

产品组分

组分名称	组分编号	规格 1	规格 2	规格 3
		1 mL	5 mL	100 mL
PowerPol 2X PCR Mix	RM20387	1 mL	1 mL × 5	1 mL × 100

产品说明

PowerPol 2X PCR Mix 是经过优化的预混液, 包含有 DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂、KCl 和其他稳定剂等, 只需加入模板和引物即可进行扩增, 扩增产物为平末端。

本产品可以以复杂的基因组 DNA 为模板扩增 5 kb 长度的目的片段或以 lambda DNA 等简单模板扩增 10 kb 长度的目的片段。本产品具有一定的保真度, 可以用于遗传标记分型、植物转基因鉴定、载体构建等应用。

产品来源

PowerPol 2X PCR Mix 中 DNA 聚合酶基因在大肠杆菌中诱导表达和分离纯化得到。

保存温度

-20°C

保真度

6X *Taq*

热失活

否

操作说明

标准操作

1. 推荐将所有的反应组分在冰上配制, 然后快速将反应体系转移到预热到 98°C 的 PCR 仪中。
2. 推荐的 PCR 反应如下:

PCR 反应体系

组份	25 µL	50 µL	终浓度
PowerPol 2X PCR Mix	12.5 µL	25 µL	1X
上游引物 (10 µM)	0.5 µL	1 µL	0.2 µM
下游引物 (10 µM)	0.5 µL	1 µL	0.2 µM
DNA 模板*	1-2 µL	Variable	<300 ng
Nuclease-free Water	to 25 µL	to 50 µL	N/A

*, 注: 不同 DNA 模板最佳反应浓度不同, 可参考 PCR 基本原则。

推荐的 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	45 s*	1
变性	98°C	10 s	} 30
退火	60°C	30 s	
延伸	72°C	20-30 s/kb	
终延伸	72°C	5 min	1
Hold	4-12°C	-	1

*, 注: 对复杂的模板, 例如高 GC 序列, 可以延长预变性时间到 3 min 以充分变性。

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, 在 50 µL 反应体系中推荐加入的 DNA 模板量如下:

DNA 类型	模板量
植物, 动物及人基因组 DNA	10 ng-100 ng
<i>Ecoli</i> DNA, lambda DNA	10 pg-200 ng
质粒 DNA	1 pg-10 ng

注意: 如果 DNA 模板是从 cDNA 合成反应中获得的, 则添加的体积应小于总反应体积的 10%。若扩增长片段, 可适当增加模板投入量。

2. 引物

寡核苷酸引物长度通常是 20-40 nt, 理想 GC 含量 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 0.1-1 µM 范围内调整, 一般使用 0.2 µM。

3. 变性

98°C 预变性 45 s 对大多数纯化的 DNA 模板能充分变性, 对复杂的模板, 例如高 GC 序列, 可以延长预变性时间到 3 min 以充分变性。在扩增循环中, 对大多数 DNA 模板推荐的变性条件是 98°C 5-10 s。

4. 退火

PowerPol 2X PCR Mix 中聚合酶的退火温度往往高于其他 PCR 聚合酶。通常, 可以默认退火温度为 60°C; 对大于 20 nt 的引物, 按(较低引物 Tm+3)°C 进行退火 10-30 s; 对小于 20 nt 的引物, 则应采用与较低引物 Tm 相当的退火温度。使用新的引物对进行扩增时, 建议温度梯度试验确定最优的退火温度。若使用两步法进行扩增循环, 温度梯度可以设置为与延伸温度相同。

5. 延伸

推荐延伸温度为 72°C, 延伸时间取决于扩增基因的长度和复杂程度。通常可以按 10-30 s/kb 速度进行延伸。延伸时间对于简单模板如 *Ecoli*、Lambda 在 10 s/kb 左右; 对于较为复杂的模板可以适当延长延伸时间在 20-30 s/kb 左右。对于复杂的扩增子, 如基因组 DNA, 建议按 1 min/kb 速度进行延伸。对于 cDNA 模板, 延伸速度为 1 min/kb。

6. 循环数

通常进行 25-35 个循环可以得到足量的 PCR 产物。