



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

2X PCR Master Mix

产品编号	产品名称	包装
D7228	2X PCR Master Mix	400 次

产品简介:

- 2X PCR Master Mix中含有2X Taq DNA Polymerase, 2X PCR Buffer, 2X dNTP, 只需加入适量引物、模板和水即可进行PCR扩增。大大简化了PCR操作, 使操作更加快捷, 也减少了PCR操作过程中可能导致的污染, 使PCR的重复性更好。
- 利用2X PCR Master Mix可以进行各种常规的PCR扩增, 特别适合用于定性和半定量的PCR扩增, 以及2kb以下DNA片段的T载体克隆。
- 2X PCR Master Mix可以扩增出长达8kb的片段, 但通常更适合用于扩增2kb以下的DNA片段。
- 本产品稳定性高, 经测试, 反复冻融15次后对PCR的扩增效果无显著影响。
- 本试剂盒用于50微升的PCR反应体系, 足够用于160个反应; 用于20微升的PCR反应体系, 足够用于400个反应。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7228	2X PCR Master Mix	1ml×4
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 至少一年有效。

注意事项:

- 由于PCR反应非常灵敏可以扩增目的基因序列超过1000万倍, 在使用Taq酶时请注意避免微量待扩增DNA的污染, 并尽量考虑设置不加模板的空白对照以确认是否有待扩增DNA的污染。
- Taq DNA polymerase在PCR过程中每循环的出错几率约为 2.2×10^{-5} , 对于大于1kb的DNA片段的克隆推荐使用出错几率更低的DNA聚合酶, 例如Pfu DNA polymerase、BeyoTaq DNA polymerase等。对于普通的PCR或RT-PCR定性检测或定量检测, Taq DNA polymerase是最佳选择。
- 尽管本产品经过15次反复冻融后仍具有和冻融前几乎相同的PCR扩增效果, 但仍宜适当避免反复冻融本产品, 多次反复冻融可能使产品性能下降。
- 使用本产品前, 一定要完全融化, 并上下颠倒轻轻混匀后才能使用, 尽量避免起泡。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. PCR反应体系的设置:

- 融解并混匀PCR反应所需的各种溶液。将2X PCR Master Mix置于冰浴上或冰盒内。
- 参考下表在冰浴上设置PCR反应体系:

试剂	最终浓度	体积	体积
双蒸水或Milli-Q水	-	(21-x)μl	(8.4-y)μl
模板DNA	10pg-1μg*	xμl	yμl
引物混合物(10μM each)	0.8μM	4μl	1.6μl
2X PCR Master Mix	1X	25μl	10μl
总体积	-	50μl	20μl

*对于不同类型的模板在50μl反应体积中推荐用量如下:

哺乳动物基因组DNA: 0.1-1μg; 大肠杆菌基因组DNA: 10-100ng; 质粒DNA: 0.1-10ng。

过多的模板DNA容易导致非特异性的PCR产物。

- 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀, 室温离心数秒, 使液体积聚于管底。
 - 如果所使用的PCR仪有热盖则省略本步骤。如果PCR仪没有热盖, 则在管内滴入一滴矿物油(mineral oil, ST275)。
 - 把设置好的PCR反应体系置于PCR仪上, 开始PCR反应。
- #### 2. PCR反应参数的设置可以参考如下示例:

STEP1(起始变性): 94°C 3min
 STEP2(变性): 94°C 30sec
 STEP3(退火): 55°C 30sec
 STEP4(延伸): 72°C 1min
 STEP5(循环): Go To STEP2 for 30 cycles
 STEP6(最终延伸): 72°C 10min
 STEP7(临时保存): 4°C forever

注意:

- PCR反应的设置需根据模板、引物、PCR产物的长度和GC含量等条件的不同设定不同的PCR反应条件包括温度、时间和循环数等。
- STEP4(延伸)的时间设置需根据PCR产物的长度进行设置，通常每kb产物的延伸时间为1分钟。例如PCR产物的长度为1kb，则延伸时间可以设置为1分钟，PCR产物的长度为2kb，则延伸时间可以设置为2分钟，以此类推。
- 对于初次进行的PCR，为尽量确保可以扩增出预期的PCR产物，可以把循环数设置为35。对于需进行半定量或定量的PCR反应循环数一定要进行适当优化，使PCR反应没有达到平台期。

常见问题:

