

Version 4

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

*ApexHF*HS 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 μ l)
<i>ApexHF</i> HS DNA Polymerase CL (1 U/ μ l)	50 μ l
2X <i>ApexHF</i> CL Buffer (Mg^{2+} and dNTP plus) *	1.25 ml

*: 2X *ApexHF* CL Buffer (Mg^{2+} and dNTP plus) 中的 Mg^{2+} 浓度为 2 mM, dNTP 浓度各 400 μ M。

➤ 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

➤ 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 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

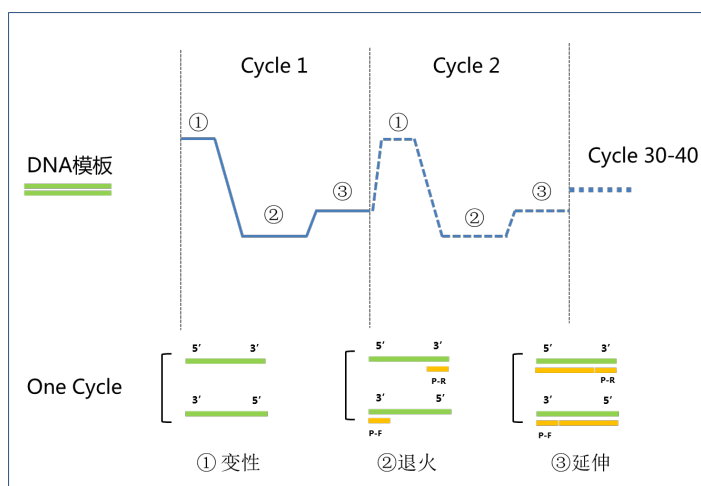
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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；

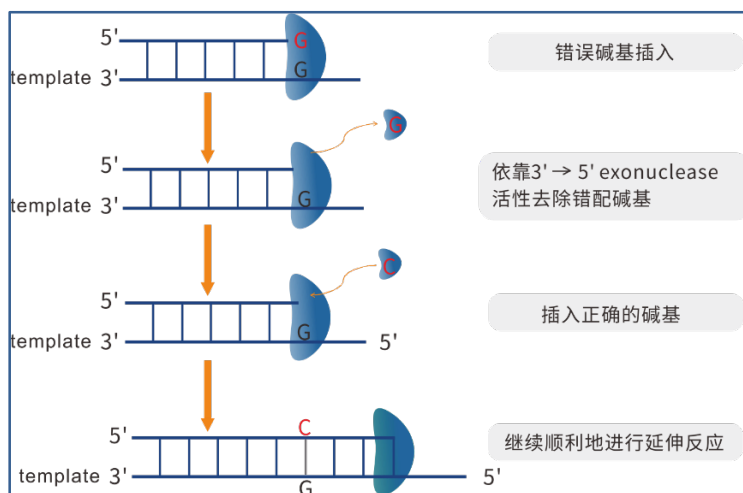
步骤②：引物与单链 DNA 退火；

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) *ApexHF* HS 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℃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>ApexHF</i> HS DNA Polymerase CL (1 U/ μl) *1	1 U	1 μl
2X <i>ApexHF</i> CL Buffer (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: *ApexHF* HS 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	98℃	10 sec ^{*2}	} 30-35
退火	55℃ or 60℃ ^{*3}	15 sec	
延伸	68℃ ^{*5}	30 sec / kb ^{*4}	

复杂模板反应条件^{*6}:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	5 min ^{*1}	1
变性	98°C	10 sec ^{*2}	} 30-35
退火	55°C or 60°C ^{*3}	15 sec	
延伸	68°C ^{*5}	1 min / 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°C 1 min-5 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: T_m 值高于 55°C 时, 退火温度设置为 60°C; T_m 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: 扩增复杂模板或粗提模板时, 推荐使用此反应程序。

*7: 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。

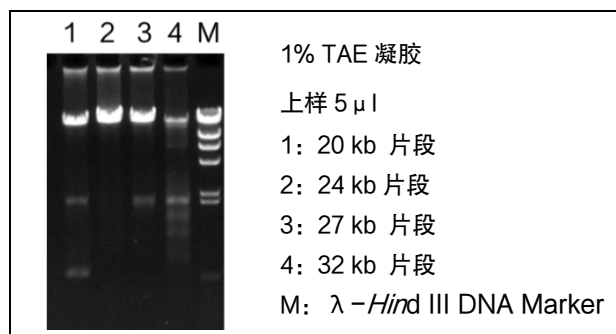
➤ 实验例

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	} 30
68°C	15 min	

电泳结果如下图所示:

