Version 2

Cat No. AG12303

AdeptTect 快速 HS PCR 预混液(含染料)-Ⅱ

AdeptTect Speed HS PCR Master Mix (dye plus) Ⅱ

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

AdeptTect Speed HS PCR Master Mix（dye plus）Ⅱ 是适用于快速 PCR 反应的 2 倍浓度预混型制品，具有延伸速度快（15 sec / kb）、扩增效率高、退火效率高等特点，适合扩增长 DNA 片段及复杂结构的 DNA 片段。使用时只需要在溶液中加入模板、引物和水即可进行 PCR 反应；同时本制品中还加入了电泳检测时所需的色素试剂，制品呈现紫红色，PCR 反应完毕后可以直接进行琼脂糖凝胶电泳；操作便捷，可最大限度地减少人为误差，并在较短时间内可获得检测结果。此外，本制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，有效抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增。

本制品扩增得到的产物 3’端不含 A 碱基，因此不可直接用于 TA 克隆。

产品组成

组分名称	AG12303 （120 rxns / 50 μ l）
2X Speed HS PCR Master Mix（dye plus）Ⅱ	500 μ l x 6 pc

保存

保存温度：-20℃

运输温度：干冰运输或者-20℃冰袋运输

产品优势

1. 本制品具有较快的延伸速度（可达 15 sec / kb），可在较短时间内获得检测结果。
2. 本制品为 2X 预混液，加入模板、引物和水即可进行 PCR 反应，操作简便，可最大限度地减少人为误差，大大提高了实验效率。
3. 本制品中含有紫红色染料，PCR 结束后可直接进行琼脂糖凝胶电泳，无需添加电泳上样缓冲液，电泳时有一条浅紫红色指示带。
4. 适合长片段的扩增，以 Human gDNA 为模板，可扩增出 30 kb 的 DNA 片段。
5. 适合扩增复杂 DNA 片段，如高 GC 的 DNA 片段。

实验原理

PCR 扩增原理

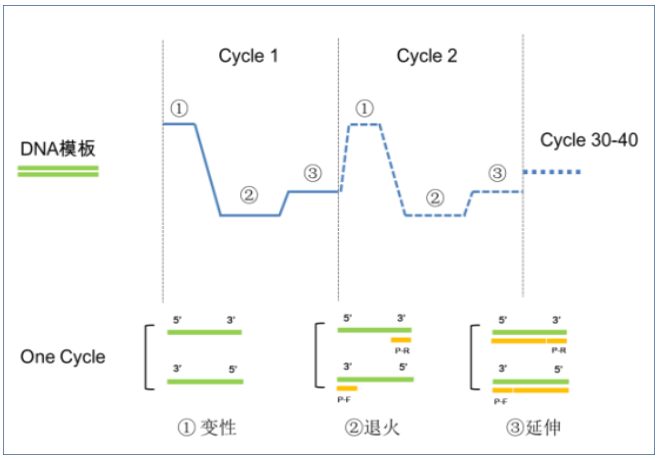
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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 进行退火；

步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下进行延伸，与单链 DNA 形成互补链。



➢ 实验前准备

1) **试剂 & 耗材：**

Primer、DNA 模板、PCR 管、枪头、冰浴或冰盒。

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[*1]。然后将配制好的反应液放置于 PCR 仪中反应。

反应体系（50 μl）

组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
2X Speed HS PCR Master Mix（dye plus）II[*2]	1 X	25 μl
Primer F（10 μM）	0.2 μM[*3]	1 μl
Primer R（10 μM）	0.2 μM[*3]	1 μl
Template	≤500 ng[*4]	-
RNase free water	-	Up to 50 μl

*1：为了获得更好的扩增特异性，可在冰上配制反应液。

*2：溶液应避免反复冻融，防止降低酶活性；首次使用时，短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部后进行使用，减少损失；使用时应轻柔混匀（避免起泡），缓慢吸取。

*3：通常引物终浓度为 0.2 μM 可得到较好的结果，也可根据具体实验情况在 0.1 ~ 0.4 μM 范围内调整引物浓度。

*4：通常情况下，建议模板添加量 ≤500 ng，可根据实际情况进行调整。

2）反应条件（以三步法扩增 1 kb DNA 片段为例*9）

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*5	94℃	1 min	1
变性*6	98℃	10 sec	30-35
退火*7	55℃	5 sec	
延伸*8	72℃	15 sec / kb	
最终延伸	72℃	2 min	1

*5：预变性一般可设置为 94℃ 30 sec~1 min；根据扩增目的片段或样本不同，可省略预变性步骤。

*6：变性条件的设定可根据设备进行调整，一般 94℃ 20~30 sec，98℃ 5~10 sec。

*7：退火温度主要取决于上下游引物的 Tm 值，通常可按照 Tm ± 5℃设定，退火时间可在 5 sec ~ 30 sec 范围内调整。

*8：扩增 10 kb 以下 DNA 片段建议延伸速度为 15~20 sec / kb；10 kb 以上 的 DNA 片段或复杂模板，延伸速度可在 20~60 sec / kb 范围内调整。

*9：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，取适量反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

