

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:90805-10  
CAT#:90805-100  
低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

# 即用型 PCR 试剂盒 3.0

## Instant PCR Kit 3.0

使用手册 V1.6

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com); 电话: 010-62200278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>本产品是在本公司即用型 PCR 试剂盒 2.0 的基础上改良而来, 内含 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、反应缓冲液、PCR 增强剂、上样染料 (对 A 型) 等所有 PCR 所需要的成分, 具有广泛的用途。 本产品具有下列特点: ,</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 方便, 用户只需准备模板和引物即可以进行 PCR 实验。</li> <li>2. 产品为 2× 预配液, 操作步骤已经最大限度地简化, 能减少污染, 降低实验误差。</li> <li>3. 扩增效率和灵敏度更高。</li> <li>4. 本产品 A 型含电泳染料, PCR 反应液可直接上样电泳, 进一步简化了操作。</li> <li>5. 产物可直接用于 T 载体克隆, 不需要额外的加 A 反应。</li> <li>6. 本产品足够 50 次 40 μL 体系的常规 PCR。</li> <li>7. 本产品只供科研使用。</li> </ol>																								
<p><b>规格及成分</b></p>	<p>注: 本产品 A 型 (90805A) 中直接加入了专用染料, PCR 后可以直接上样电泳。</p> <table border="1" data-bbox="429 831 1436 1070"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装 -10 规格</th> <th>塑料袋包装 -100 规格</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PCR MagicMix 3.0, 含染料</td> <td>90805a</td> <td>1 mL × 10 (蓝盖)</td> <td>5 mL × 20 (塑料瓶)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>90805sc</td> <td>1 份</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table> <p>本产品 B 型 (90805B) 中没有加入专用染料, 客户需要加上样液后才可上样电泳。</p> <table border="1" data-bbox="429 1133 1436 1368"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装 -10 规格</th> <th>塑料袋包装 -100 规格</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PCR MagicMix 3.0, 不含染料</td> <td>90805b</td> <td>1 mL × 10 (本色盖)</td> <td>5 mL × 20 (塑料瓶)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>90805sc</td> <td>1 份</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>	成份	编号	十孔盒包装 -10 规格	塑料袋包装 -100 规格	PCR MagicMix 3.0, 含染料	90805a	1 mL × 10 (蓝盖)	5 mL × 20 (塑料瓶)	使用手册	90805sc	1 份	1 份	成份	编号	十孔盒包装 -10 规格	塑料袋包装 -100 规格	PCR MagicMix 3.0, 不含染料	90805b	1 mL × 10 (本色盖)	5 mL × 20 (塑料瓶)	使用手册	90805sc	1 份	1 份
成份	编号	十孔盒包装 -10 规格	塑料袋包装 -100 规格																						
PCR MagicMix 3.0, 含染料	90805a	1 mL × 10 (蓝盖)	5 mL × 20 (塑料瓶)																						
使用手册	90805sc	1 份	1 份																						
成份	编号	十孔盒包装 -10 规格	塑料袋包装 -100 规格																						
PCR MagicMix 3.0, 不含染料	90805b	1 mL × 10 (本色盖)	5 mL × 20 (塑料瓶)																						
使用手册	90805sc	1 份	1 份																						
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输, -20℃ 保存, 有效期一年。</p>																								
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>DNA 模板、引物、超纯水。</p>																								
<p><b>使用方法</b></p>	<p>以 30 μL 的标准 PCR 反应体系为例: 在一干净的 PCR 管中, 加入下列成分:</p> <table border="1" data-bbox="571 1603 1404 2114"> <tbody> <tr> <td>PCR MagicMix 3.0</td> <td>15 μL</td> </tr> <tr> <td>DNA 模板(自备)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>哺乳动物基因组 DNA</td> <td>0.5-1 ug</td> </tr> <tr> <td>酵母基因组 DNA</td> <td>5-500 ng</td> </tr> <tr> <td>细菌基因组 DNA</td> <td>0.5-50 ng</td> </tr> <tr> <td>质粒 DNA</td> <td>5-500 pg</td> </tr> <tr> <td>PCR 回收片段</td> <td>1-100 pg</td> </tr> <tr> <td>PCR 引物(自备)</td> <td>10 pmol each</td> </tr> </tbody> </table>	PCR MagicMix 3.0	15 μL	DNA 模板(自备)		哺乳动物基因组 DNA	0.5-1 ug	酵母基因组 DNA	5-500 ng	细菌基因组 DNA	0.5-50 ng	质粒 DNA	5-500 pg	PCR 回收片段	1-100 pg	PCR 引物(自备)	10 pmol each								
PCR MagicMix 3.0	15 μL																								
DNA 模板(自备)																									
哺乳动物基因组 DNA	0.5-1 ug																								
酵母基因组 DNA	5-500 ng																								
细菌基因组 DNA	0.5-50 ng																								
质粒 DNA	5-500 pg																								
PCR 回收片段	1-100 pg																								
PCR 引物(自备)	10 pmol each																								