1. PCR产物非常少或没有特异性条带。

- 引物设计不佳是PCR过程中最常见的问题。请选择适当的引物设计软件进行引物设计，注意引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在加入酶切位点等的引物中，一定要注意加入酶切位点等后整条引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在原有引物效果不佳的情况并且阳性对照引物可以正常工作的情况下，可以考虑更换引物。
- 待扩增片段GC含量偏高。GC含量较高的情况下PCR会变得相对比较困难，此时可以使用适合扩增高GC含量DNA片段的GC-rich buffer，并相应地根据GC-rich buffer的要求或说明调整PCR反应参数的设置。
- 长片段扩增。尽管Taq DNA polymerase可以扩增最长达8kb的DNA片段，但大多数时候比较适合扩增2-3kb以下的片段，更长片段的扩增推荐使用其它更适合长片段扩增的DNA聚合酶。
- PCR反应设置时在室温进行容易导致非特异性条件。推荐在冰浴上设置PCR反应。
- 由于引物存在一定的二级结构或存在一定的引物二聚体，或引物偏短，导致退火效果不佳。此时可以采用Touch down等方法进行退火，通常采用从65°C逐步缓慢降温到55°C或50°C的方法，使退火更加充分。
- 退火温度不佳，需要优化。如果有温度梯度PCR仪，则可以设置退火的温度梯度，摸索退火的最佳温度。如果没有温度梯度PCR仪，则可以通过多次PCR反应摸索最佳的退火温度。
- 延伸时间不足。可按照每1kb片段延伸1分钟进行设置，对于较难扩增的片段可以设置为每1kb片段延伸1.5-2分钟。
- 待扩增片段GC含量较高或长度较长，变性不够充分。可以调节起始变性条件至95°C 1min甚至95°C 2-4min。
- 在不同PCR仪上进行PCR反应，避免有时PCR仪出现问题。
- 循环数不足，适当延长PCR的循环数。通常循环数最高不必超过40，常用的循环数范围为25-35。
- 模板含量太低，适当加大模板量，或采用巢式PCR(nested PCR)或二次PCR。巢式PCR即为在原先设计的PCR引物内侧再设计一对PCR引物，然后对第一次PCR产物进行稀释后再进行一次PCR扩增，这样一方面可以起到扩增作用，同时也可以从第一次PCR产物中扩增出特异性条带。二次PCR则为比较简单地用原有引物对第一次PCR产物进行稀释后再进行一次PCR扩增，可以起到扩增作用，但不能去除非特异性条带。
- 模板中含有抑制PCR反应的物质，可以用适当的DNA纯化方法例如柱纯化等纯化模板DNA。
- 当产生较多非特异性条带时，可以适当提高退火温度。
- 注意设置适当的阳性对照和阴性对照通常会有很大帮助。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D7205	Taq DNA Polymerase	200U
D7207	Taq DNA Polymerase	1000U
D7209	Taq DNA Polymerase	5000U
D7216	Pfu DNA Polymerase	200U
D7217	Pfu DNA Polymerase	1000U
D7218	BeyoTaq DNA Polymerase	200U
D7219	BeyoTaq DNA Polymerase	1000U
D7220	BeyoFusion™ DNA Polymerase	200U
D7221	BeyoFusion™ DNA Polymerase	1000U
D7222	BeyoFusion™ Plus DNA Polymerase	200U
D7222B	BeyoFusion™ Plus DNA Polymerase	1000U
D7228	2X PCR Master Mix	400次

D7232	PCR Kit with Taq	400次
D7233	PCR Kit with Taq	2000次
D7237	PCR Kit with BeyoTaq	400次
D7251	Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X)	400次
D7255	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	400次
D7259	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	400次

使用本产品的文献：

1. Yang X, Zhou W, Liu S. SPAG9 controls the cell motility, invasion and angiogenesis of human osteosarcoma cells. *Exp Ther Med.* 2016 Feb;11(2):637-644.
2. Li J, Zhang G, Meng Z, Wang L, Liu H, Liu Q, Buren B. Neuroprotective effect of acute melatonin treatment on hippocampal neurons against irradiation by inhibition of caspase-3. *Exp Ther Med.* 2016 Jun;11(6):2385-2390.
3. Tian P, Liu D, Sun L, Sun H. Cullin7 promotes epithelial-mesenchymal transition of esophageal carcinoma via the ERK-SNAI2 signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2018 Apr;17(4):5362-5367
4. Fucun Song, Yang Yang, Jixiang Liu. MicroRNA-548ac induces apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma cells by targeting transmembrane protein 158. *Oncol Lett.* 2020 Oct;20(4):69.;doi: 10.3892/ol.2020.11930.

Version 2021.09.01