

Version 1

Code No. AG12312

AdeptTect Super Pro Taq 快速 PCR 预混液 (2X, 含染料)

AdeptTect Super Pro Taq Fast PCR Master Mix (2X, 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

本产品为适用于快速 PCR 反应的即用型 2X 预混液，进行 PCR 反应时，只需向预混液中加入模板和引物即可进行扩增，操作简便，可最大限度的减少人为误差。本产品中的 *Super Taq* DNA Polymerase 具有卓越的扩增效率、抗干扰性能、扩增速度、扩增灵敏度和扩增特异性，结合优化的 buffer，可进行快速 PCR 反应，2 kb 以内的扩增速度最快可达 1 sec / kb，大大节省了 PCR 反应的时间。

本产品中还加入了电泳测试时所需的色素试剂，溶液呈现紫红色，PCR 结束可直接进行电泳检测，在较短时间内即可获得检测结果。大部分 PCR 产物的 3' 端带有一个 A 碱基，可直接克隆于 T 载体。

➤ 产品组成

组分名称	AG12312 (120 rxns / 50 μ l)
2X <i>Super Pro Taq</i> Fast PCR Master Mix (dye plus)	1 ml x 3 pcs

➤ 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

➤ 产品优势

1. 操作更简便：加入引物和模板即可进行扩增，产品中含有染料可直接进行电泳。
2. 扩增速度快：2 kb 以内片段扩增速度最快可达 1 sec / kb，整个反应时间只需 ~ 30 min。
3. 模板适用性广：适合各种精提样本，兼容动植物裂解产物、血液、菌液等粗模板。
4. 可进行长片段扩增，以 Human gDNA 为模板，最长可扩增出 17 kb 的 DNA 片段。
5. 本产品具有扩增产量高、灵敏度高等特点，可提高 PCR 扩增效率及成功率。

➤ 使用注意事项

1. 2X *Super Pro Taq* Fast PCR Master Mix (dye plus) 使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部，减少损失，并用移液枪轻轻吸打混匀后再使用，过程中尽量避免起泡，使用时建议存放于冰盒内，使用完后建议尽快置于 -20℃ 保存。
2. 反应体系需要在冰上配制，最后将配制好的反应液放置于 PCR 仪中反应。

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材:

引物、水 (RNase-free)、1.5 ml 离心管 (RNase-free)、PCR 管 (RNase-free)、枪头 (RNase-free)、移液器。

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

首先按照下表所示配制 PCR 反应液^{*1}:

组分名称	反应终浓度	50 μ l 体系 ^{*4}
2X <i>Super Pro Taq</i> Fast PCR Master Mix (dye plus) ^{*2}	1X	25 μ l
Template	≤ 500 ng	— ^{*3}
Primer F (10 μ M)	0.4 μ M ^{*5}	2 μ l
Primer R (10 μ M)	0.4 μ M ^{*5}	2 μ l
RNase free water	—	Up to 50 μ l

*1: 为了获得更好的扩增特异性, 建议在冰上配制反应液。

*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: 使用纯化的基因组 DNA 为模板, 一般推荐模板量 ≤ 500 ng。

*4: 推荐使用 50 μ l 体系, 可获得较好的 PCR 扩增效果; 若需改变反应总体系, 则应按比例减少各组分的加入量。

*5: 引物通常使用终浓度为 0.4 μ M, 可根据实验结果在 0.2 ~ 1.0 μ M 范围内调整。

2. 反应条件 (以三步法 PCR 扩增为例)

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 ^{*1}	95°C	2 min	1
变性 ^{*2}	95°C	15 sec	} 30-35 ^{*5}
退火 ^{*3}	60°C	15 sec	
延伸	72°C	— ^{*4}	
终延伸	72°C	5 min	1

- *1: 若扩增简单裂解模板，一般将预变性设置为 95°C, 2 min, 可根据模板或基因复杂程度在 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，缩短预变性时间或者省略预变性步骤。
- *2: 变性条件的设定可根据设备进行调整，一般设置 95°C, 10 ~ 15 sec 或 98°C, 5 ~ 10 sec。
- *3: 退火温度主要取决于上下游引物的 T_m 值，通常可按照 $T_m \pm 5^\circ\text{C}$ 设定。
-  如扩增产量低可尝试降低退火温度；
 -  如扩增特异性差可适当提升退火温度或者使用两步法扩增；
 -  如引物 T_m 值较高或者三步法 PCR 扩增结果不好时可尝试使用两步法扩增（两步法 PCR 反应程序可参考附录）。
- *4: 延伸时间可以根据需求进行调整，具体如下：
-  2 kb 以内片段延伸速度推荐 1 sec / kb；
 -  2 kb ~ 7 kb 片段延伸速度推荐 15 sec / kb；
 -  7 kb 以上片段延伸速度推荐 30 sec / kb。
- 注：较复杂片段（如 GC 含量较高、粗裂模板）、模板量较低或者扩增结果不理想时建议延长延伸时间。**
- *5: 一般推荐使用 30 个循环进行扩增，若扩增条带较弱，可尝试增加循环数至 35 个循环。

