

天
净
沙
系
列

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: 010-62200278; 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	百孔盒包装 -100规格	塑料袋包装 -100 规格
	PCR MagicMix 3.0,含染料	90805a	1 mL×100 (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	百孔盒包装 -100 规格	塑料袋包装 -100 规格
	PCR MagicMix 3.0,不含染料	90805b	1 mL×100 (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	

	<table><tr><td>补水到</td><td>30 μL</td></tr></table> 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。	补水到	30 μ L
补水到	30 μ L		
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 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)。