   - ❖ 合适的引物浓度为 0.1 ~ 0.4 μ 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. **合适的变性温度及时间**
   - ❖ 对于普通模板，可省略预变性步骤；对于复杂模板，如高 GC 或者长片段，建议将预变性设置为 94℃ 30 sec ~ 1 min。亦可根据实际情况进行调整，但时间过长，可能会影响 DNA 聚合酶活性。
   - ❖ 变性时间过长或温度过高，可能导致非特异性扩增、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 30 ~ 35 个循环。

6. **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℃	30 sec / kb	