

# AdeptTect Plant Fast Direct PCR Master Mix (dye plus)

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

本制品是用于植物直接 PCR 反应的 2 倍浓度预混型试剂,具有较快的延伸速度(可达 10 sec / kb),可进行快速 PCR 反应。同时,本制品有较强的扩增性能,非常适合对各种植物样品直接或简单裂解后进行 PCR 扩增,无需 DNA 纯化步骤,极大地缩短了实验时长、节约成本。简单裂解可使用碱裂解或蛋白酶 K 裂解方法,如选用蛋白酶 K 裂解方法,可选用本公司产品 Lysis Buffer for PCR(Code No. AG12306 和 AG12307)。

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;本制品中含有电泳所必需的色素试剂,制品溶液呈现鲜艳的绿色; PCR 反应完毕后可以直接进行琼脂糖凝胶电泳。这种预混液方案操作简便,可最大限度地减少人为误差,并在较短时间内即可获得检测结果。

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,有效的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	AG12305 ( 120 rxns / 50 μ Ι )	
2X Plant Fast Direct PCR Master Mix (dye plus)	500 μ l× 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. 本制品具有较强的扩增性能,适用于各种植物样本直接或简单裂解后进行 PCR 扩增;无需 DNA 纯化步骤,缩短实验时长、节约成本。直接以水稻叶片为模板,可扩增出长达 12 kb 的 DNA 片段。
- 2. 本制品具有较快的延伸速度(可达 10 sec / kb), 在较短时间内即可获得检测结果。
- 本制品是 2 倍浓度的预混液,仅需添加模板、引物与水即可进行 PCR 扩增,操作简便, 减少人为误差,大大提高了实验效率。
- 4. 本制品中含有绿色染料, 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, 电泳时有两条指示带(蓝色和黄色)。



## > 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。

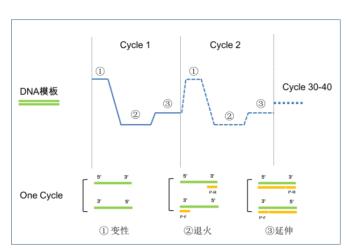
扩增详情如下,一般将步骤①②③ 称为一个循环,每次进行 DNA 扩增时以 此循环 30-40 次。进行 PCR 扩增时, 可根据引物的不同调整退火温度,进而 获得最优 PCR 扩增反应条件。

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。



## > 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. 样本的处理:

本试剂盒适用于以下三种模板类型: 纯化后的 DNA、直接植物样本及植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\*\*,²。

**1) 纯化后的 DNA**: 加入 $\leq$ 500 ng 纯化后的 DNA 至 PCR 反应液中进行反应即可。

#### 2) 直接 PCR 法:

取适量的植物样本直接加入 PCR 反应液中进行反应<sup>2</sup> (植物叶片:  $4 \sim 10 \text{ mm}^2$ , 植物组织:  $5 \sim 10 \text{ mm}^3$ )。

#### 3) 简单裂解方法



- ① 取适量的植物样本<sup>2</sup>(植物叶片: 4~10 mm<sup>2</sup>,植物组织: 5~10 mm<sup>3</sup>),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 Lysis Buffer for PCR(Code No. AG12306 和 AG12307)】:
    - ❖ 加入 100 μ I 的提取液【组分: 20 mM Tris-HCI (pH 8.0), 100 mM NaCI, 5 mM EDTA, 0.1% SDS 】和 1 μ I 蛋白酶 K (20 mg / ml), 充分混匀;
    - ❖ 60℃ 反应 5 min(反应时间一般推荐 5 min,若裂解效果不好,可适当的延长裂解时间,在 5~15 min 范围内调整);
    - ❖ 98℃ 反应 2 min; 放置于冰上;

#### b、碱裂解方法:

- ❖加入 90 μ I 的 50 mM NaOH 溶液,充分混匀;
- ❖ 95℃ 加热 10 min;
- ❖加入 10 μ I 的 1 M Tris-HCI 溶液 (pH 8.0), 充分混匀后放置于冰上;
- 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℃备用;若当天不使用,可保存于-20℃或-80℃(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  $2\mu$ I 的上清液,按照本试剂盒进行 PCR 反应(上清液体积根据实验结果进行调整,如可在  $1~4\mu$ I 范围内调整)。
- \*1: 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。
- \*2:使用本制品做过的实验例展示在本公司网页(https://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

#### 1) 配制 PCR 反应液<sup>2</sup>

首先按照下表所示配制 PCR 反应液。

组分名称	反应终浓度	50 µ l 体系
2X Plant Fast Direct PCR Master Mix (dye plus) <sup>*3</sup>	1X	25 μΙ
Template	≤500 ng <sup>*4</sup>	_
Primer F ( $10 \mu M$ )	0.2 μ M <sup>*5</sup>	1 μΙ
Primer R ( 10 µ M )	0.2 μ M <sup>*5</sup>	1 μΙ
RNase free water	-	Up to 50 µI

<sup>\*2:</sup> 为了获得更好的扩增特异性,建议在冰上配制反应液。

<sup>\*3:</sup> 该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。

- \*4: 使用纯化的 DNA 模板,一般推荐 ≤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。
- \*5: 引物通常使用终浓度为 0.2 µ M, 可根据实验结果在 0.1~ 0.4 µ M 范围内调整。

