

Taq 2X PCR Master Mix

目录号: RK20602

规格: 100 RXN / 500 RXN (50 μL/RXN)

浓度: 2X

产品组成:

Taq 2X PCR Master Mix	RM20350
-----------------------	---------

产品说明

Taq 2X Master Mix 是经过优化的预混液, 包含有 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂、KCl 和稳定剂等。本产品适用于常规 PCR 扩增, 模板可以是纯化的 DNA、细菌菌落/菌液或 cDNA 等。该产品可以以复杂的基因组 DNA 为模板扩增 4 kb 长度的目的片段或以 lambda DNA 为模板扩增 5 kb 长度的目的片段。适用于 PCR 反应、菌落 PCR、引物扩增等。

1X Master Mix 组成

10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.08% IPGAL 630, 0.05% Tween 20, pH 8.6 @ 25°C; 200 μM dNTPs, 5% Glycerol, 25 U/mL Taq DNA 聚合酶等

保存温度

-20°C

5'-3' 核酸外切酶活性

有

3'-5' 核酸外切酶活性

无

产物末端

3' 含有单 dA 核苷酸突出末端

出错率

约 285 X 10⁻⁶ 碱基

操作说明

推荐的 PCR 反应

推荐冰上配制反应体系, 然后将该体系快速转移至已预热到 98°C 的 PCR 仪中。

推荐的反应体系 (以 25 和 50 μL 反应体系为例)

组分	加入量 (25 μL 体系)	加入量 (50 μL 体系)
ddH ₂ O	to 25 μL	to 50 μL
上游引物 (10 μM)	0.5 μL	1 μL
下游引物 (10 μM)	0.5 μL	1 μL
模板 DNA	Variable	Variable
Taq 2X PCR Master Mix	12.5 μL	25 μL

推荐的 PCR 反应程序

温度	时间	循环数
95°C	30 s	1
95°C	15-30 s	
45-68°C	15-60 s	30
68°C	1 kb/min	
68°C	5 min	1
4-10°C	∞	

PCR 基本原则

1. 模板

使用高质量纯化的 DNA 模板可以增加 PCR 的成功率。

推荐加入的 DNA 模板量 (50 μL 反应体系)

DNA 类型	模板量
基因组 DNA	1 ng-1 μg
质粒或病毒 DNA	1 pg-1 ng

2. 引物

寡核苷酸引物长度通常在 20-40 nt 之间, 理想的 GC 含量为 40-60%。可以使用软件 (例如 Primer 3) 设计和分析引物。PCR 反应体系中每条引物的终浓度可以在 0.05-1 μM 范围内调整, 一般使用浓度在 0.1-0.5 μM 之间。

3. Mg²⁺ 和添加剂

在 *Taq* DNA 聚合酶的大部分 PCR 反应体系中最优的 Mg²⁺ 浓度应在 1.5-2.0 mM 范围内。对于一些扩增困难的样本，例如高 GC 的 DNA 样本，可能需要在 PCR 反应体系中加入添加剂，例如 DMSO 或甲酰胺等。

4. 变性

95°C 预变性 30 s 可使大多数纯化的 DNA 模板充分变性，对复杂的模板，例如高 GC 序列，需要将预变性时间延长到 2-4 min，以充分变性 DNA 模板。对于菌落 / 菌液 PCR，推荐 95°C 预变性 5 min 以充分裂解菌体。在扩增循环中，推荐的变性条件是 95°C 15-30 s。

5. 退火

退火时间一般推荐 15-60 s，退火温度与引物对的 T_m 值相关，温度一般设置为 45-68°C。退火温度可以通过 PCR 温度梯度实验进行优化，一般从 T_m 值 5°C 以下开始设置温度梯度。

6. 延伸

推荐使用 68°C 的延伸温度，延伸时间与扩增片段长度有关，可以按照 1 kb/min 的扩增速度计算扩增时间；在 PCR 循环结束之后，需要在 68°C 条件下再延伸 5 min。

7. 循环数

一般进行 25-35 个循环即可得到充足的 PCR 产物，若需要检测低拷贝基因，可以将循环数增至 45。

8. 二步法 PCR

当引物的退火温度大于 68°C 时，推荐二步法 PCR。

二步法 PCR 反应程序

温度	时间	循环数
95°C	30 s	1
95°C	15-30 s	30
65-68°C	1 kb/min	
65-68°C	5 min	1
4-10°C	∞	

9. PCR 产物

使用 *Taq* 2X Master Mix 产生的 PCR 产物 3' 端含有单 dA 核苷酸突出，因此 PCR 产物可以用于 dT / dU 末端载体的连接。