



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

2X PCR Master Mix

产品编号	产品名称	包装
R32063-400T	2X PCR Master Mix	400T

产品简介:

2X PCR Master Mix 中含有 2X Taq DNA Polymerase, 2X PCR Buffer, 2X dNTP, 只需加入适量引物、模板和水即可进行 PCR 扩增。大大简化了 PCR 操作, 使操作更加快捷, 也减少了 PCR 操作过程中可能导致的污染, 使 PCR 的重复性更好。

利用 2X PCR Master Mix 可以进行各种常规的 PCR 扩增, 特别适合于定性和半定量的 PCR 扩增, 以及 2kb 以下 DNA 片段的 T 载体克隆。

2X PCR Master Mix 可以扩增出长达 8kb 的片段, 但通常更适合用于扩增 2kb 以下的 DNA 片段。

本产品稳定性高, 经测试, 反复冻融 15 次后对 PCR 的扩增效果无显著影响。

本试剂盒用于 50 微升的 PCR 反应体系, 足够用于 160 个反应; 用于 20 微升的 PCR 反应体系, 足够用于 400 个反应。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R32063-400T	2X PCR Master Mix	1ml×4
—	说明书	1 份

保存条件:

-20℃ 保存, 一年有效。

注意事项:

由于 PCR 反应非常灵敏可以扩增目的基因序列超过 1000 万倍, 在使用 Taq 酶时请注意避免微量待扩增 DNA 的污染, 并尽量考虑设置不加模板的空白对照以确认是否有待扩增 DNA 的污染。

Taq DNA polymerase 在 PCR 过程中每循环的出错几率约为 2.2×10^{-5} , 对于大于 1kb 的 DNA 片段的克隆推荐使用出错几率更低的 DNA 聚合酶, 例



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

如 Pfu DNA polymerase、BeyoTaq DNA polymerase 等。对于普通的 PCR 或 RT-PCR 定性检测或定量检测, Taq DNA polymerase 是最佳选择。

尽管本产品经过 15 次反复冻融后仍具有和冻融前几乎相同的 PCR 扩增效果, 但仍宜适当避免反复冻融本产品, 多次反复冻融可能使产品性能下降。

使用本产品前, 一定要完全融化, 并上下颠倒轻轻混匀后才能使用, 尽量避免起泡。

本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。

为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. PCR 反应体系的设置:

a. 融解并混匀 PCR 反应所需的各种溶液。将 2X PCR Master Mix 置于冰浴上或冰盒内。

b. 参考下表在冰浴上设置 PCR 反应体系:

试剂	最终浓度	体积	体积
双蒸水或 Milli-Q 水	-	(21-x) μ l	(8.4-y) μ l
模板 DNA	10pg- 1 μ g*	x μ l	y μ l
引物混合物(10 μ M each)	0.8 μ M	4 μ l	1.6 μ l
2X PCR Master Mix	1X	25 μ l	10 μ l
总体积	-	50 μ l	20 μ l

*对于不同类型的模板在 50 μ l 反应体积中推荐用量如下:

哺乳动物基因组 DNA: 0.1-1 μ g; 大肠杆菌基因组 DNA: 10- 100ng; 质粒 DNA: 0.1- 10ng。过多的模板 DNA 容易导致非特异性的 PCR 产物。

c. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微 Vortex 混匀, 室温离心数秒, 使液体积聚于管底。

d. 如果所使用的 PCR 仪有热盖则省略本步骤。如果 PCR 仪没有热盖, 则在管内滴入一滴矿物油。

e. 把设置好的 PCR 反应体系置于 PCR 仪上, 开始 PCR 反应。

2. PCR 反应参数的设置可以参考如下示例:



STEP1(起始变性): 94°C 3min

STEP2(变性): 94°C 30sec

STEP3(退火): 55°C 30sec

STEP4(延伸): 72°C 1min

STEP5(循环): Go To STEP2 for 30 cycles

STEP6(最终延伸): 72°C 10min

STEP7(临时保存): 4°C forever

注意:

