

产品概述

本产品包含Taq DNA Polymerase、dNTP以及优化的缓冲体系，只需加入引物和模板即可进行扩增，减少了移液操作，提高了检测通量和结果的重现性。扩增体系中加入的保护剂使得2 × Master Mix经过反复冻融后仍可保持稳定的活性。本品提供含有电泳缓冲液和染料的版本，可在反应结束后直接进行电泳，使用方便。PCR产物的3'端带A，可直接克隆至T载体，并适用于ClonExpress和拓扑克隆试剂盒（Vazyme #C112/C113/C115/C601）。本产品经过特殊优化，PCR产物适合于聚丙烯酰胺凝胶电泳及琼脂糖凝胶电泳。

产品组分

| 组 分 | P113-01 | P113-02 | P113-03 |
|-----------------------------|----------|-----------|-----------|
| 2 × Taq Master Mix for PAGE | 5 × 1 ml | 15 × 1 ml | 50 × 1 ml |

保存条件

-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输。

适用范围

本产品广泛适用于动物、植物以及微生物等DNA的扩增反应。

质量控制

核酸外切酶残留检测：20 μl本品和0.6 μg λ-*Hind* III在37°C下孵育16 h，DNA的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测：20 μl本品和0.6 μg Supercoiled pBR322 DNA在37°C下孵育4 h，DNA的电泳谱带不发生变化。

功能检测1：50 μl体系中，以100 ng人基因组DNA为模板扩增α-1-antitrypsin gene。30个循环后取1/10 PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，EB染色，可见有单一的360 bp条带。

功能检测2：50 μl体系中，以水稻基因组DNA为模板扩增SSR标记RM8071。30个循环后取1/10 PCR产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，银染，可见特异性144 bp的条带。

注意事项

引物设计

1. 引物3'端最后一个碱基最好为G或者C；
2. 引物3'端最后8个碱基应避免出现连续错配；
3. 引物3'端应避免出现发夹结构；
4. 正向引物和反向引物的T_m值相差不超过1°C为佳，T_m值调整至55 ~ 65°C为佳（引物T_m值推荐使用Primer Premier 5进行计算）；
5. 引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物T_m值计算；
6. 引物的GC含量控制在40% - 60%之间；
7. 引物A、G、C、T整体分布要尽量均匀，避免使用GC或者AT含量高的区域。
8. 引物内部或者两条引物之间避免有5个碱基以上的互补序列，两条引物的3'端避免有3个碱基以上的互补序列；
9. 引物设计完毕请使用NCBI BLAST功能检索引物特异性，以避免非特异性扩增产生。

实验流程

反应体系

| | |
|-----------------------------|----------|
| ddH ₂ O | To 50 µl |
| 2 × Taq Master Mix for PAGE | 25 µl |
| Primer1 (10 µM) | 2 µl |
| Primer2 (10 µM) | 2 µl |
| Template DNA* | x µl |

* 不同模板最佳反应浓度不同，下表为50 µl反应体系推荐模板用量：

| | |
|------------|-----------------------------|
| 动植物基因组DNA | 0.1 - 1 µg |
| 大肠杆菌基因组DNA | 10 - 100 ng |
| cDNA | 1 - 5 µl (不超过PCR反应总体积的1/10) |
| 质粒DNA | 0.1 - 10 ng |
| λDNA | 0.5 - 10 ng |

反应程序

| | | |
|-------------------|--------------------------|------------------|
| 95°C | 3 min (预变性) ^a | } 30 - 35 cycles |
| 95°C | 15 sec | |
| 60°C ^b | 15 sec | |
| 72°C | 60 sec/kb | |
| 72°C | 5 min (彻底延伸) | |

a. 该预变性条件适合绝大多数扩增反应，可根据模板结构复杂程度调整。如模板结构复杂，可将预变性时间延长至5 - 10 min以提高预变性效果。

b. 退火温度需要根据引物的T_m值进行调整，一般设置成低于引物T_m值3 ~ 5°C即可；对于复杂模板，需要调节退火温度和延长延伸时间来实现高效扩增。

常见问题与解决方案

| | 无产物或产物量少 | 有杂带或弥散条带 |
|------|--|--------------------------|
| 引物 | 优化引物设计 | 优化引物设计 |
| 退火温度 | 设置退火温度梯度，找到合适的退火温度 | 尝试提高退火温度，可间隔2°C设置温度至65°C |
| 引物浓度 | 适当提高引物浓度 | 降低引物浓度至终浓度为0.2 µM |
| 延伸时间 | 适当增加延伸时间 | 有大于目标条带的杂带时可减少延伸时间 |
| 循环数 | 增加循环数至35 - 40个循环 | 减少循环数至25 - 30个循环 |
| 模板纯度 | 使用高纯度模板 | 使用高纯度模板 |
| 模板用量 | 粗提样品可能需要减少用量；其他样品 使用量参照反应体系推荐量并适量增加 | 使用量参照反应体系推荐量调整 |

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。