

2×PCR Mix

产品组成

Cat. No.	7003100	7003500
2×PCR Mix	1 ml	1 ml×5
ddH ₂ O	1 ml	1 ml×5
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

- 20℃保存有效期为两年以上；2~8℃保存，有效期为6个月。反复冻融不影响使用。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

2×PCR Mix 是一种优化的两倍浓度的 PCR 预混合液。适用于常规 PCR，可以从复杂基因组 DNA 中扩增出长达 4 kb 的片段或者从 λDNA 中扩增出长达 5 kb 的片段。PCR 增强剂和蛋白稳定剂协同提高了 PCR 效率和灵敏度，非常适合低拷贝模板扩增。产品使用方便，只需要取 0.5 倍 PCR 体系体积的 2×PCR Mix，加入引物和模板，以 ddH₂O 补足体积即可。

本试剂盒扩增得到的目的产物 3'端附有一个 A 碱基，可以直接克隆于 T-Vector 中。产品含有蓝色电泳指示染料，扩增产物可直接进行琼脂糖电泳检测。

PCR 体系成分

- 模板 DNA 的纯度：很多残留的核酸提取试剂会影响 PCR 反应，包括蛋白酶、蛋白变性剂(比如 SDS、胍盐)、高浓度盐(KAc、NaAc、辛酸钠等)和高浓度 EDTA 等。纯度不高的模板（比如煮沸法获取的模板）用量请勿超过 PCR 反应体系的 1/10（比如 50 μl 反应体系中加入模板的体积不应超过 5 μl）。如果模板 DNA 纯度太差，可使用 Simgen DNA 纯化试剂盒（Cat. No.2101050）对模板 DNA 进行纯化及浓缩。经 Simgen DNA 纯化试剂盒纯化后的模板使用量可多至 PCR 反应体系体积的 1/2。
- 模板 DNA 用量：极微量的 DNA 也可以作为 PCR 模板，但为保证反应的稳定性，50 μl 体系建议使用 10⁴ 拷贝的靶序列作为模板。模板 DNA 的推荐使用量：

人基因组DNA： 50 ng~500 ng/50 μl PCR反应体系

大肠杆菌基因组DNA： 10 ng~100 ng/50 μl PCR反应体系

λDNA： 0.5 ng~5 ng/50 μl PCR反应体系

质粒DNA： 0.1 ng~10 ng/50 μl PCR反应体系

如需用扩增产物作为模板再扩增，应至少将扩增产物稀释 1,000 至 10,000 倍后再作为模板使用。

- 引物浓度：一般每条引物配制的浓度为 10 μM (50×)，工作浓度为 0.2 μM。引物过量可能会出现非特异性扩增，引物过少则可能会降低扩增效率。

PCR 参数设置

- 预变性：一般预变性为 94℃，1~5 min。变性温度过高或时间过长都会损失 Taq 酶的活性。
- 退火：退火温度是 PCR 的关键，温度过高可能降低产量，温度过低可能产生引物二聚体或非特异性扩增。初次尝试 PCR 扩增建议直接选用 55℃ 作为退火温度，或者尝试使用低于 T_m 5℃ (如果两条引物 T_m 不同，参考较低的 T_m) 的温度作为退火温度。一般引物合成公司会提供所合成引物的 T_m，也可以根据此公式估算引物 T_m: $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A} + \text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G} + \text{C})$ 。最佳退火温度需要进行梯度 PCR 确定。
- 延伸：延伸温度通常为 72℃，延伸时间长短取决于目的 DNA 片段长度，以 1 kb/min 计算所需延伸时间，时间过长可能会导致非特异性增加。循环结束后，继续延伸 5~10 min，以获得完整的双链产物。
- 循环数：一般使用 25~35 个循环，低拷贝模板可适当增加循环数。过多的循环数可能会增加非特异性扩增，减少特异性产物。

操作步骤：

1. 将2×PCR Mix、ddH₂O、模板 DNA 和引物室温解冻，置于冰上。
2. 将解冻后各个组分上下翻转混合均匀，按下列组成配制 PCR 反应液：

2×PCR Mix	25 μl
Primer 1 (10 μM)	1 μl
Primer 2 (10 μM)	1 μl
模板	n μl
ddH ₂ O	(23-n) μl
Total	50 μl

* 注意：上述例子为 50 μl 反应体系所加的组分，如果需要其他体积的反应体系，请按比例增减各组分。

3. 手指轻弹 PCR 反应管充分混匀，简短离心。
4. PCR 反应循环设置举例

94°C 3 min

94°C 30 sec	} 35 Cycles
※55°C 30 sec	
§ 72°C 1 min	

72°C 5 min

※以实际最佳退火温度为准。

§ 以1 kb/min计算。

对于扩增300 bp以下的目的片段，可用两步法扩增，以节省扩增时间：

94°C 3 min

94°C 20 sec	} 35 Cycles
60°C 1 min	

72°C 5 min

5. 结果检测：取5-10 μl扩增产物直接进行琼脂糖电泳检测。

* 琼脂糖凝胶浓度与线形 DNA 最佳分辨范围的关系：

琼脂糖浓度	最佳线形 DNA 分辨范围
0.5%	1,000~30,000
0.7%	800~12,000
1.0%	500~10,000
1.2%	400~7,000
1.5%	200~3,000
2.0%	50~2,000