

Version 3

Code No. AG12204

ApexHF HS DNA 聚合酶-CL

ApexHF HS DNA Polymerase CL

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

ApexHFHS DNA Polymerase CL 是一款具有高特异性及优良扩增性的高保真 DNA 聚合酶。本产品对简单或复杂模板、短片段或长片段 PCR 扩增都具有良好的适应性，特别适用于长片段 PCR 扩增，同时，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。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。本产品中的反应体系经过了优化，对粗提样本也能进行很好的扩增。

➤ 产品组成

组分名称	AG12204 (50 rxns/ 50 μl)
<i>ApexHFHS DNA Polymerase CL</i> (1 U/ μl)	50 μl
2X <i>ApexHFCL Buffer</i> (Mg ²⁺ and dNTP plus) *	1.25 ml

*：2X *ApexHFCL Buffer* (Mg²⁺ and dNTP plus) 中的 Mg²⁺ 浓度为 2 mM, dNTP 浓度各 400 μM。

➤ 保存及运输

保存温度：-20°C 保存

运输温度：干冰运输或者-20°C 冰袋运输

➤ 活性定义

在 74°C、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. *ApexHFHS DNA Polymerase CL* 是一种高保真 DNA 聚合酶，扩增效率高。
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 32 kb 的 DNA 片段。
3. 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。
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. 对粗提样本也能进行很好的扩增。

➤ 实验原理

PCR 扩增原理

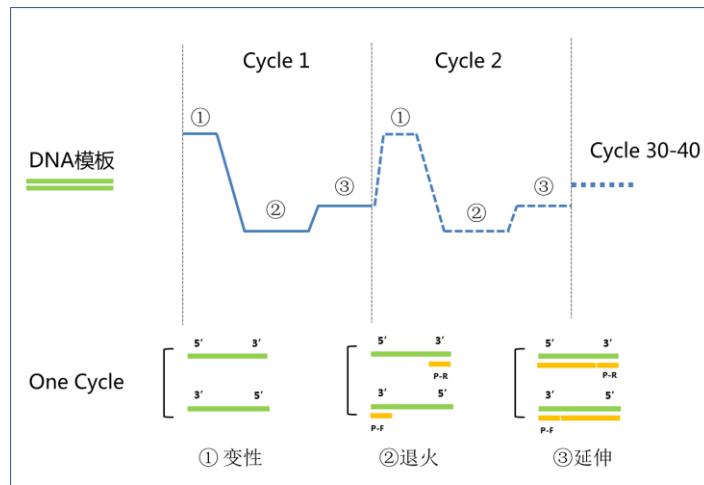
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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；

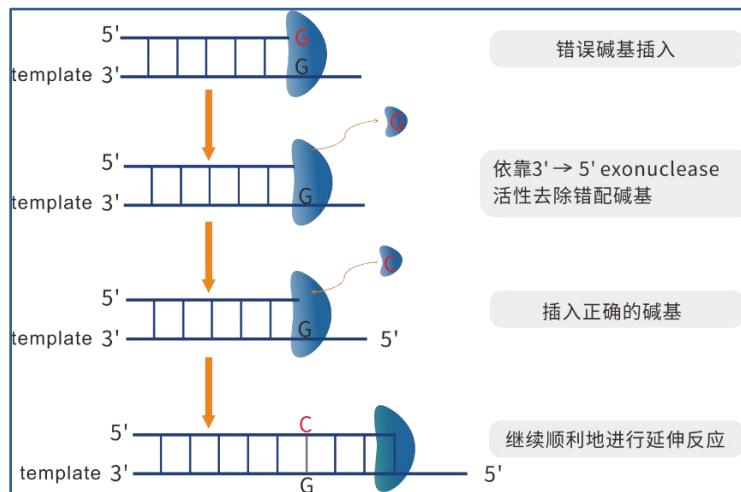
步骤②：引物与单链 DNA 退火；

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。



高保真酶原理

高保真酶具有 $3' \rightarrow 5'$ 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) *ApexHFHS DNA Polymerase CL* 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) 本产品各组分需要在-20°C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

