

Version 1

Cat No. AG11113

2X Pro Taq 预混液 (含染料) II

2X Pro Taq Master Mix (dye plus) II

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

Pro Taq DNA Polymerase 是在本公司性能优越的 *Accurate Taq* enzyme 中添加了高保真酶，使其具有 3' →5' Exonuclease 活性 (Proof reading 活性)，非常适合 10 kb 以上 DNA 片段的扩增，并且具有较好的保真性能。本制品为 2 倍浓度的 PCR 反应预混液，包含 *Pro Taq* DNA Polymerase、dNTPs 以及优化的 Buffer 体系，进行 PCR 反应时，只需向预混液中加入模板、引物和水即可进行扩增。同时本制品中还加入了电泳测试时所需的色素试剂，制品溶液呈现紫红色，PCR 反应完毕后可以直接进行琼脂糖凝胶电泳。这种预混液方案操作简便，可最大限度的减少人为误差，减少多步操作可能带来的污染，在较短时间内即可获得检测结果。PCR 产物的 3' 端带有一个 A 碱基，可直接克隆于 T 载体。

➤ 产品组成

组分名称	AG11113 (120 rxns / 50 μl)
2X <i>Pro Taq</i> Master Mix (dye plus) II	500 μl X 6 pc
RNase free water	1 ml X 3 pc

➤ 保存

保存温度：-20℃

运输温度：干冰运输或者-20℃冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本制品为 2X 的预混液，只需向预混液中加入模板，引物和水即可进行扩增，操作简便，可最大限度的减少人为误差，减少多步操作可能带来的污染，在较短时间内即可获得检测结果。
2. 2X *Pro Taq* Master Mix (dye plus) II 扩增性能较好，以 λ DNA 为模板可扩增 ~30 kb 的 DNA 片段，以 Human 基因组 DNA 为模板可扩增 ~12 kb 的 DNA 片段。
3. 本制品中含有紫红色染料，PCR 结束后可直接进行琼脂糖凝胶电泳，无需添加电泳上样缓冲液，电泳时有一条浅紫红色指示带。

➤ 实验原理

PCR 扩增原理

PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖

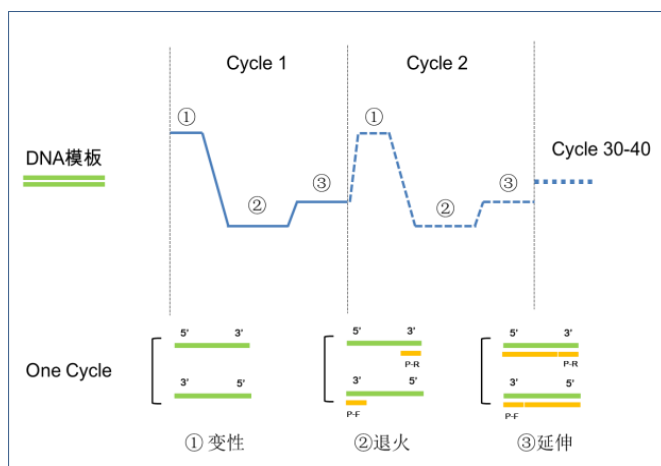
于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

扩增详情如下，一般将步骤①②③称为一个循环，每次进行 DNA 扩增时以此循环 30-40 次。进行 PCR 扩增时，可根据引物的不同调整退火温度，进而获得最优 PCR 扩增反应条件。

步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

步骤②：引物与单链 DNA 进行退火；

步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下进行延伸，与单链 DNA 形成互补链。



➤ 实验前准备

1) 试剂 & 耗材：

Primer、DNA 模板、PCR 管、枪头、冰浴或冰盒。

2) 仪器：

PCR 仪、移液器、旋涡振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪。

➤ 操作方法

1) 配制 PCR 反应液

首先按照下表所示配制 PCR 反应液^{*1}。

组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
2X <i>Pro Taq</i> Master Mix (dye plus) II ^{*2}	1X	25 μl
Template	≤500 ng ^{*3}	-
Primer F (10 μ M)	0.2 μ M ^{*4}	1 μl
Primer R (10 μ M)	0.2 μ M ^{*4}	1 μl
RNase free water	-	Up to 50 μl

*1：为了提高反应特异性，减少 PCR 过程中的非特异性扩增，可采用 Cool Start 法：在冰上融化试剂及配制反应液。

- *2: 2X *Pro Taq* Master Mix (dye plus) II 使用前请先离心, 将所有的溶液收集至离心管底部, 然后再进行使用, 减少损失; 使用时应轻柔混匀 (避免起泡), 缓慢吸取。
- *3: 通常情况下, 建议模板添加量 ≤ 500 ng; 可根据实际需要调整模板用量。
- *4: 引物通常使用终浓度为 $0.2 \mu\text{M}$, 可根据实验结果在 $0.2 - 1.0 \mu\text{M}$ 范围内调整。

2) 反应条件 (以三步法 PCR 扩增 1 kb DNA 片段为例^{*8})

