

AdeptTect 通用型直接PCR预混液(含染料)

AdeptTect Universal Direct PCR Master Mix (dye plus)

Code No. AG12304

包装量: 120 rxns / 50 μ l
保存温度: -20 $^{\circ}$ C

产品概述

本产品是通用型直接 PCR 反应的 2 倍浓度预混型试剂, 具有较强的扩增性能及广泛的模板适用性, 对复杂模板如高 GC 含量、高 AT 含量的模板都能进行有效的扩增。特别适合对各种类型样品直接或简单裂解后进行 PCR 扩增, 包括动物、植物、真菌、细菌、血液及细胞等各种样本, 无需 DNA 纯化步骤, 极大地缩短了实验时长、节约成本。同时, 本产品具有较快的延伸速度 (~ 20 sec / kb), 可在较短时间内获得检测结果。

进行 PCR 反应时, 只需向预混液中加入模板、引物和水即可进行扩增; 同时本产品中还加入了电泳检测时所需的色素试剂, 溶液呈现紫红色; PCR 反应完成后可以直接进行琼脂糖凝胶电泳。实验操作简便, 可最大限度地减少人为误差。

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。本产品扩增得到的 PCR 产物 3' 端不含 A 碱基, 因此不可直接用于 TA 克隆。

保存及运输

保存温度: -20 $^{\circ}$ C 保存

运输温度: 干冰运输或 -20 $^{\circ}$ C 冰袋运输

产品组成

2X Universal Direct PCR Master Mix (dye plus) 500 μ l X 6 pcs

实验操作

1. 样本的处理:

本产品适用于以下三种模板类型: 纯化后的 DNA、直接生物样本及生物样本的简单裂解产物。可根据样本裂解的难易程度及基因的复杂程度, 选择合适的模板类型。

a) 纯化后的 DNA;

b) 直接 PCR 法: 取适量的生物样本直接加入 PCR 反应液中进行反应 (样本加入量可参考 Table. 1 直接 PCR 及简单裂解样本加入量表);

c) 简单裂解方法:

① 取适量的生物样本 (样本加入量可参考 Table. 1 直接 PCR 及简单裂解样本加入量表), 选择下述方法之一进行裂解:

a、蛋白酶 K 裂解方法【可以选择本公司产品裂解液 (用于 PCR) (Code No. AG12306 和 AG12307)】:

◆ 往样本中加入 100 μ l 的提取液【组分: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% SDS 和 1 μ l 蛋白酶 K (20 mg / ml), 充分混匀;

◆ 60 $^{\circ}$ C 反应 5 min; 98 $^{\circ}$ C 反应 2 min; 反应结束后置于冰上。

b、碱裂解方法:

◆ 加入 90 μ l 的 50 mM NaOH 溶液, 充分混匀; 95 $^{\circ}$ C 加热 10 min;

◆ 加入 10 μ l 的 1 M Tris-HCl (pH 8.0), 充分混匀后置于冰上。

② 室温下桌面离心将不溶物离心至管底, 将上清液转移至新的离心管中; 放置于冰上或 4 $^{\circ}$ C 备用; 若当天不使用, 可保存于 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C (针对不同的样本, 保存时间存在差异; 如需长期保存, 可针对不同样本进行研讨实验);

③ 取 2 μ l 的上清液, 按照本产品进行 PCR 反应 (上清液体积根据实验结果进行调整, 如在 1-4 μ l 范围内调整)。

Table. 1 直接 PCR 及简单裂解样本加入量表*4

样本类型	直接PCR样本添加量	简单裂解样本添加量
血液*1	≤5 μl	-
动物组织*2	5-10 mm ³	5-10 mm ³
鼠耳*2	4-10 mm ²	4-10 mm ²
鼠尾*2	2-3 mm	2-3 mm
鼠趾*2	1-2 根鼠趾	1-2 根鼠趾
植物叶片*3	4-10 mm ²	4-10 mm ²
植物组织*3	5-10 mm ³	5-10 mm ³

*1: 血液样本直接 PCR 即可获得较好的扩增效果。

*2: 动物组织、鼠组织等推荐简单裂解后 PCR 扩增；若扩增片段比较短或容易扩增，也可以尝试进行直接 PCR 扩增。

*3: 植物样本推荐直接 PCR 扩增；若扩增效果不好，可简单裂解后 PCR 扩增。

*4: 本产品实验例展示在本公司官网 (www.agbio.com.cn) 此产品页：实验例表。使用前可参考该表格；我们后续还在不断拓展样本种类，持续更新该表格。

2. PCR反应

反应体系⁵ (50 μl)

组分名称	反应终浓度	加入量
2X Universal Direct PCR Master Mix (dye plus) ⁶	1X	25 μl
Template	≤ 500 ng ⁷	-
Primer F (10 μM)	0.2 μM ⁸	1 μl
Primer R (10 μM)	0.2 μM ⁸	1 μl
RNase free water	-	Up to 50 μl

详细信息请查阅 www.agbio.com.cn

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.

*5: 为了获得更好的扩增特异性，建议在冰上配制反应液。

*6: 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。

*7: 使用纯化的 DNA 模板，一般推荐不超过 500 ng；直接 PCR 样本用量或简单裂解后的产物用量请参考上述“样本的处理”步骤中的推荐量。

*8: 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。

反应条件 (以三步法 PCR 扩增为例¹⁴)

步骤	温度	时间	循环数
预变性 ⁹	98°C	2 min	1
变性 ¹⁰	98°C	10 sec	} 30-35 ¹³
退火 ¹¹	55°C	5 sec	
延伸 ¹²	72°C	30 sec / kb	
最终延伸	72°C	2 min	

*9: 若扩增直接样本或简单裂解样本，一般可将预变性设置为 98°C 2 min (可在 1-5 min 范围内调整)。若扩增纯化后的 DNA 模板，根据不同的目的片段，可省略预变性步骤。

*10: 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。

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

*12: 延伸速度一般推荐 30 sec / kb，可以在 10 sec ~ 1 min / kb 范围内调整。

*13: 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。若为血液样本直扩，可考虑用 35 个循环。

*14: 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。

▶ 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。