

版本号: M16B01V1.0



TEL: 400-999-6126

WEB: www.abclonal.com.cn

# FirstTaq 2X PCR Master Mix with GC Buffer with Dye

目录: RK20627

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 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、MgCl<sub>2</sub>、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-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, 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<sup>-6</sup> 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  $\mu$ L 反应体系为例)

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 with Dye*	12.5 $\mu$ L	25 $\mu$ 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	$\infty$

# 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  $\mu$ L 反应体系)

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,一般使用的终浓度为 0.2  $\mu$ 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。