Version 3

Code No. AG12203

ApexHF HS DNA 聚合酶-FL

ApexHF HS DNA Polymerase FL

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 FL 是本公司开发的非常适合长片段扩增的高保真 DNA 聚合酶，具有保真性高、扩增效率高、退火效率高及延伸速度快等特点，以 Human gDNA 为模板，可扩增长达约 30 kb 的 DNA 片段。本产品中的 PCR 反应体系经过了优化，添加了独特的延伸因子，提高了退火效率与加快了延伸速度，从而缩短了延伸时间，大大减少了 PCR 反应的时间。本产品也适用于扩增高 GC 含量的模板。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	AG12203 （100 rxns/ 50 μl）
ApexHF HS DNA Polymerase FL（1 U/μl）	100 μl
5X *ApexHF* FL Buffer（Mg^{2+} plus）*	1 ml
dNTP Mix（10 mM each）	100 μl

*：5X *ApexHF* FL Buffer（Mg^{2+} plus）中的 Mg^{2+}浓度为 5 mM。

➢ 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

➢ 活性定义

在 74℃、30 分钟内，以活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物，将 10 nmol 脱氧核苷酸摄入到酸不溶物质所需的酶活性定义为 1 个活性单位（U）。

➢ 产品优势

1. *ApexHF* HS DNA Polymerase FL 是一种高保真 DNA 聚合酶，具有扩增效率高、退火效率高及延伸速度快等特点。
2. 非常适合长片段扩增，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 30 kb 的 DNA 片段。
3. 适合复杂结构的 DNA 片段扩增，如高 GC 的 DNA 片段。

4. 本产品中添加了能够抑制 DNA polymerase 活性的单克隆抗体，可以进行热启动反应。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。
5. 优化的反应体系，缩短延伸时间，提高 PCR 反应效率。
6. 模板的适用性广，可以进行以 cDNA 为模板的高效 PCR 反应。

➢ 实验原理

PCR 扩增原理

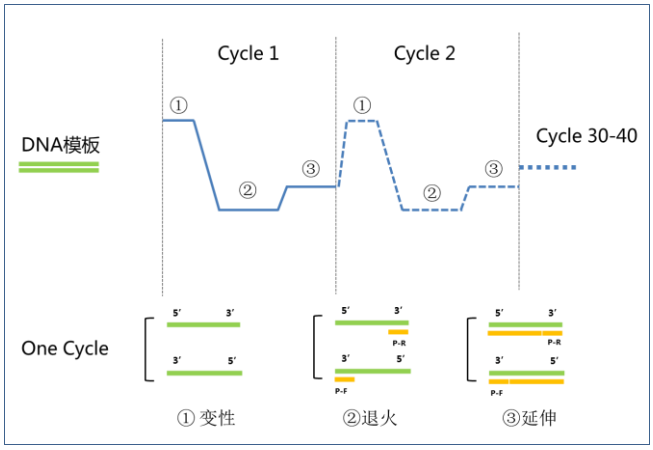
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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；

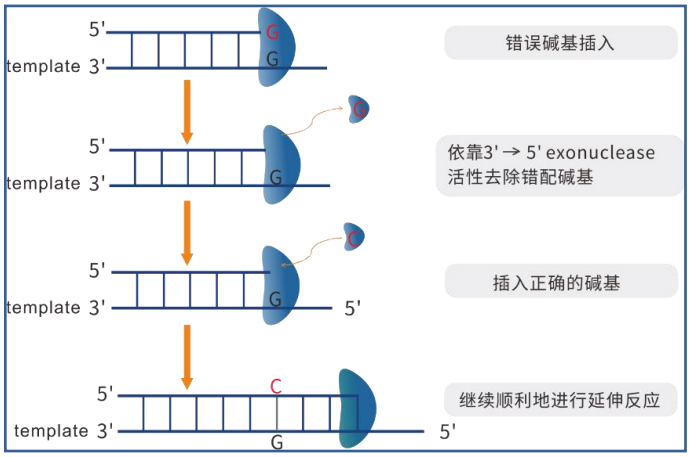
步骤②：引物与单链 DNA 退火；

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。



➢ 使用注意事项

1) *ApexHF* HS DNA Polymerase FL 使用前先离心，将所有的酶液收集至离心管底部，然后再进行使用，减少损失；酶保存液中甘油浓度较高，使用时应轻柔混匀（避免起泡），应缓慢吸取。

