

FirstTaq 2X PCR Master Mix with GC Buffer with Dye

TEL: 400-999-6126

WEB: www.abclonal.com.cn

目录: RK20627

规格: 100 RXN / 500 RXN (50 μ L/RXN)

浓度: 2X

产品组成:

FirstTaq 2X PCR Master Mix with GC Buffer with Dye	RM20366
FirstTaq High GC Enhancer	RM20135

产品说明

FirstTaq 2X PCR Master Mix with GC Buffer with Dye 是经过优化的预混液, 包含有 FirstTaq DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液和稳定剂等, 也包含了用于 DNA 凝胶电泳的商业化示踪染料 (二甲苯腈 FF 和柠檬黄)。FirstTaq DNA 聚合酶是 Taq Klenow 和 Deep Oean DNA 聚合酶混合优化的 DNA 聚合酶, 常用于常规和困难模板的 PCR 实验。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。使用 1X TBE 配制的 1% 琼脂糖凝胶中, 二甲苯腈 FF 约与 4 kb DNA 的迁移速率相同, 柠檬黄约与 10 bp 的 DNA 迁移速率相同。1X 浓度的这两种染料不会影响 PCR 反应和 DNA 电泳条带的迁移。

保存温度: -20°C

1X Master Mix 组成

80 mM Tris-SO₄, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 5% DMSO, 0.2 mM dNTPs, 25 U/mL FirstTaq DNA Polymerase, 0.05% Tween 20, 0.06% IGEPAL CA-630, 5% Glycerol, 1X Xylene Cyanol, 1X Tartrazine, 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 10⁻⁶ 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到 94°C 预热的 PCR 仪中。

推荐的反应体系 (以 25 和 50 μ L 反应体系为例)

组分	加入量 (25 μ L 体系)	加入量 (50 μ L 体系)
ddH ₂ O	to 25 μ L	to 50 μ L
上游引物 (10 μ M)	0.5 μ L	1 μ L
下游引物 (10 μ M)	0.5 μ L	1 μ L
模板 DNA	Variable	Variable
FirstTaq 2X Master Mix with GC Buffer with Dye*	12.5 μ L	25 μ L

*, 注: 对于扩增困难和高 GC 的 DNA 模板, 添加终浓度为 0-20% 的 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
预变性	94°C	30 s
变性	94°C	15-30 s
退火	45-68°C	15-60 s
延伸	68°C	1 kb/min
终延伸	68°C	5 min
Hold	4-10°C	∞

PCR 基本原则

1. 模板

使用高质量纯化的 DNA 模板将增加 PCR 的成功率。

推荐的 DNA 模板量 (50 μ L 反应体系)

DNA 类型	模板量
基因组 DNA	1 ng-1 μ 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 μ M 范围内调整,一般使用的终浓度为 0.2 μ M。

3. Mg^{2+} 和添加剂

在 FirstTaq DNA 聚合酶大部分的 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。可以使用 $MgSO_4$ 按 0.2 mM 的增量对体系中 Mg^{2+} 浓度进行优化。对于极困难的扩增子,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,例如高 GC 的序列,需要将预变性时间延长至 2-4 min 以充分变性 DNA 模板。对于菌落或菌液 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的长度有关,可以按照 1 kb/min 的扩增速度来计算扩增时间;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,可以将循环数增加至 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。