

# FirstTaq 2X PCR Master

TEL: 400-999-6126

## Mix with GC Buffer

WEB: www.abclonal.com.cn

目录: RK20623

规格: 100 RXN / 500 RXN (50  $\mu$ L/RXN)

浓度: 2X

产品组成:

FirstTaq 2X PCR Master Mix with GC Buffer	RM20355
FirstTaq High GC Enhancer	RM20135

### 产品组成

FirstTaq 2X Master Mix with GC Buffer 是 Taq Klenow 片段和 Deep Oean DNA 聚合酶混合优化的 DNA 聚合酶, 该产品非常适合于高 GC DNA 模板的 PCR 扩增, 模板类型包括纯化的 DNA、cDNA 和细菌菌落/菌液等。Deep Oean DNA 聚合酶的 3'-5' 核酸外切酶活性增加了 Taq Klenow 的保真度和扩增效果。Master Mix 中含有 dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、反应缓冲液和 PCR 稳定剂, 使用时仅需加入 DNA 模板、引物和无酶水即可进行有效的扩增反应。

保存温度: -20°C

### 1X Master Mix 组成

80 mM Tris-SO<sub>4</sub>, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 5% DMSO, 0.2 mM dNTPs, 25 U/mL FirstTaq DNA Polymerase, 0.05% Tween 20, 0.06% IGEPAL CA-630, 5% Glycerol, pH 9.2 @ 25°C

5'-3' 核酸外切酶活性: 无

3'-5' 核酸外切酶活性: 有

产物末端: 3' 含有单 dA 核苷酸突出末端

出错率: 小于 140 X 10<sup>-6</sup> 碱基

### 操作说明

#### 推荐的 PCR 反应

组分	加入量 (25 $\mu$ L 体系)	加入量 (50 $\mu$ L 体系)
ddH <sub>2</sub> O	to 25 $\mu$ L	to 50 $\mu$ L
上游引物 (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L
下游引物 (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L
模板 DNA	Variable	Variable
FirstTaq 2X Master Mix with GC Buffer*	12.5 $\mu$ L	25 $\mu$ L

推荐冰上配制反应体系, 然后将该体系快速转移到 94°C 预热的 PCR 仪中。

#### 推荐的反应体系(以 25 和 50 $\mu$ L 为例)

\*, 注: 扩增困难和高 GC 的 DNA 模板, 添加终浓度为 0-20% FirstTaq High GC Enhancer 可以改善扩增效果。

注: 温和混匀反应体系, 如有必要可以通过短暂快速离心将试剂收集到管底。若使用无热盖的 PCR 仪, 可以在反应体系表面覆盖一层矿物油防止溶液蒸发。

#### 推荐的 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	30 s	1
变性	94°C	5-30 s	
退火	45-68°C	15-60 s	25-35
延伸	68°C	1 kb/min	
终延伸	68°C	5 min	1
Hold	4-10°C	$\infty$	1

# 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(以 50  $\mu$ L 体系为例)

DNA 类型	模板量
基因组 DNA	1 ng-1 $\mu$ g
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  $\mu$ M 范围内调整,一般使用 0.2  $\mu$ M。

## 3. $Mg^{2+}$ 和添加剂

在 FirstTaq DNA 聚合酶的大部分 PCR 反应体系中,最优的  $Mg^{2+}$  浓度应在 1.5-2.0 mM 之间。1X FirstTaq Master Mix with GC Buffer 中  $Mg^{2+}$  浓度是 2 mM,能满足绝大多数扩增子的扩增。可以按 0.2 mM 的增量对  $Mg^{2+}$  浓度进行优化,但需使用  $MgSO_4$ 。对于扩增极困难的扩增子,可以添加终浓度为 10-20% 的 FirstTaq High GC Enhancer。

## 4. 变性

94°C 预变性 30 s 可使大多数纯化的 DNA 模板充分变性,但对于复杂的模板,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 94°C 预变性 2-5 min 以充分裂解菌体。在扩增循环中,推荐的变性条件是 94°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,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,一般从引物  $T_m$  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,须在 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. PCR 产物

使用 FirstTaq DNA 聚合酶产生的 PCR 产物 3' 端含有单 dA 核苷酸突出,因此该产物可以用于 dT / dU 末端载体的连接。