Version 2

AdeptTect 植物快速直接PCR 预混液（含染料）

AdeptTect Plant Fast Direct PCR Master Mix (dye plus)

Code No. AG12305

包装量：	120 rxns / 50 μl
保存温度：	−20 ℃

➢ 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，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。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。

➢ 保 存

保存温度：−20℃

运输温度：干冰运输或−20℃冰袋运输

➢ 产品组成

2X Plant Fast Direct PCR Master Mix (dye plus)	500 μl× 6 pc

➢ 实验操作

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[*1,2]。

a) 纯化后的DNA；

b) 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（植物叶片：4 ~ 10 mm^2，植物组织：5 ~ 10 mm^3）。

c) 简单裂解方法

① 取适量的植物样本[*2]（植物叶片：4 ~ 10 mm^2，植物组织：5 ~ 10 mm^3），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 μl 的提取液【组分：20 mM Tris-HCl（pH 8.0），100 mM NaCl，5 mM EDTA，0.1% SDS】和1 μl 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，反应结束后放置于冰上；

b、碱裂解方法：

- ◆ 加入90 μl 的 50 mM NaOH 溶液，充分混匀；
- ◆ 95℃ 加热10 min；
- ◆ 加入10 μl 的1 M Tris-HCl（pH 8.0），充分混匀；反应结束后放置于冰上；

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2μl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1~4μl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

反应体系*3（50 μl）

组分名称	反应终浓度	加入量
2X Plant Direct PCR Master Mix (dye plus)*4	1X	25 μl
Template	≤500 ng*5	–
Primer F（10μM）	0.2μM*6	1μl
Primer R（10μM）	0.2μM*6	1μl
RNase free water	–	Up to 50 μl

*3：为了获得更好的扩增特异性，建议在冰上配制反应液。

*4：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。

*5：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。

*6：引物通常使用终浓度为0.2μM，可根据实验结果在 0.1~ 0.4μM 范围内调整。

反应条件（以 3 Step PCR 扩增为例*11）

步骤	温度	时间	循环数
预变性*7	98℃	2 min	1
变性*8	98℃	10 sec	30-40
退火*9	55℃	5 sec	
延伸	72℃	10 sec / kb*10	
最终延伸	72℃	2 min	

*7：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。

*8：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。

*9：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。

*10：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。

*11：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。

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.