

PCR Mix II

货号: P2011b, P2012b, P2013b, P2014b, P2015b

产品简介

PCR Mix II 是 PCR Mix 的升级版, 具有更好的灵敏度和特异性。PCR Mix 是 2×浓缩的 PCR 扩增预混合溶液, 含有 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、缓冲液等 PCR 扩增必需组分(模板与引物除外)。使用时, 仅需在扩增体系中加入模板和引物即可进行 PCR, 大大简化操作过程, 缩短操作时间, 降低污染(加样次数减少)。同时, 由于体系内含有增强剂, 能够显著增强 PCR 扩增的灵敏度。扩增产物具有 3'-dA 突出端, 可直接用于 TA 克隆。

Taq DNA 聚合酶是嗜热性细菌 *Thermus aquaticus* 来源的热稳定重组型 Taq DNA 聚合酶, 分子量为 94 KD。扩增片段的长度可达 10 kb(简单模板)。延伸速度为 30s/kb(70-75℃, 简单模板可达 10s/kb)。该酶具有 5'→3'聚合酶活性, 无 3'→5'外切酶活性。

产品组成

Component	P2011b	P2012b	P2013b	P2014b	P2015b
2× PCR Mix II	1 ml	1 ml× 5	1 ml× 10	1 ml× 50	1 ml× 100
超纯水	1 ml	1 ml× 5	-	-	-

本产品分含体系中包含溴酚蓝、不含溴酚蓝两类。体系中包含溴酚蓝的产品, PCR 扩增产物可直接电泳检测。这两类产品的扩增性能无差异。如无特别说明提供体系中包含溴酚蓝的包装。

保存条件

-20℃保存 2 年。

质量控制

纯度检测: 经质量检测, 产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测: PCR 方法检测无宿主残余 DNA, 能有效扩增人基因组中的单拷贝基因。

应用举例

1. 配制反应体系

请于冰上配置反应体系, 体系大小与组分量与添加顺序可调整:

Ordinal	Component	Volume (50 µl reaction volume)	Final concentration (50 µl reaction volume)
1	2× PCR Mix II	25 µl	1×
2	upstream primer (10 µM) ^[1]	2 µl	0.4 µM
3	downstream primer (10 µM) ^[1]	2 µl	0.4 µM
4	template DNA ^[2]	1-4 µl	<1µg
5	超纯水 ^[3]	To 50 µl	-
optional	MgCl ₂ (MgSO ₄)/PCR Enhancer ^[4]	Variable	-

[1] 引物终浓度建议范围: 0.1-1 µM。特异性差时可降低浓度, 效率低时可提高浓度。

[2] 不同模板最佳用量不同, 部分 DNA 模板建议用量如下表(50 µl 反应体系)。

Template	人类基因组 DNA	λDNA	大肠杆菌基因组 DNA	质粒 DNA
Dosage	0.1µg-1µg	0.5ng-5ng	10ng-100ng	0.1ng-10ng

[3] 可单独订购超纯水(Cat. #: P9021/P9022/P9023)。

[4] 可单独订购 25mM MgCl₂(Cat. #: P9031) 和 PCR Enhancer(Cat. #: P9041)。

2. 设定反应程序进行 PCR 反应

Stage	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	94℃	3 min	1
Denaturation	94℃	30 sec	25-35
Annealing	55-68℃ ^[1]	30 sec	
Extension	72℃	Variable ^[2]	
Final Extension	72℃	5-10 min	1

[1] 退火温度应根据 T_m 值较低的引物来设。

[2] 延伸时间按 30s/kb 来设最佳(简单模板可达 10s/kb)。

3. 分析结果

反应产物可直接进行琼脂糖凝胶电泳, 通过凝胶成像设备观察目的条带的扩增情况。如有需要, 可进行割胶回收。

无产物或产物量少的改进措施有：1 调整退火温度；2 减少抑制剂的影响，如提取的基因组 DNA 中含有抑制扩增的成分，需要高倍稀释（1: 10000）后使用；3 采用乙醇沉降洗脱，提高模板 DNA 的纯度；4 使用 PCR 添加剂，如 PCR Enhancer（Cat. #: P9041）、MgCl₂（Cat. #: P9031）等可提高产量。

操作注意事项

- 1 室温下 Taq DNA 聚合酶有一定的活性，为避免发生非特异性扩增，请于冰上配置反应体系，并且最后添加模板 DNA。
- 2 Taq DNA 聚合酶具有脱氧核苷酸转移酶活性，因此在 PCR 产物 3'末端通常会加上 1 个多余的脱氧腺嘌呤核苷，可直接用于 TA 克隆。
- 3 碱基错误率是指在每个碱基合成过程中所掺入的错误核苷酸数目。Taq DNA 聚合酶的碱基错误率为 1×10^{-5} 。

引物设计注意事项

引物长度一般在 15-30 个碱基之间；上下游引物 3'末端避免互补，避免出现 3 个以上重复的 G 或 C，或出现发夹结构，否则会产生非特异性扩增；GC 含量控制在 40-60%，且上下游引物 GC 含量尽量接近；Tm 值控制在 55-65℃之间，且上下游引物 Tm 值尽量接近，额外附加序列（酶切位点、修饰等）是非模板匹配序列，不参与 Tm 值计算。

本品仅供科学研究使用。