将加好样的 Tube 放置于 PCR 仪中, 然后按照下表条件进行 PCR 反应:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	30 sec	1
变性 ^{*5}	98°C	10 sec	} 30-35
退火 ^{*6}	55°C	30 sec	
延伸 ^{*7}	72°C	1 min	
最终延伸	72°C	2 min	1

*5: 变性条件的设定可根据设备进行调整, 一般 98°C 5~10 sec 或 94°C 30 sec~1 min。

*6: 退火温度主要取决于上下游引物的 T_m 值, 通常可按照 $T_m \pm 5^\circ\text{C}$ 设定。

*7: 延伸温度一般设定为 72°C; 延伸速度推荐 1 min / kb, 可在 30 sec / kb ~1 min / kb 范围内调整。

*8: 当引物 T_m 值较高或三步法 PCR 扩增结果不好, 可尝试两步法 PCR 扩增 (两步法 PCR 反应程序可参考附录)。

3) 结果检测

反应结束后, 取适量反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

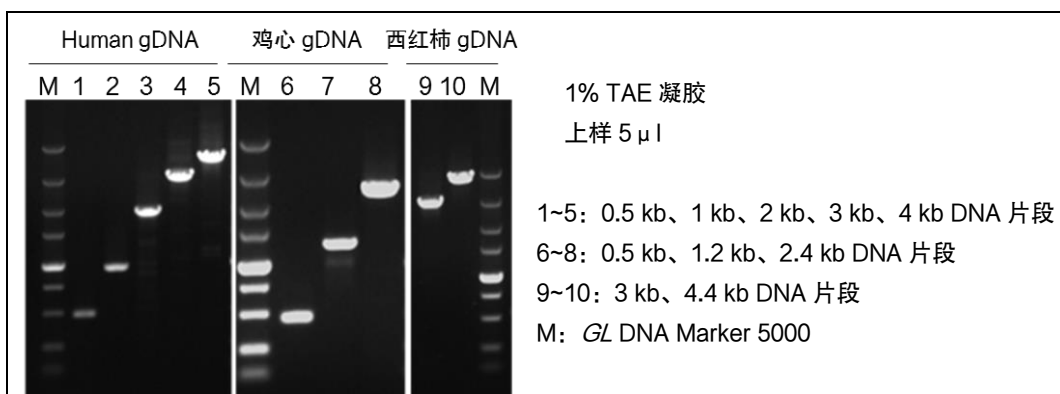
➤ 实验例

- 以 Human、鸡心、西红柿等物种的 gDNA 为模板, 采用本试剂盒扩增不同长度的 DNA 片段, 都能获得很好地扩增效果。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	30 sec	1
98°C	10 sec	} 30
55°C	30 sec	
72°C	1 min / kb	
72°C	2 min	1

电泳结果如下图所示:



2. 以 Human 的 gDNA 和 λ DNA 为模板, 采用本试剂盒扩增不同长度的 DNA 片段, 都能获得很好地扩增效果。

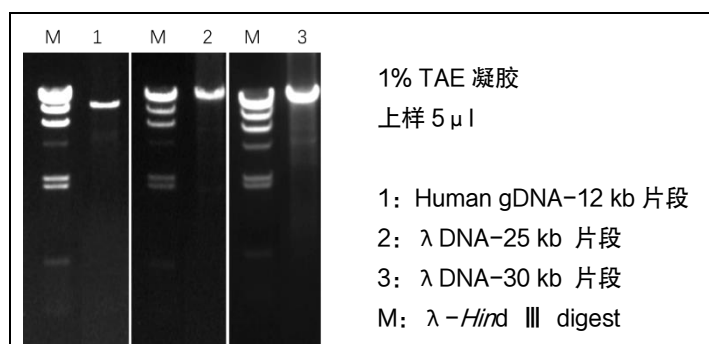
反应程序: (25 kb、30 kb)

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	5 sec	} 30
68°C	15 min	
72°C	2 min	1

反应程序: (12 kb)

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	20 sec	} 30
68°C	10 min	
72°C	2 min	1

电泳结果如下图所示:

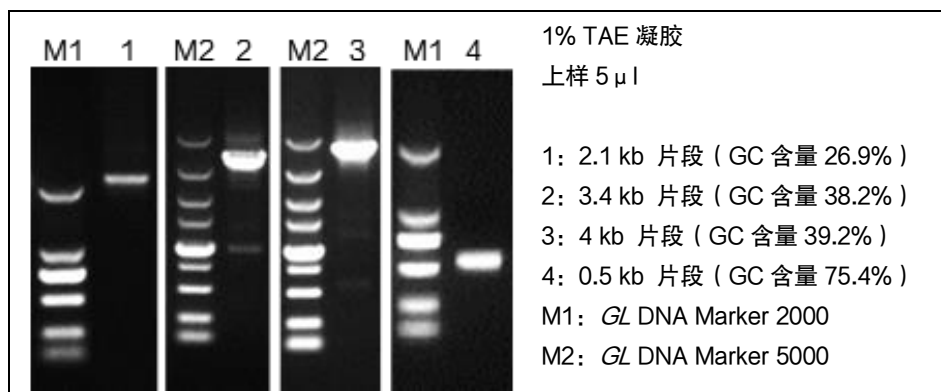


3. 以 Human 的 gDNA 为模板, 采用本试剂盒扩增高 AT 含量与高 GC 含量的 DNA 片段, 都能获得很好地扩增效果。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	10 sec	} 30
68°C	1 min / kb	
72°C	2 min	1