首先按照下表所示配制 PCR 反应液。

组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
<i>ApexHFHS DNA Polymerase CL</i> (1 U/μl) ^{*1}	1 U	1 μl
2X <i>ApexHFCL Buffer</i> (Mg ²⁺ and dNTP plus)	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: *ApexHFHS DNA Polymerase CL* 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 0.2 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）

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°C	1 min ^{*1}	1
变性	98°C	10 sec ^{*2}	
退火	55°C or 60°C ^{*3}	15 sec	
延伸	68°C ^{*5}	30 sec / kb ^{*4}	{ 25–35 }



- *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°C 30 sec ~1 min。
- *2: 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。
- *3: Tm 值高于 55°C 时，退火温度设置为 60°C；Tm 值低于 55°C 时，退火温度设置为 55°C。
- *4: 延伸速度一般设置为 30 sec / kb，可根据实际情况在 10 sec ~ 1 min / kb 内进行调整。片段小于 10 kb，可在 10 sec ~ 30 sec / kb 内进行调整，片段大于 10 kb，可在 30 sec ~ 1 min / kb 内进行调整。若是粗提样品，建议将延伸速度设置为 1 min / kb。
- *5: 两步法 PCR 与三步法 PCR，延伸温度都可以设置为 68°C。
- *6: 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 反应程序见附录）。

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。

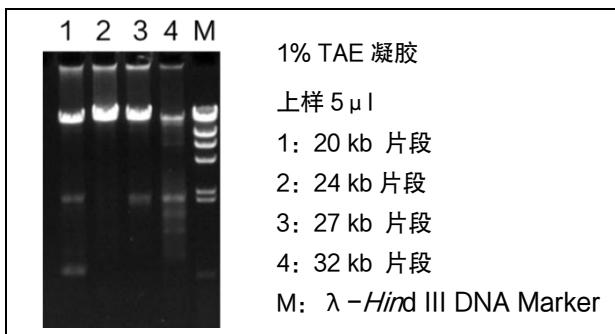
➤ 实验例

1. 采用本产品扩增不同长度的 DNA 片段，以 Human gDNA 为模板，可扩增出长达 32 kb 的 DNA 片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	10 sec	
68°C	15 min	30

电泳结果如下图所示：



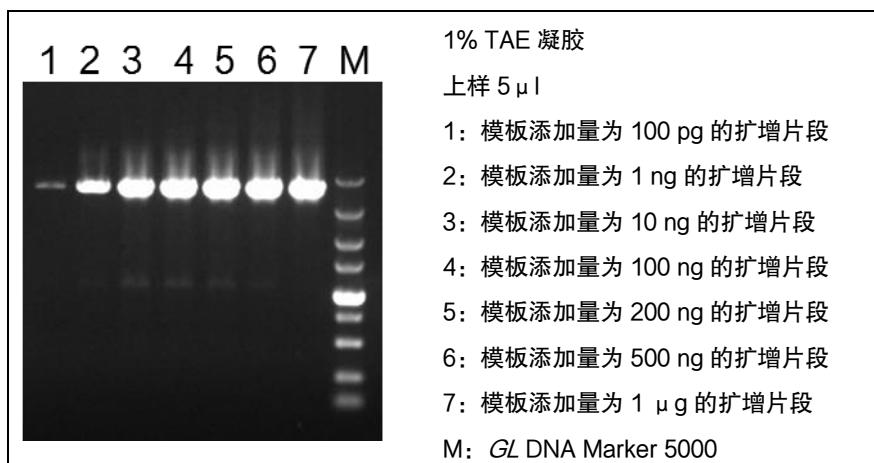
2. 以 Human gDNA 为模板，添加不同模板量 (100 pg、1 ng、10 ng、100 ng、200 ng、500 ng、1 μg)，采用本产品扩增 4 kb 的 DNA 片段，可扩增出模板添加量为 100 pg 模板量的 DNA 片段。