3. 结果检测

反应结束后，取 2 ~ 5 μl PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

➤ 实验例

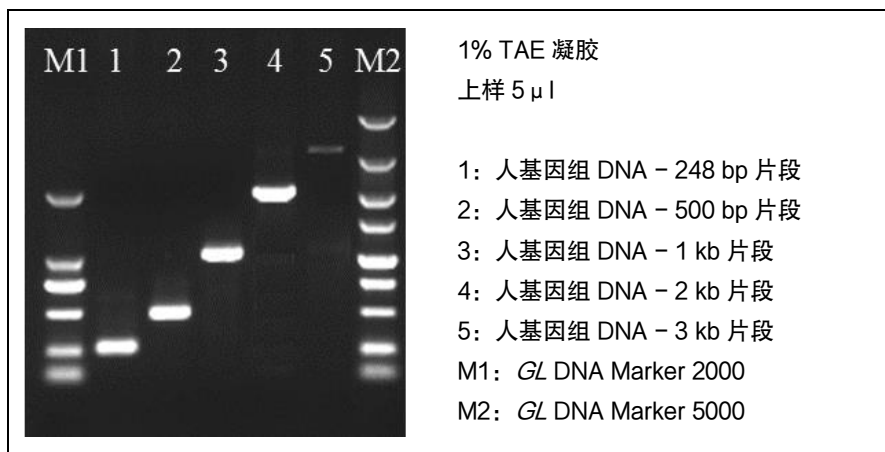
1. 扩增速度快：

以人基因组 DNA 为模板，使用本产品扩增不同长度的 DNA 片段，以 1 sec 的延伸时间可扩增出 3 kb DNA 片段。

反应程序：

温度	时间	循环数
95°C	1 min	1
95°C	15 sec	} 30
60°C	15 sec	
72°C	1 sec	
72°C	2 min	1

电泳结果如下图所示：



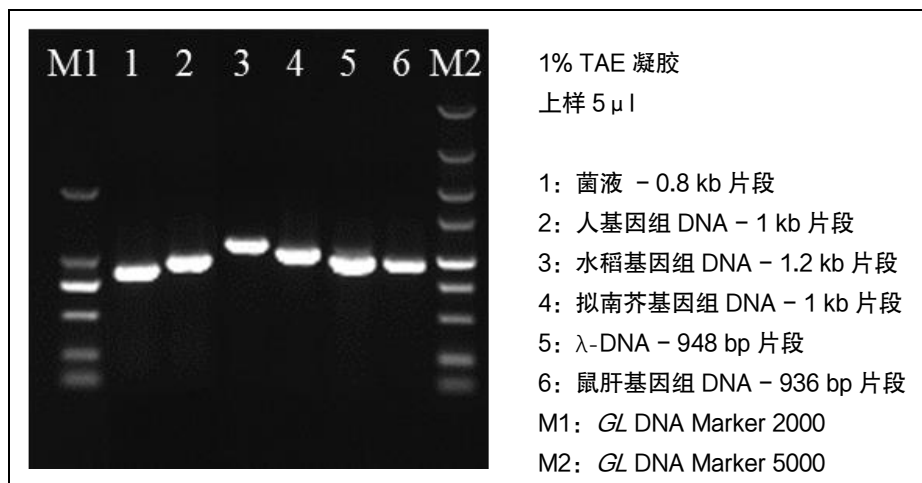
2. 兼容不同类型模板扩增:

使用不同类型样本 (菌液、人基因组 DNA、水稻基因组 DNA、拟南芥基因组 DNA、 λ -DNA、鼠肝基因组 DNA) 作为模板, 采用本产品以 1 sec 的延伸速度扩增 ~ 1 kb 片段, 都能获得很好的扩增效果。

反应程序:

温度	时间	循环数
95°C	1 min	1
95°C	15 sec	30
60°C	15 sec	
72°C	1 sec	
72°C	2 min	1

电泳结果如下图所示:



3. 兼容粗样本扩增：

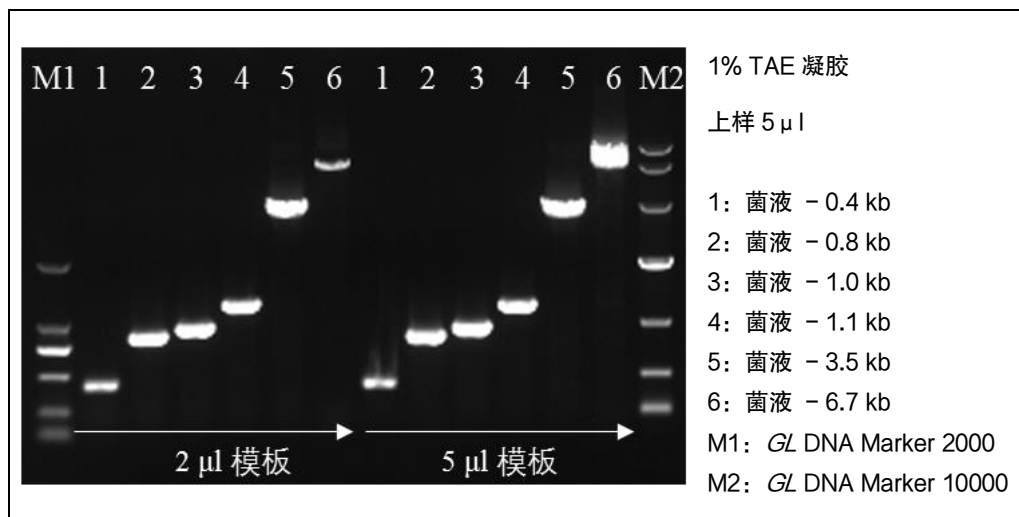
- 1) 以 2 μ l 和 5 μ l 大肠杆菌菌液为模板，采用本产品分别扩增不同长度片段，都能获得很好的扩增效果。

反应程序：

温度	时间	循环数
95°C	1 min	1
95°C	15 sec	} 30
60°C	15 sec	
72°C	1 sec*	
72°C	2 min	1

*：1kb 以下片段使用延伸时间 1 sec，1kb 以上片段延伸时间设置为 10 sec / kb。

电泳结果如下图所示：



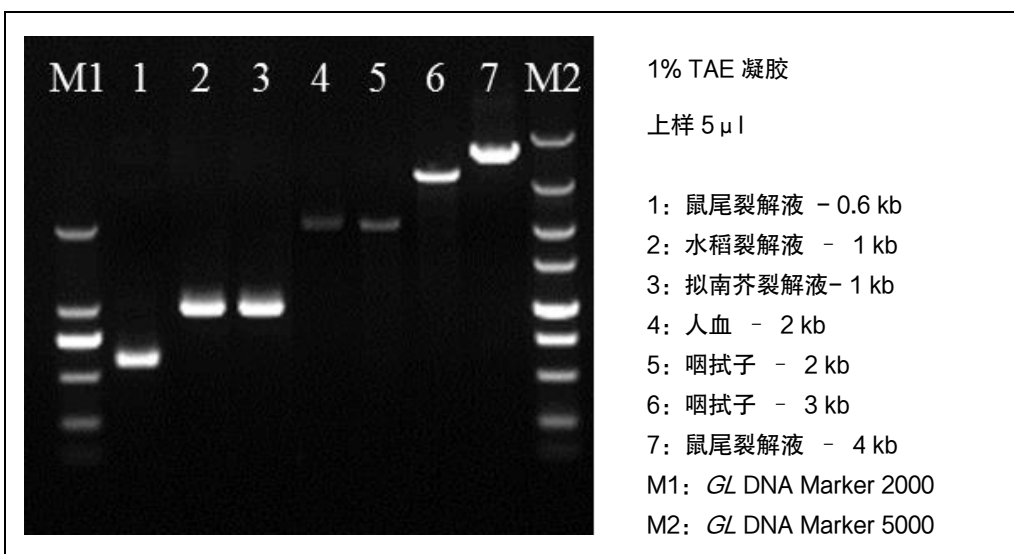
- 2) 将鼠尾、水稻叶片、拟南芥叶片、咽拭子等样本用蛋白酶 K 法简单裂解【使用本公司产品 Lysis Buffer for PCR (Code No. AG12306) 】，取 2 μ l 简单裂解产物使用本产品进行扩增，均能获得很好的扩增效果；同时使用本产品直接扩增 2 μ l 人血样本也能获得很好的扩增效果。

反应程序：

温度	时间	循环数
95°C	1 min	1
95°C	15 sec	} 30
60°C	15 sec	
72°C	30 sec / kb*	
72°C	2 min	1

*：3kb 以下片段使用延伸时间 30 sec / kb，3kb 以上片段延伸时间设置为 1 min / kb。

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 T_m 值在 50 ~ 70℃，两引物 T_m 值相差不超过 5℃。
 - 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。
- ❖ 若设计的引物特异性较差，且不便更换引物时，建议升高退火温度，推荐 60°C 左右。

4. 扩增循环数

- ❖ 扩增循环数取决于模板的初始浓度，一般推荐 30 ~ 35 个循环。若扩增条带较弱，可尝试增加循环数；若存在非特异性扩增，可尝试减少循环数。

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	95°C	2 min	1
变性	95°C	15 sec	} 30-35
延伸	68°C	15 sec / kb	
终延伸	72°C	5 min	1