电泳结果如下图所示:

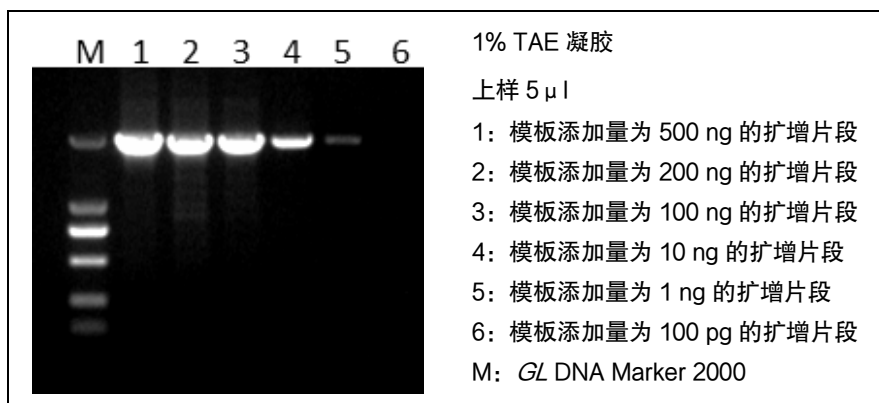


4. 以 Human 的 gDNA 为模板, 添加不同模板量 (500 ng、200 ng、100 ng、10 ng、1 ng、100 pg), 采用本试剂盒扩增 2 kb DNA 片段, 模板量低至 1 ng 时, 能扩增出目的片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	30 sec	1
98°C	10 sec	} 30
55°C	30 sec	
72°C	1 min / kb	} 30
72°C	2 min	

电泳结果如下图所示:



➤ 产品注意事项

1. 合适的模板

- ❖ 模板加入量降低时，扩增效率降低，产物量减少，扩增特异性升高；模板加入量升高时，扩增效率升高，扩增特异性降低；可根据实际情况调整模板加入量。
- ❖ 模板的纯度及完整性严重影响 PCR 反应，采用高质量高纯度的 DNA 模板，可提高 PCR 反应的成功率，降低外源污染。模板不纯、降解或模板中含有抑制 PCR 反应的物质等，都可能会导致 PCR 反应扩增效率较低，PCR 反应产物产量少。建议更换模板，重新实验。

2. 合适的引物

- ❖ 合适的引物浓度为 0.2 ~ 1.0 μ M。
- ❖ 引物浓度低：导致反应效率低。可尝试提高 PCR 扩增引物反应浓度。
- ❖ 引物浓度高：导致反应特异性不好。可适当降低引物浓度。
- ❖ 引物完整性不好：可能会导致无扩增曲线，可通过 PAGE 电泳确认引物的完整性，如引物有降解，建议更换引物。
- ❖ 引物设计的原则：
 - ① 引物一般是 15-30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40 - 60 % 之间。
 - ② 建议正反向引物 Tm 值在 50-70°C，两引物 Tm 值相差不超过 5°C。
 - ③ 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
 - ④ 引物 3' 端避免出现发夹结构。
 - ⑤ 减少引物之间的互补序列，一般不要超过 4 个碱基连续互补序列。

3. 合适的变性温度及时间

- ❖ 一般建议将预变性设置为 94°C 30 sec~1 min；对于复杂模板，如高 GC 或者长片段，可尝试延长预变性时间，但时间过长，可能会影响 DNA 聚合酶活性。
- ❖ 变性时间过长或温度过高，可能导致非特异性扩增、DNA 聚合酶活性降低等问题发生；变性时间过短或温度过低，可能导致扩增效率低，电泳条带弥散。

4. 合适的退火温度及时间

- ❖ 退火温度越高，引物特异性越高，但一定程度上扩增效率会降低。
- ❖ 退火温度过低，可能导致反应特异性不好，并且可能会出现引物二聚体。

5. 扩增循环数

- ❖ 扩增循环数取决于模板的初始拷贝数。如果模板的初始拷贝数少于 10 个，则需要大约 40 个循环。对于初始拷贝数较高的模板，一般推荐 30-35 个循环。

6. 防止污染措施

- ❖ 配制反应液与添加 DNA 模板的区域建议分开。
- ❖ 每次实验可设置不添加模板的阴性对照，以检查是否存在污染。

➤ 附录：两步法 PCR 反应程序

反应条件

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	30 sec	1
变性	98°C	10 sec	} 30-35
延伸	68°C	1 min / kb	
最终延伸	72°C	2 min	1