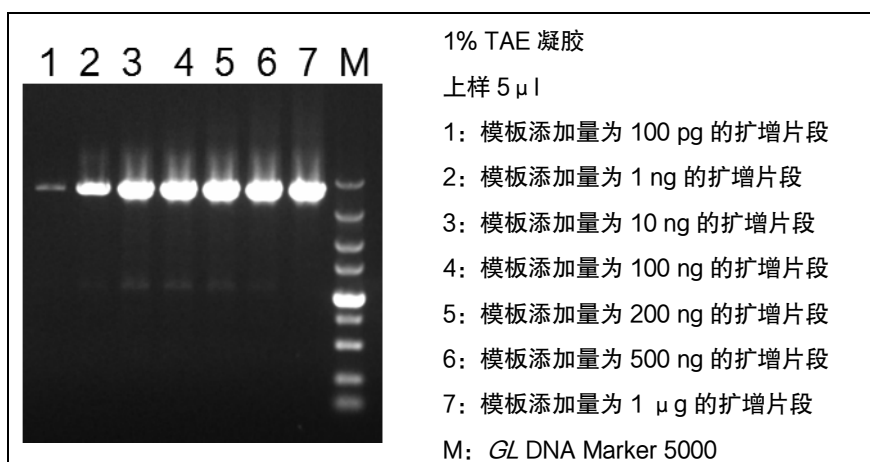


2. 以 Human gDNA 为模板，添加不同模板量 (100 pg、1 ng、10 ng、100 ng、200 ng、500 ng、1 μ g)，采用本产品扩增 4 kb 的 DNA 片段，可扩增出模板添加量为 100 pg 模板量的 DNA 片段。

反应程序:

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

电泳结果如下图所示:

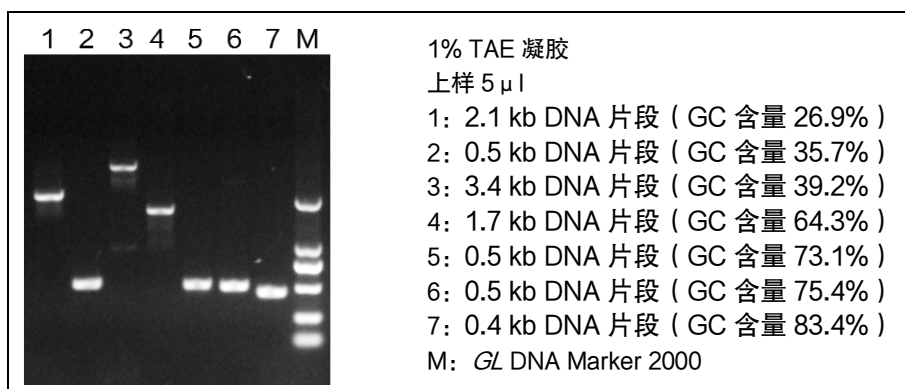


3. 以 Human gDNA 为模板，采用本产品扩增 GC 含量不同的 DNA 片段，对高 GC 与高 AT 的 DNA 片段都有很好的扩增。

反应程序:

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

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。

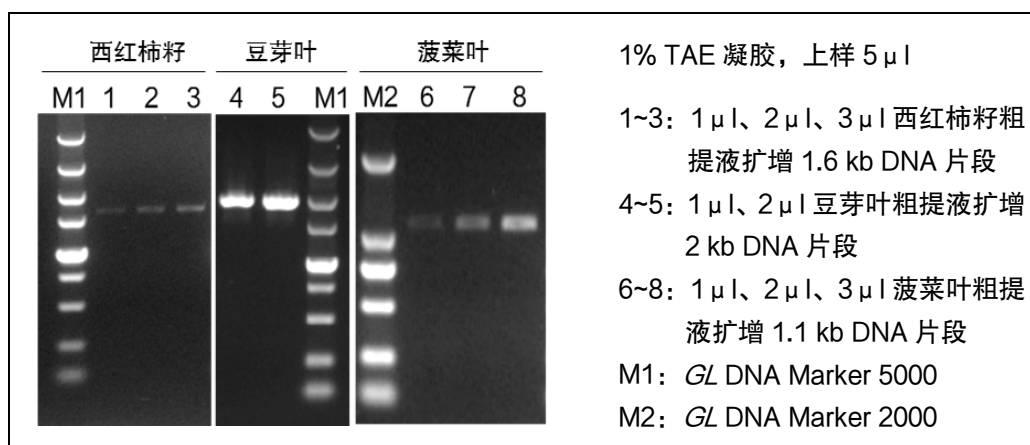
粗提方法：

- ① 取一定量的生物材料（小鼠尾 $\leq 2\text{ mm}$ ，小鼠耳 $\leq 5\text{ mm}^2$ ，植物 $\leq 5\text{ mm}^2$ ），加入 $100\text{ }\mu\text{l}$ 的提取 Buffer【组分： $20\text{ mM Tris-HCl (pH8.0)}$ ， 100 mM NaCl ， 5 mM EDTA ， 0.1% SDS】和 $1\text{ }\mu\text{l}$ 蛋白酶 K（ 20 mg/ml ）；
- ② 60°C 反应 5 min ，然后 98°C 反应 2 min ；
- 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	} 30
68°C	2 min	

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℃，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 0.1~0.4 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℃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	} 30-35
延伸	68°C	30 sec / kb	