2) 本产品各组分需要在-20℃保存，使用前于冰上溶解后，轻柔混匀并离心后再进行使用。

➢ 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

组分名称	反应终浓度	50μl 体系
ApexHF HS DNA Polymerase FL（1 U/μl）*1	1 U	1μl
5×*ApexHF* FL Buffer（Mg^{2+} plus）	1X	10μl
dNTP Mix（10 mM each）	0.2 mM	1μl
Template	≤ 500 ng*2	–
Primer F (10μM)	0.2μM*3	1μl
Primer R (10μM)	0.2μM*3	1μl
RNase free water	–	Up to 50μl

*1：*ApexHF* HS DNA Polymerase FL 使用前先离心，将所有的酶液收集至离心管底部，然后再进行使用，减少损失；酶保存液中甘油浓度较高，使用时应轻柔混匀（避免起泡），缓慢吸取。

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

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

2） 反应条件 （以三步法 PCR 扩增为例*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	94℃	1 min*1	1
变性	98℃	10 sec*2	25-35
退火	55℃ or 60℃*3	15 sec	
延伸	68℃	30 sec / kb*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~1 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：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℃。

*4：延伸速度一般设置为 30 sec/ kb，可根据实际情况在 5 sec ~ 1 min / kb 内进行调整。片段≤10 kb，可在 5 ~30 sec / kb 调整；片段≥10 kb，可在 30 sec~ 1 min / kb 调整。两步法 PCR 和三步法 PCR，延伸温度都可以设置为 68℃。

*5：当三步法 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。

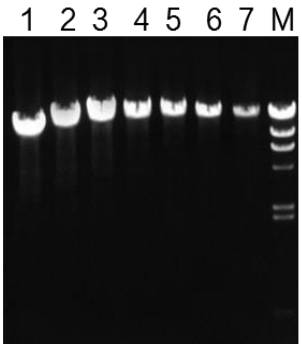
➢ 实验例

1. 采用本产品扩增不同长度的 DNA 片段，以 λ DNA 为模板（泳道 1~7），可扩增 40 kb 的片段；以 Human gDNA 为模板（泳道 8~10），可很好的扩增出 30 kb 的 DNA 片段。

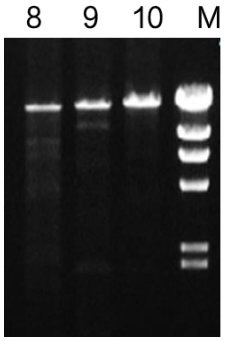
反应程序：

温度	时间	循环数
98℃	10 sec	30
68℃	15 min	

电泳结果如下图所示：



1% TAE 凝胶
上样 5μl
1：10 kb 片段
2：12 kb 片段
3：15 kb 片段
4：24 kb 片段
5：30 kb 片段
6：35 kb 片段
7：40 kb 片段
M：λ-*Hin*d III DNA Marker



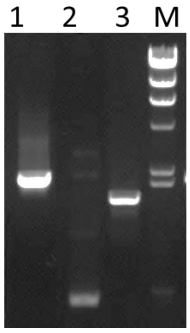
1% TAE 凝胶
上样 5μl
8：20 kb 片段
9：24 kb 片段
10：30 kb 片段
M：λ-*Hin*d III DNA Marker

2. 以 Human gDNA 为模板，采用本产品扩增 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
68℃	1 min	

电泳结果如下图所示：



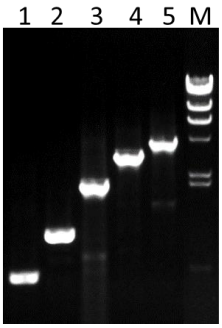
1% TAE 凝胶
上样 5μl
1：2 kb DNA 片段（GC 含量 26.9%）
2：500 bp DNA 片段（GC 含量 75.4%）
3：1.6 kb DNA 片段（GC 含量 64.3%）
M：λ－*Hin*d III DNA Marker