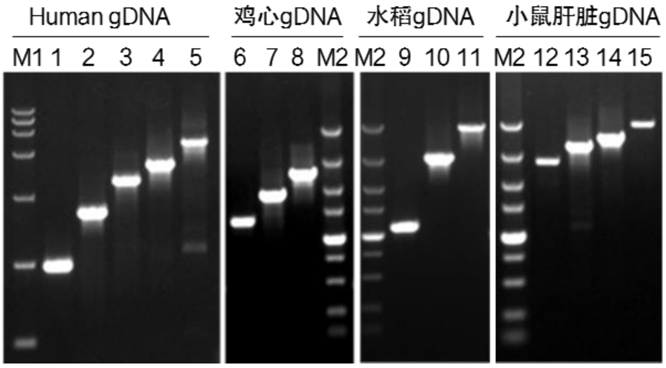
➢ 实验例

1. 以不同物种的 gDNA 为模板，采用本试剂盒扩增不同长度的 DNA 片段，都能获得很好地扩增效果。

反应程序：

温度	时间	循环数
98℃	10 sec	30
55℃	5 sec	
72℃	15 sec / kb	

电泳结果如下图所示：



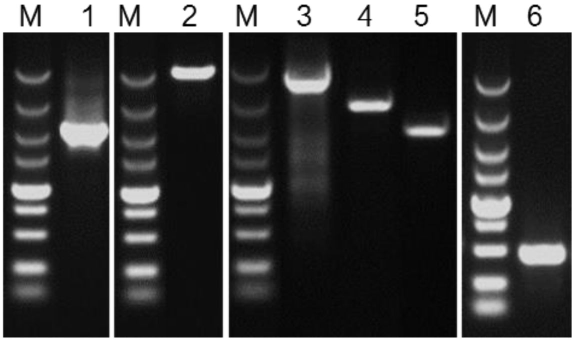
1% TAE 凝胶　上样 5 μ l
1~5：1 kb、2 kb、3 kb、4 kb、6 kb 片段
6~8：1.2 kb、1.7 kb、2.4 kb 片段
9~11：1.1 kb、3 kb、5 kb 片段
12~15：2.6 kb、3.4 kb、4 kb、5 kb 片段
M1：*GL* DNA Marker 15000
M2：*GL* DNA Marker 5000

2. 以不同物种 gDNA 为模板，扩增不同 GC 含量的 DNA 片段，能很好地扩增出高 AT 及高 GC 的 DNA 片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
94℃	1 min	1
98℃	10 sec	35
68℃	15 sec	
72℃	1 min / kb	

电泳结果如下图所示：



1% TAE 凝胶　上样 5 μ l
1：Human gDNA–2.1 kb 片段(GC 含量 26.9%)
2：西红柿 gDNA –5 kb 片段(GC 含量 38.2%)
3：Human gDNA –4 kb 片段(GC 含量 63.1%)
4：小鼠 gDNA –2.6 kb 片段 (GC 含量 65.2%)
5：Human gDNA – 2 kb 片段(GC 含量 72.3%)
6：Human gDNA –0.5 kb 片段(GC 含量 83.4%)
M：*GL* DNA Marker 5000

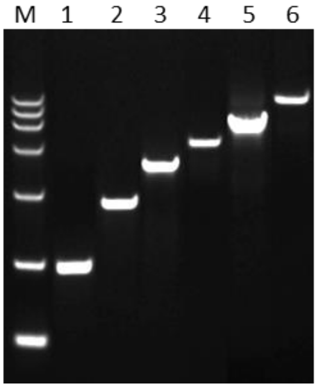
3. 挑取 *E.coli* 单菌落加入至 10 μ l RNase free water 中，混匀后取 2 μ l 菌液为模板，扩增不同长度的 DNA 片段，能获得很好地扩增效果。

反应程序：5 kb 以下片段

温度	时间	循环数
98℃	10 sec	30
55℃	5 sec	
72℃	15 sec ~20sec / kb*	

*：5 kb 以下片段用 15 sec / kb；5 kb 以上片段 20 sec / kb。

电泳结果如下图所示：



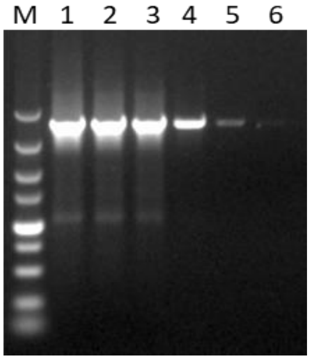
1% TAE 凝胶
上样 5 μ l
1：1 kb 片段
2：2 kb 片段
3：3.5 kb 片段
4：5 kb 片段
5：6.7 kb 片段
6：11 kb 片段
M：*GL* DNA Marker 15000

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），采用本试剂盒扩增 4 kb DNA 片段，模板量低至 1 ng 时，能扩增出目的片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
98℃	10 sec	30
55℃	5 sec	
72℃	15 sec / kb	

电泳结果如下图所示：



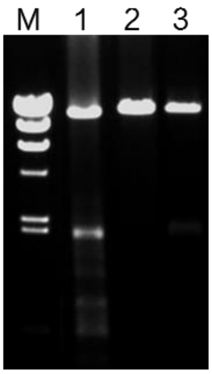
1% TAE 凝胶
上样 5 μ l
1：模板添加量为 500 ng 的扩增片段
2：模板添加量为 200 ng 的扩增片段
3：模板添加量为 100 ng 的扩增片段
4：模板添加量为 10 ng 的扩增片段
5：模板添加量为 1 ng 的扩增片段
6：模板添加量为 100 pg 的扩增片段
M：*GL* DNA Marker 5000

5. 以 Human gDNA 为模板，采用本试剂盒扩增不同长度 DNA 片段，可很好扩增 30 kb 的 DNA 片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
94℃	1 min	
98℃	10 sec	30
68℃	10 min	

电泳结果如下图所示：



1% TAE 凝胶
上样 5μl
1：20 kb DNA 片段
2：24 kb DNA 片段
3：30 kb DNA 片段
M：λ-*Hin*dⅢ digest

➢ 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，扩增特异性升高；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严重影响 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，不要超过 4 个连续互补序列。
- ❖ 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，并且可能出现引物二聚体。

4. 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。

5. 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。
- 每次实验可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℃	15 sec / kb	