反应程序：

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



电泳结果如下图所示：

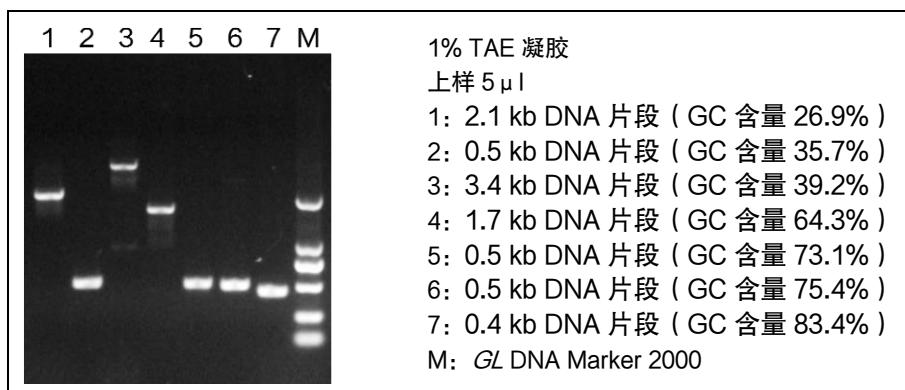


3. 以 Human gDNA 为模板，采用本产品扩增 GC 含量不同的 DNA 片段，对高 GC 与高 AT 的 DNA 片段都有很好的扩增。

反应程序：

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	10 sec	
68°C	2 min	30

电泳结果如下图所示：



4. 将西红柿籽、菠菜叶片、豆芽尖、鼠尾等材料按照下述方法进行粗提取，并以此为模板，采用本产品扩增不同的 DNA 片段。

粗提方法：

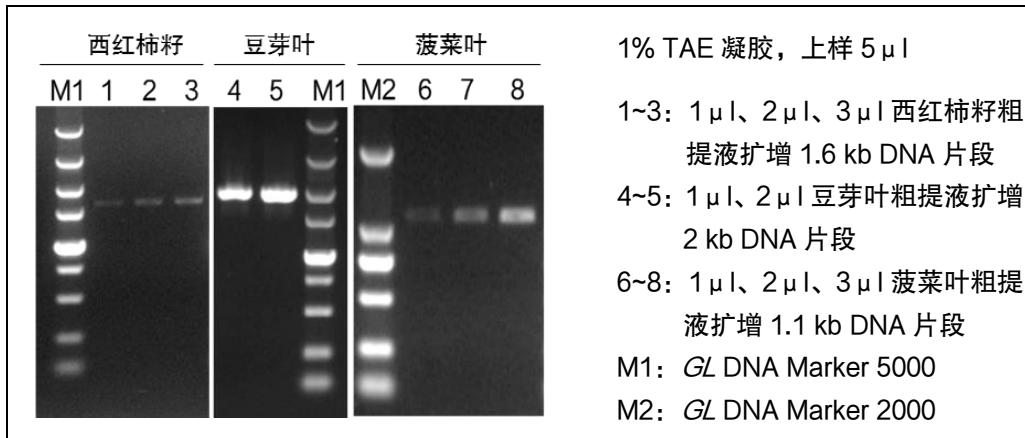
- ① 取一定量的生物材料（小鼠尾 ≤ 2 mm，小鼠耳 ≤ 5 mm²，植物 ≤ 5 mm²），加入 100 μl 的提取 Buffer【组分：20 mM Tris-HCl (pH8.0), 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% SDS】和 1 μl 蛋白酶 K (20 mg / ml)；
- ② 60°C 反应 5 min，然后 98°C 反应 2min；

- ③ 室温下离心；
- ④ 取不同体积的上清，按照本产品进行 PCR 反应。

反应程序：

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	10 sec	
68°C	2 min	30

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°C，两引物 Tm 值相差不超过 5°C。
- ❖ 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 0.1~0.4 μM。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

- ❖ ApexHFHS DNA Polymerase CL 的酶量添加推荐浓度是 1U / 50 μl 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。
可根据实验结果进行调整优化。

4. Mg²⁺浓度

- ❖ 用 ApexHFHS DNA Polymerase CL 进行 PCR 反应，较理想的 Mg²⁺浓度是 1.0 mM。
Mg²⁺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 μM。
- ❖ dNTPs 浓度过高，可能会与 Mg²⁺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

- ❖ ApexHFHS DNA Polymerase CL 一般将延伸温度设置为 68°C 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 10 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 模板的区域建议分开，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°C	1 min	1
变性	98°C	10 sec	
延伸	68°C	30 sec / kb	25~35