

动物组织直扩 PCR 试剂盒说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

描述:

RAPA3G DNA 聚合酶为经电子重构架的第三代 TaqDNA 聚合酶,第三代 DNA 聚合酶具有高度的杂质耐受性、长片段扩增能力、高扩增成功率、高产量,这些特点使得 RAPA3G 系列产品可用于粗制样品的直接扩增,无需核酸纯化步骤。该 PCR Mix 具有 5' -3' 的聚合酶活性、5' -3' 的外切酶活性、3' -5' 的外切酶活性,产物部分带有”A“尾巴,部分为平末端,因此产物可用于 TA 克隆或平端克隆。

特点和用途:

(1) 高杂质耐受性: 该 PCR Mix 可直接使用血液、蛋白含量较高的动物组织材料进行 PCR 扩增,无需基因组提取。

(2) 高效的快速 DNA 释放剂: 尽管该 PCR Mix 可以直接使用组织细胞材料进行扩增,但我们仍然推荐采用 DNA 释放剂进行样本的快速前处理(约需要 5min,可高通量操作)。DNA 释放剂的前处理,使得制备的 DNA 模板可以进行多次、多基因扩增,并长期保存 DNA,经 DNA 释放剂处理的样本,在室温条件下放置 1 个月,无任何后续影响,-20 可长期保存。

(3) 快速 PCR: 该酶具有 6kb/min 以上的扩增速度,可显著的缩短 PCR 的扩增时间,在常规测试条件下,10s 的延伸时间可完成 1kb 的基因组 DNA 扩增。

(4) 粗制样品的扩增能力: 扩增能力>4kb。

(5) 高保真性能: 该制品包含一定比例的 RAPA HiFi 超保真 DNA 聚合酶,因此其具有一定的保真性能(经蓝白斑测试,其保真性能约为 Taq DNA 聚合酶的 56 倍)。

(6) 热启动,防止非特异性扩增: RAPA3G 系列产品均采用 HaiGene 专有的热启动技术,确保 50 度以下完全无活性,仅有 95 度加热 5min 以后才能恢复其活性,因此可最大限度的提高扩增的特异性,减少非特异性产物的产生。

包装:

2×RAPA3G PCR Mix (with Dye)	1ml×2
快速 DNA 释放剂 A	20 ml
快速 DNA 释放剂 B	20 ml

储存: 长期储存置于-20° C 以下,可保存 2 年;短期使用置于 4° C (3 个月) 保存。

使用方法

1. DNA 释放

(1) 采用加热法: 取 2-10 个毛发囊、1-10mg 动物组织等材料,放入到 0.2ml EP 管中,加入 50 μl 快速 DNA 释放剂 A,于 PCR 仪中 98° C 加热 5min,加热完毕后加入 50 μl 快速

DNA 释放剂 B, 混合均匀, 即可使用。

(2) 采用钢珠研磨法: 取 1-10mg 动物组织等材料, 放入到 2ml EP 管中, 加入 250 μ l 快速 DNA 释放剂 A 和 2-3 粒钢珠, 研磨 1-2min 成浆体装。研磨完毕后加入 250 μ l 快速 DNA 释放剂 B, 混合均匀, 即可使用。

2. 按下表配制 PCR 反应体系并混合均匀:

2×RAPA3G PCR Mix (with Dye)	25 μ l
上游引物(10 μ M)	2 μ l
下游引物(10 μ M)	2 μ l
步骤 1 制备的模板 DNA	2 μ l
ddH ₂ O	19 μ l

注意: 当扩增片段>5kb 时, 引物用量调整为 0.25-0.5 μ l。

3. PCR 扩增循环参数

循环数	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}$ C	5min
	95 $^{\circ}$ C	20s
25-40 Cycles	50~60 $^{\circ}$ C	20s
	72 $^{\circ}$ C	4-6kb/min
末延伸	72 $^{\circ}$ C	2min

请注意:

(1) 该制品为热启动制品预变性步骤 5min 不可缩短, 否则 DNA 聚合酶无法恢复活性。

(2) 当扩增片段<1kb 时, 延伸时间使用 15s; 扩增片段 1-2kb 时, 延伸时间使用 45s, 扩增片段 2-3kb 时, 延伸时间使用 1min, 当扩增片段>3kb 时, 请按照 2kb/min 的延伸时间进行设置。

(3) 尽管该酶具有 6kb/min 的延伸速度, 但按照 2kb/min 设置延伸时间的条件下, 能获得最高的产量。

3. 注意事项: (1) 当模板 GC 含量>70%时, 请添加 5× Q-Solution。(2) 当采用全血、血浆等蛋白含量极高的样本时, 扩增完毕后可能会有变性的蛋白沉淀, 请离心后再进行点样和电泳。