

## 2×Taq PCR Master Mix

### 产品组成

Cat. No.	7001100	7001500
2×Taq PCR Master Mix	1 ml	1 ml×5
ddH <sub>2</sub> O	1 ml	1 ml×5
说明书	1 份	1 份

### 产品储存与有效期

- 20℃以下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](mailto:technical@simgen.cn), 电话：400-0099-857。

### 产品介绍

2×Taq PCR Master 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×Taq PCR Master Mix，加入引物和模板，以 ddH<sub>2</sub>O 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。产品含红色和黄色两种电泳指示染料，两者不会抑制 PCR，也不会影响 EB 显色，其电泳相对迁移距离见表 1：

表1：琼脂糖凝胶浓度与染料相对迁移距离

凝胶浓度	红色染料	黄色染料
0.8%	2000bp	~80 bp
1.0%	1500bp	~40 bp
1.5%	1000bp	~20 bp
2.0%	500bp	<10 bp
2.5%	350bp	<10 bp
3.0%	200bp	<10 bp

### 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，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 10<sup>4</sup> 拷贝以上的靶序列作为模板。模板 DNA 的推荐使用量：
 

人基因组DNA：	0.05 μg~0.5 μg/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，否则可能会出现涂抹条带或无特异性条带。
- 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

1. 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。
2. 退火：退火温度是 PCR 的关键，温度过高可能降低产量，温度过低可能会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℃，或者使用尝试低于 T<sub>m</sub> 5℃ (如果两条引物 T<sub>m</sub> 不同，参考较低的 T<sub>m</sub>) 作为退火温度。一般引物合成公司会提供所合成引物的 T<sub>m</sub>，也可以根据此公式估算引物 T<sub>m</sub>：T<sub>m</sub> = 2℃ × (A+T) + 4℃ × (G+C)。最佳退火温度需要进行梯度 PCR 确定。
3. 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。
4. 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×Taq PCR Master Mix、ddH<sub>2</sub>O、模板 DNA 和引物室温解冻，置于冰上。
2. 将解冻后的各个组分上下翻转混合均匀，按下列组成配制 PCR 反应体系：

2×Taq PCR Master Mix	25 μl
Primer 1 (10 μM)	1 μl
Primer 2 (10 μM)	1 μl
模板	n μl
ddH <sub>2</sub> O	(23-n) μl
<b>Total</b>	<b>50 μl*</b>

\* 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，低速离心数秒使溶液沉降到管底。
4. PCR 反应循环设置举例

94℃ 3 min  
 94℃ 30 sec }  
 ※55℃ 30 sec } 35 Cycles  
 § 72℃ 1 min }  
 72℃ 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℃ 3 min  
 94℃ 20 sec }  
 60℃ 1 min } 35 Cycles  
 72℃ 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