3. 以 Human gDNA（泳道 1~5）或 λ DNA（泳道 6~10）模板，采用本产品进行快速扩增不同长度的 DNA 片段，可获得很好的扩增。

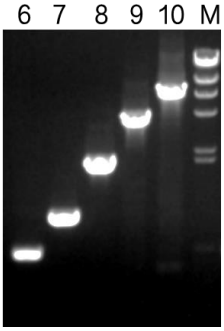
反应程序:

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

电泳结果如下图所示：



1% TAE 凝胶
上样 5μl
1：0.5 kb DNA 片段
2：1 kb DNA 片段
3：2 kb DNA 片段
4：3 kb DNA 片段
5：4 kb DNA 片段
M：λ－*Hin*d III DNA Marker



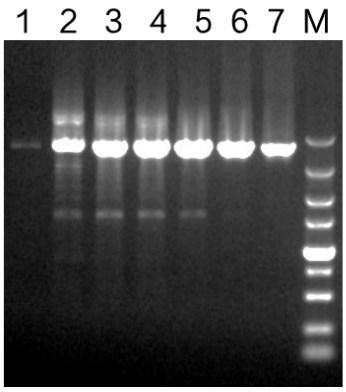
1% TAE 凝胶
上样 5μl
6：0.5 kb DNA 片段
7：1 kb DNA 片段
8：2 kb DNA 片段
9：4 kb DNA 片段
10：6 kb DNA 片段
M：λ－*Hin*d III DNA Marker

4. 以 Human gDNA 为模板，添加不同模板量（1 ng、10 ng、100 ng、200 ng、500 ng、1μg、1.5μg），采用本产品扩增 4 kb DNA 片段，模板量低至 1 ng 时，可扩增出 4 kb DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
98℃	10 sec	30
55℃	15 sec	
68℃	4 min	

电泳结果如下图所示：



1% TAE 凝胶
上样 5μl
1：模板添加量为 1 ng 的扩增片段
2：模板添加量为 10 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 200 ng 的扩增片段
5：模板添加量为 500 ng 的扩增片段
6：模板添加量为 1μg 的扩增片段
7：模板添加量为 1.5μg 的扩增片段
M：*GL* DNA Marker 5000

➢ 产品注意事项

1. 合适的模板

- 模板加入量低时，扩增效率低，扩增特异性高；模板加入量高时，扩增效率高，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

- 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、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。
- 引物 3’端避免出现发夹结构。
- 减少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 0.1~0.4μM。引物浓度降低时，扩增效率降低，反应特异性提高。引物浓度升高时，扩增效率提高，反应特异性降低。

3. DNA 聚合酶浓度

- *ApexHF* HS DNA Polymerase FL 的酶量添加推荐浓度是 1U / 50μl 的反应体系。酶量过多，可能会导致扩增特异性降低；酶量减少，可能会导致扩增效率降低。本产品中，反应体系中若将酶量增加至 2 倍，可加快 PCR 反应速度。可根据实验结果进行调整优化。

4. Mg^{2+}浓度

- 用 *ApexHF* HS DNA Polymerase FL 进行 PCR 反应，较理想的 Mg^{2+}浓度是 1.0 mM。Mg^{2+}浓度过低，会影响 PCR 扩增，导致 PCR 产物产量低；浓度过高，则可能会降低 PCR 的特异性。

5. **dNTPs 浓度**
   - 本产品的反应体系中，推荐的 dNTPs 终浓度 200 μ M。
   - dNTPs 浓度过高，可能会与 Mg^{2+}结合，影响 DNA 聚合酶活性；同时，高浓度的 dNTPs 会降低扩增特异性，产生 smear 带。
   - dNTPs 浓度过低，可能会降低扩增效率。

6. **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。

7. **延伸温度及时间**
   - *ApexHF* HS DNA Polymerase FL 一般将延伸温度设置为 68℃可获得很好的扩增。延伸速度推荐设置为 30 sec / kb，当扩增片段较短时，为提高扩增速度，可尝试缩短延伸时间，在 5 sec ~ 1 min / kb 内进行调整。

8. **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。

9. **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。
   - 每次实验最好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	25-35
延伸	68℃	30 sec / kb	