

# Taq 2X PCR Master

## Mix with Dye

目录号: RK20604

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

浓度: 2X

产品组成:

Taq 2X PCR Master Mix with Dye

RM20375

### 产品说明

Taq 2X Master Mix with Dye 是经过优化的预混液, 包含有 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、KCl 和稳定剂等, 并包含了用于 DNA 凝胶电泳的示踪染料 (二甲苯腈 FF 和柠檬黄)。

在 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 DNA 的迁移速率相同。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。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。本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。

### 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  $285 \times 10^{-6}$  碱基

### 1X Master Mix 组成

10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.08% IPGAL 630, 0.05% Tween 20, pH 8.6 @ 25°C; 200  $\mu$ M dNTPs, 5% Glycerol, 25 U/mL Taq DNA 聚合酶, 1X 二甲苯腈 FF, 1X 柠檬黄

### 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 $\mu$ L 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
Taq 2X PCR Master Mix with Dye	12.5 $\mu$ L	25 $\mu$ L

#### 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	30
45-68°C	15-60 s	
68°C	1 kb/min	1
68°C	5 min	
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 (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应在 0.05-1  $\mu\text{M}$  范围内调整，一般使用浓度在 0.1-0.5  $\mu\text{M}$  之间。

### 3. $\text{Mg}^{2+}$ 和添加剂

在 *Taq* DNA 聚合酶的大部分 PCR 反应体系中最优的  $\text{Mg}^{2+}$  浓度在 1.5-2.0 mM 范围之内。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 模板能充分变性，但对复杂的模板，例如高 GC 序列，需要将 95°C 的预变性时间延长到 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，温度一般设置在 45-68°C 之间。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	1
65-68°C	5 min	1
4-10°C	$\infty$	1

### 9. PCR 产物

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