#### 2) 反应条件(以三步法 PCR 扩增为例\*10)

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 <sup>*6</sup>	98°C	2 min	1
变性*7	98°C	10 sec	٦
退火*8	55°C	5 sec	30-35
延伸	72°C	10 sec / $kb^{*9}$	J
最终延伸	72°C	2 min	

- \*6: 若直接扩增植物样本或简单裂解产物,一般可将预变性设置为 98℃ 2 min(在 1~5 min 范围内调整)。若扩增纯化后 DNA 模板,根据不同的目的片段,可省略预变性步骤。
- \*7: 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。
- \*8: 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。
- \*9: 扩增 5 kb 以下片段建议延伸速度为 10 sec / kb; 5 kb 以上片段建议延伸速度为 10~30 sec/ kb; 若片段过长、模板复杂导致的扩增效果不好,可尝试将延伸速度延长至 30~60 sec / kb。
- \*10: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

采用本试剂盒对西红柿、水稻叶片样本直接进行 PCR 扩增,可获得较好的扩增效果。

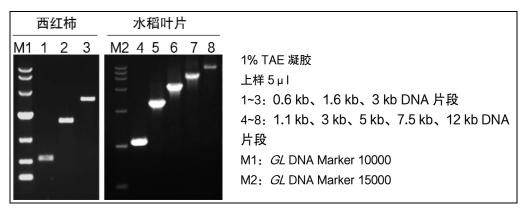
#### 反应程序:

温度	时间	循环数
98°C	2 min	1
98°C	10 sec	)
55°C	5 sec	30
72°C	10 sec ~ 30 sec / kb*	J



- \*: 西红柿 0.6 kb、1.6 kb 延伸速度 10 sec / kb; 3 kb 延伸速度 30 sec / kb;
- \*: 水稻叶片 1.1 kb、3 kb、5 kb 延伸速度 10 sec / kb; 7.5 kb、12 kb 延伸速度 20 sec / kb。

#### 电泳结果如下图所示:

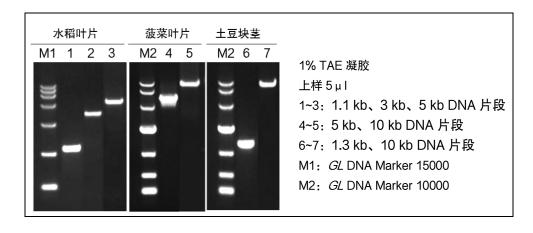


2. 将菠菜叶片、水稻叶片、土豆块茎等用蛋白酶 K 法简单裂解 【使用本公司产品 Lysis Buffer for PCR(Code No. AG12306)】,并以裂解产物为模板,采用本试剂盒扩增不同的 DNA 片段,都能获得很好的扩增效果。

#### 反应程序:

及四柱门		
温度	时间	循环数
98℃	2min	1
98°C	10 sec	)
55°C	5 sec	30
72℃	10 sec~18 sec / kb *	J

- \*: 水稻叶片延伸速度为 10 sec / kb;
- \*: 菠菜叶片延伸速度为 15 sec / kb;
- \*: 土豆块茎 1 kb 延伸速度为 10 sec / kb , 10 kb 延伸速度为 18 sec / kb。 电泳结果如下图所示:





### ▶ 产品注意事项

#### 1. 合适的模板

- ❖ 选择合适的模板类型及模板加入量:根据样本核酸释放难易程度及基因扩增的难易程度,选择合适的模板类型,调整样本的加入量。可参考本公司网页上 (https://www.agbio.com.cn),本产品的首页:实验例表。若样本或基因容易扩增,直接 PCR 即可获得较好的实验结果,如水稻叶片样本;若样本较难扩增,选择简单裂解后扩增可获得更好的实验结果,如土豆块茎等。
- ❖ 植物样本或简单裂解的产物中存在一定的 PCR 抑制物,反应时加入量过多可能会抑制反应导致扩增失败,可尝试调整减少样本加入量或将样本稀释后使用。
- ❖ 选择合适的裂解方式:针对不同的样本,碱裂解与蛋白酶 K 裂解效果存在一定差异,如土豆块茎使用蛋白酶 K 裂解效果更好,而酵母菌丝则碱裂解效果更好。若扩增效果不好,可尝试调整裂解方式。

#### 2. 合适的引物

- ❖ 合适的引物浓度为 0.1 ~ 0.4 µ M。
- ❖ 引物浓度低:导致反应效率低。可尝试提高 PCR 扩增引物反应浓度。
- ❖ 引物浓度高:导致反应特异性不好。可适当降低引物浓度。
- ❖ 引物完整性不好:可能会导致无扩增曲线,可通过 PAGE 电泳确认引物的完整性,如引物有降解,建议更换引物。
- ❖ 引物设计的原则:
  - ① 引物一般是 15-30 个碱基的寡核苷酸, GC 含量在 40 60 %之间。
  - ② 建议正反向引物 Tm 值在  $50-70^{\circ}$ 、两引物 Tm 值相差不超过  $5^{\circ}$ 。
  - ③ 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。
  - ④ 引物 3'端避免出现发夹结构。
- ❖ ⑤ 减少引物之间的互补序列,一般不要超过4个碱基连续互补序列。

#### 3. 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。

#### 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

(两步法 PCR 反应程序)

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	2 min	1
变性	98℃	10 sec	20. 25
延伸	68°C	10 sec / kb	30-35

技术支持热线: 400-767-6022 详细信息请查阅 <u>www.agbio.com.cn</u>