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；电话：400-6765278；电邮：order@tiandz.com

产品及特点

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、$MgCl_2$、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：，

1. 方便，用户只需准备模板和引物即可以进行 PCR 实验。
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。
3. 扩增效率和灵敏度更高。
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。
5. 产物可直接用于 T 载体克隆，不需要额外的加 A 反应。
6. 本产品足够 50 次 40 μL 体系的常规 PCR。
7. 本产品只供科研使用。

规格及成分

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。

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

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。

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

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

DNA 模板、引物、超纯水。

使用方法

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：

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 μL

放入 PCR 仪中进行 PCR，结束后取 5-10 μL 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 μL，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#：60804，30μL 体系中加 3μL），可能会对 PCR 有帮助。

相关资料

PCR 反应的影响因素

变性温度与时间：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℃。

退火温度与时间：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 Tm 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。

延伸温度与时间：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。

循环次数：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。

酶量：50 μL 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，尤其在进行高保真扩增时，应尽量减少酶量，但酶量过少时反应性能下降。

	模板：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 μg 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。 **引物**：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 μM 左右，浓度太高会导致非特异性扩增，太低则扩增产物太少。
关联产品	PCR Inhibitor Erasol (CAT#:60804)。