

(CM0235) 实验操作说明

一、产品信息

产品名称	规格
ApexHF HS DNA Polymerase Master Mix (dye plus) II	1 ml

二、保存

保存温度：-20°C保存

运输温度：干冰运输或者-20°C冰袋运输

三、PCR 反应

1) 配制 PCR 反应液^{*1}

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 ApexHF PCR Master Mix (dye plus) II ^{*2}	1X	25 μ l
Template	-	$\leq 5 \mu$ l ^{*3}
Primer F (10 μ M)	0.2 μ M ^{*4}	1 μ l
Primer R (10 μ M)	0.2 μ M ^{*4}	1 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: 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。

*3: 使用纯化的 DNA 模板, 一般推荐 ≤ 500 ng; 简单裂解后的模板建议添加 2 μ l 测试, 添加量可根据实验结果调整 (2~5 μ l)。

*4: 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^{*6})

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}	98°C	2 min	1
变性 ^{*2}	98°C	10 sec	} 30 ~ 35 ^{*5}
退火 ^{*3}	55°C	30 sec	
延伸	68°C	20 sec / kb ^{*4}	

- *1: 若扩增简单裂解产物, 一般可将预变性设置为 98°C 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。
- *2: 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。
- *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, 对于特异性较差的引物或 GC 含量较高的片段可适当调高 T_m 值, 或缩短退火时间 (~5 sec)。
- *4: 扩增正常 GC 含量的片段建议延伸速度为 20 sec / kb; 为节省扩增时间, 对于 5kb 以内简单的短片段, 延伸速度可 5 ~ 20 sec / kb 进行调整, 若片段过长或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。
- *5: 一般推荐使用 30 个循环进行扩增, 若扩增产量低可尝试提高循环数。
- *6: 当引物 T_m 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。

四、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°C	10 sec	} 30-35
延伸	68°C	10 sec / kb	