		补水到	30 $\mu$ L	
<b>相关资料</b>	<p style="text-align: center;"><b>PCR 反应的影响因素</b></p> <p><b>变性温度与时间：</b>模板变性温度是决定 PCR 反应中双链 DNA 解链的温度，达不到变性温度就不会产生单链 DNA 模板，PCR 也就不会启动。变性温度低则变性不完全，DNA 双链会很快复性，因而减少产量。变性温度太高，又会影响酶的活性。一般情况下可设为 94℃ 20~30 秒，高温时间应尽量缩短，以保持耐热 DNA 聚合酶的活力，最高变性温度不宜超过 95℃。</p> <p><b>退火温度与时间：</b>退火温度决定 PCR 特异性与产量。温度高特异性强，但过高则引物不能与模板牢固结合，DNA 扩增效率下降；温度低产量高，但过低可造成引物与模板错配，非特异性产物增加。合适的退火温度一般在 45~68℃之间。设置特定反应的最适退火温度，可根据引物的 (G+C) %含量进行推测，一般实验中退火温度比扩增引物的熔解温度 <math>T_m</math> 低 5℃，退火时间一般为 30~60 秒，足以使引物与模板之间完全结合，长时间退火没有必要。</p> <p><b>延伸温度与时间：</b>PCR 反应的延伸温度一般选择在 70~75℃之间，延伸时间根据所用聚合酶扩增速度和扩增片段大小设定，如同样扩增 2 Kb 片段，若使用 Taq 酶只需 1 分钟，使用 Pfu 酶则应设定 2 分钟以上。延伸时间过长会导致非特异性扩增带的出现，时间太短则可能得不到扩增产物或得到一些短的非特异性片段。</p> <p><b>循环次数：</b>可根据模板 DNA 的量、扩增片段的大小和扩增产物的下步应用等因素，设定 20-40 个循环。循环次数太少，扩增量不足，如果循环次数太多，错配几率会增加，非特异性背景严重。所以，在保证产物得率的前提下，应尽量减少循环次数。</p> <p><b>酶量：</b>50 <math>\mu</math>L 反应体系可用 0.5-5 U 酶，酶量的选择与模板 DNA 的量，扩增片段大小等有关，酶量过多易发生非特异性反应，而且可能增加突变的机率，尤其在進行高保真扩增时，应尽量减少酶量，但酶量过少时反应性能下降。</p>			

放入 PCR 仪中进行 PCR，结束后取 5-10  $\mu$ L 直接上样电泳（对 A 型产品，如果是 B 型产品，则需要额外再加 DNA 上样液后才能电泳），红色染料电泳速度相当于 50 bp DNA 片段。

**注意：**

1. 如果反应体系不是 30  $\mu$ L，各成分需要等按比例增加或减少。
2. 如果 DNA 模板中有 PCR 不明抑制物（植物、土壤和血液等 DNA 样品常含此类抑制物），可以在 PCR 体系中加入 1/10 的 PCR 抑制物清除剂（CAT#: 60804，30 $\mu$ L 体系中加 3 $\mu$ L），可能会对 PCR 有帮助。

	<p><b>模板:</b> 模板可以是单链 DNA, 也可以是双链 DNA, 质粒 DNA 的扩增效率略低于线状 DNA。模板加量一般不需太多, 不超过 1 <math>\mu\text{g}</math> 为宜, 因为加量过多可能导致非特异性扩增增加, 但是要考虑模板中靶序列的含量。例如, 使用基因组为模板扩增单拷贝或低拷贝靶序列, 就需要适当加大模板用量。</p> <p><b>引物:</b> 引物与模板配对的长度应至少为 17 个核苷酸, 最高不宜超过 30 个核苷酸, 最佳长度为 20~24 个核苷酸, 如需插入酶切位点, 应在酶切位点 5' 端多加几个碱基, 有利于酶切。引物的 (G+C) % 含量组成应均匀, 尽量避免含有相同的碱基多聚体。两个引物中 (G+C) % 含量应尽量相似。引物内部应避免形成明显的次级结构, 如发夹结构。两个引物之间不应发生互补, 特别是在引物 3' 端。如果可能, 引物 3' 端最好富有 GC, 这样退火后有利于引物 3' 端的延伸。人工合成的引物最好经过色谱层析纯化或 PAGE 纯化, 以除去未能合成至全长的短链等杂质。引物的终浓度一般为 0.1-2 <math>\mu\text{M}</math> 左右, 浓度太高会导致非特异性扩增, 太低则扩增产物太少。</p>
<b>关联产品</b>	PCR Inhibitor Erasol (CAT#:60804)。