

天
净
沙
系
列

CAT#:190201-5
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

2 × PCR MagicMix, PAGE 专用
PCR MagicMix for PAGE

使用手册 V1.0

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

<p>产品及特点</p>	<p>常规的 2×PCR Mix 由于含有各种添加剂（包括蛋白质），这些添加剂在扩增产物的 PAGE 电泳时不但会扭曲 DNA 条带，同时还能在 PAGE 银染时呈现很强的背景染色，干扰 DNA 银染条带的观察，为此本公司开发了此款 PAGE 电泳专用 PCR Mix，它内含 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 增强剂等所有 PCR 所需要的、但又不干扰 PAGE 电泳和银染的成分，用户只需加入 PCR 模板和引物即可进行 PCR 反应，它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 不含会影响后续 PAGE 电泳和银染的成分。 2. 以 2×预配液形式提供，用户只需加入 PCR 模板和引物既可以进行 PCR 实验。 3. 快捷，操作步骤已经最大限度地简化，能减少污染，降低实验误差。 4. 本产品足够 50 次 40uL 体系的 PCR 反应。 5. 本产品仅供科研使用。 																					
<p>规格及成分</p>		<p>成份</p>	<p>编号</p>	<p>十孔盒包装</p>																		
		<p>2×PCR MagicMix, PAGE 专用</p>	<p>190201</p>	<p>1 mL×5 (绿盖)</p>																		
		<p>使用手册</p>	<p>190201sc</p>	<p>1 份</p>																		
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20℃保存，有效期一年。</p>																					
<p>自备试剂</p>	<p>PCR 模板、引物、超纯水、DNA-PAGE 电泳试剂。</p>																					
<p>使用方法</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 以 40 uL 的标准 PCR 反应体系为例：在一干净的 PCR 管中，加入下列成分： <table border="1" data-bbox="571 1265 1406 1839"> <tr> <td>PCR MagicMix, PAGE 专用</td> <td>20 uL</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> <tr> <td>补自备水到</td> <td>40 uL</td> </tr> </table> 2. 放入 PCR 仪中进行 PCR，结束后取 5-10 uL 扩增产物跟 PAGE 上样液混合后即可上样并进行 PAGE 电泳。 <p>注意：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 如果反应体系不是 40 uL，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 				PCR MagicMix, PAGE 专用	20 uL	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	补自备水到	40 uL
PCR MagicMix, PAGE 专用	20 uL																					
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																					
补自备水到	40 uL																					

抑制物),可以在 PCR 体系中加入 1/10 的 PCR 抑制物清除剂 (CAT#: 60804, 30uL 体系中加 3uL),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 T_m 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 μ 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,尤其在进行了高保真扩增时,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 μ g 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

	<p>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。</p>
关联产品	DNA 尿素-PAGE 电泳套装 (90317)、超快核酸银染试剂盒 (81104)。