

2× PCR Taq Master Mix-Dye

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

使用前充分混匀, -20℃稳定储存 24 个月, 避免反复冻融。

产品编号	产品名称	产品规格
YFXM0005	2× PCR Taq Master Mix-Dye	5×1mL

产品简介

2×Taq PCR Master Mix (with blue dye) 是一种包含蓝色染料的快速简单即用型 PCR 预混液。该预混产品简化了预混步骤, 具有节省时间, 降低污染的优点。反应体系中只需要添加引物, 模板和 ddH₂O。产品已含蓝色染料, 在 PCR 反应完成后, 不需添加上样缓冲液即可直接上样进行电泳, 蓝色染料可指示电泳进程, 其迁移速度在 1% TAE 琼脂糖凝胶中与 500 bp 双链 DNA 片段相近。

Taq DNA 聚合酶没有 3'→5'外切酶的能力, 3'端附有一个突出的"A"碱基, 纯化后可直接用于 TA 载体克隆。当待扩增片段 GC 含量偏高 (>60%) 或片段较长时, 推荐使用 2×Taq PCR Fusion-Fast Mix (with blue dye) (目录号: GK10036)。

2×Taq PCR Master Mix (with blue dye)在 PCR 扩增后可直接进行大规模基因检测、半定量 PCR 实验和微量 DNA 的检测, 也可用于从复杂模板中如基因组等扩增 PCR 产物, 如表达基因的克隆、基因的定点突变和细胞内基因点突变的分析 (SNP) 等。

注意事项

- 1、所有组分应仔细混匀并离心后开启, 所有 PCR 操作过程应在冰上进行。
- 2、从低温取出后, Mix 管底可能会析出沉淀, 属于正常现象, 请充分解冻混匀后使用。
- 3、高质量的模板可以提高扩增的成功率和产量, 尤其当进行长片段扩增时, 建议使用新鲜的高质量模板。
- 4、如遇到扩增效率较低时, 可适量提高模板量; 长片段扩增可通过设计长引物进行。

使用方法

- 1、PCR 反应体系 (具体操作中可根据实际反应体系, 按比例进行缩减)

组分	20μL 体系	50μL 体系
DNA 模板	≤1μg	≤1μg
正向引物 (10μM)	1μL	2.5μL
反向引物 (10μM)	1μL	2.5μL
2× PCR SuperPfu Master Mix	10μL	25μL
Nuclease-Free Water	补足至 20μL	补足至 50μL

注 1: 模板推荐使用量如下 (20μL 和 50μL 反应体系的模板使用量均在此范围内):

- 1) 目的 DNA ≤10kb, 质粒或 λ DNA 的模板量为 1pg-10ng; 基因组 DNA 的模板量为 20ng-300ng; cDNA 的使用量为 1μL-2μL (不超过 PCR 反应体积的 1/10)。
- 2) 目的 DNA ≥10kb, 质粒或 λ DNA 的模板量为 100pg-20ng; 基因组 DNA 的模板量为 100ng-500ng; cDNA 的使用量为 1μL-2μL (不超过 PCR 反应体积的 1/10)。

注 2: 引物浓度请以终浓度 0.1-1.0 μM 作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下, 可提高引物的浓度; 发生非特异性反应时, 可降低引物浓度, 由此优化反应体系。

2、反应条件设置:

流程	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	3-5min	
变性	95 $^{\circ}\text{C}$	25s	
退火	55-64 $^{\circ}\text{C}$	25s	30-35
延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	1min/kb	
终延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	5min	

在进行更长片段或者更复杂模板扩增时, 如上述程序仍不能有效扩增, 推荐使用下述梯度温度退火程序:

流程	温度	时间	循环数
预变性	98 $^{\circ}\text{C}$	3-5min	
变性	98 $^{\circ}\text{C}$	20s	
梯度退火	70-55 $^{\circ}\text{C}$	30s	15 循环, 每循环降 1 $^{\circ}\text{C}$ 。
延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	30s/kb	
变性	98 $^{\circ}\text{C}$	20s	
退火	55 $^{\circ}\text{C}$	30s	20
延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	30s/kb	
终延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	5-10min	

注:

a. 退火: 请根据引物 T_m 值设置退火温度。退火温度与扩增特异性相关, 可通过适当地提高退火温度来提高扩增特异性。退火时间可在 10-30s 之间进行调节, 退火时间过长可能会导致琼脂糖凝胶电泳条带呈弥散状, 因此, 一般模板按照推荐的 15s 设置即可, 对于一些扩增困难的复杂模板可适当延长退火时间。

b. 延伸: 本聚合酶扩增时延伸速度约为 1min/kb, 可根据扩增产物的长度和模板的复杂性设置相应的延伸时间, 复杂性较低时 (例如: 质粒、 λDNA) 可用 15-30 s/kb 的延伸时间; 适当延长延伸时间可提高产物产量。

3、取 2-5 μL 反应液电泳观察结果。