a. PCR 反应的设置需根据模板、引物、PCR 产物的长度和 GC 含量等条件的不同设定不同的 PCR 反应条件包括温度、时间和循环数等。

b. STEP4(延伸)的时间设置需根据 PCR 产物的长度进行设置, 通常每 kb 产物的延伸时间为 1 分钟。例如 PCR 产物的长度为 1kb, 则延伸时间可以设置为 1 分钟, PCR 产物的长度为 2kb, 则延伸时间可以设置为 2 分钟, 以此类推。

c. 对于初次进行的 PCR, 为尽量确保可以扩增出预期的 PCR 产物, 可以把循环数设置为 35。对于需进行半定量或定量的 PCR 反应循环数一定要进行适当优化, 使 PCR 反应没有达到平台期。

常见问题:

1. PCR 产物非常少或没有特异性条带。

a. 引物设计不佳是 PCR 过程中最常见的问题。请选择适当的引物设计软件进行引物设计, 注意引物的 GC 含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在加入酶切位点等的引物中, 一定要注意加入酶切位点等后整条引物的 GC 含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在原有引物效果不佳的情况并且阳性对照引物可以正常工作的前提下, 可以考虑更换引物。

b. 待扩增片段 GC 含量偏高。GC 含量较高的情况下 PCR 会变得相对比较困难, 此时可以使用适合扩增高 GC 含量 DNA 片段的 GC-rich buffer, 并相应地根据 GC-rich buffer 的要求或说明调整 PCR 反应参数的设置。

c. 长片段扩增。尽管 Taq DNA polymerase 可以扩增最长达 8kb 的 DNA 片段, 但大多数时候比较适合扩增 2-3kb 以下的片段, 更长片段的扩增推荐使用其它更适合长片段扩增的 DNA 聚合酶。

d. PCR 反应设置时在室温进行容易导致非特异性条件。推荐在冰浴上设置 PCR 反应。

e. 由于引物存在一定的二级结构或存在一定的引物二聚体, 或引物偏短, 导致退火效果不佳。此时可以采用 Touch down 等方法进行退火, 通常采用从 65°C 逐步缓慢降温到 55°C 或 50°C 的方法, 使退火更加充分。

f. 退火温度不佳, 需要优化。如果有温度梯度 PCR 仪, 则可以设置退火的温度梯度, 摸索退火的最佳温度。如果没有温度梯度 PCR 仪, 则可以通过多次 PCR 反应摸索最佳的退火温度。

g. 延伸时间不足。可按照每 1kb 片段延伸 1 分钟进行设置, 对于较难扩增的片段可以设置为每 1kb 片段延伸 1.5-2 分钟。

h. 待扩增片段 GC 含量较高或长度较长, 变性不够充分。可以调节起始变性条件至 95°C 1min 甚至 95°C 2-4min。 i. 在不同 PCR 仪上进行 PCR 反应, 避免有时 PCR 仪出现问题。

j. 循环数不足, 适当延长 PCR 的循环数。通常循环数最高不必超过 40, 常用的循环数范围为 25-35。

k. 模板含量太低, 适当加大模板量, 或采用巢式 PCR(nested PCR)或二次 PCR。巢式 PCR 即为在原先设计的 PCR 引物内侧再设计一对 PCR 引物, 然后对第一次 PCR 产物进行稀释后再进行一次 PCR 扩增, 这样一方面可以起到扩增作用, 同时也可以从第一次 PCR 产物中扩增出特异性条带。二次 PCR 则为比较简单地用原有引物对第一次 PCR 产物进行稀释后再进行一次 PCR 扩增, 可以起到扩增作用, 但不能去除非特异性条带。

l. 模板中含有抑制 PCR 反应的物质, 可以用适当的 DNA 纯化方法例如柱纯化等纯化模板 DNA。

m. 当产生较多非特异性条带时, 可以适当提高退火温度。

n. 注意设置适当的阳性对照和阴性对照通常会有很大帮助。