

Version 2

Code No. AG11409

2X Exp Taq 预混液 Ver.2 (含染料)

2X Exp Taq Master Mix Ver.2 (dye plus)

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

本产品为即用型 *Exp Taq* Enzyme PCR 反应 2 倍浓度的预混液，包含 *Exp 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。同时本产品中加入了电泳时所需的色素试剂(蓝色和黄色色素)，反应液呈现鲜艳的绿色，PCR 结束后可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。

本产品是应用 LA PCR 原理，精心优化得到的 PCR 反应体系，在本公司性能优越的 *Accurate Taq* enzyme 中添加了高保真酶，使其具有部分 3' -5' Exonuclease 活性 (Proof-reading 活性)，非常适合长片段 DNA 的 PCR 扩增，且具有较好的保真性。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	AG11409 (120 rxns / 50 μ l)
2X <i>Exp Taq</i> Master Mix Ver.2 (dye plus)	500 μ l x 6 pcs
RNase free water	1 ml x 3 pcs

➤ 保存及运输

保存温度：-20°C 保存

运输温度：干冰运输或者 -20°C 冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本产品为 2X 的预混液，只需向预混液中加入模板、引物与水即可进行扩增，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. 本产品以 λ DNA 为模板可扩增出 ~40 kb 的 DNA 片段，以 Human 基因组 DNA 为模板可扩增出 ~20 kb 的 DNA 片段。
3. 本产品中含有绿色染料，PCR 反应结束后可直接进行琼脂糖凝胶电泳。1% 的琼脂糖凝胶进行电泳时，电泳时有两条指示带(蓝色和黄色指示带)：蓝色指示带迁移速率与 3 ~ 5 kb 线性 DNA 相似，黄色指示带迁移速率与 50 bp 线性 DNA 相似。

➤ 实验原理

PCR 扩增原理

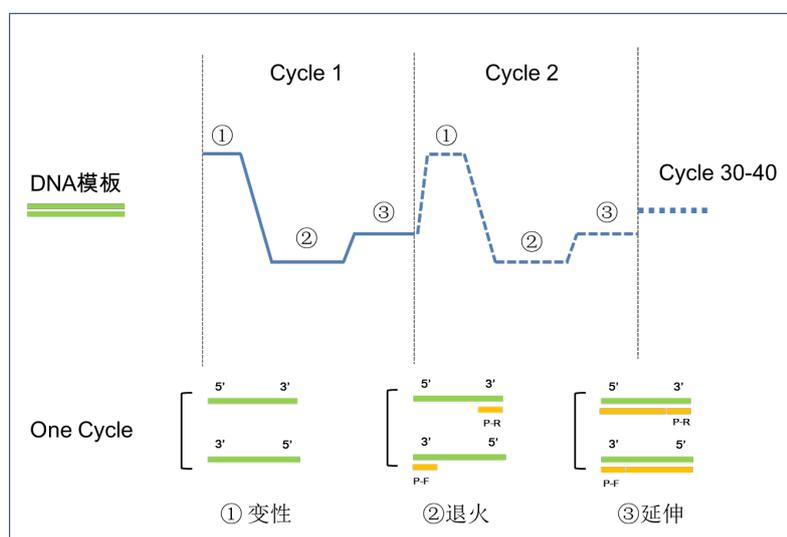
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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。



➤ 使用注意事项

- 1) 2X Exp Taq Master Mix Ver.2 (dye plus) 使用前先离心，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。
- 2) 反应体系建议在冰上配制，以减少配制反应液过程中的非特异性扩增。
- 3) 本产品避免反复冻融，以免降低酶活性。

➤ 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

首先按照下表配制 PCR 反应液，反应体系建议在冰上配制。

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

*1: 模板用量一般 ≤ 500 ng; 同时, 可根据实际需要调整模板用量;

*2: 引物通常使用终浓度为 0.2 μ M; 同时, 可根据实际需要 0.2 ~ 1.0 μ M 范围内调整。

2) 反应条件 (以三步法扩增 1 kb DNA 片段为例⁷)

将加好样的 Tube 管放置于 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	1 min ^{*3}	1
变性	98°C	10 sec ^{*4}	} 25 ~ 35
退火	55°C	30 sec ^{*5}	
延伸	72°C	1 min / kb ^{*6}	
最终延伸	72°C	2 min	1

*3: 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。

*4: 变性条件的设定可根据设备进行调整, 一般 98°C 5 ~ 20 sec 或 94°C 30 sec。

*5: 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。

*6: 延伸温度一般设定为 72°C, 延伸速度 1 min / kb; 同时, 可在 30 sec / kb ~ 1 min / kb 范围内进行调整。

*7: 当引物 T_m 值较高或三步法 PCR 扩增结果不好时, 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。

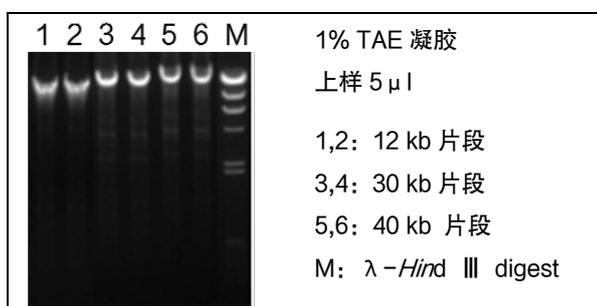
➤ 实验例

- 以 λ DNA 为模板,采用本产品扩增不同长度的 DNA 片段,能很好地扩增出 40 kb 的 DNA 片段。

反应程序如下:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	5 sec	} 30
68°C	15 min	
72°C	10 min	1

电泳结果如下:



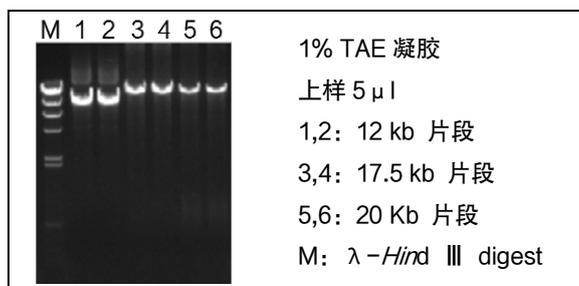
- 以 Human 的 gDNA 为模板,采用本产品扩增不同长度的 DNA 片段,能很好地扩增出 20 kb 的 DNA 片段。

反应程序如下:

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

*: 12 kb 延伸时间 12 min; 17.5 kb 延伸时间 17 min; 20 kb 延伸时间 20 min。

电泳结果如下:



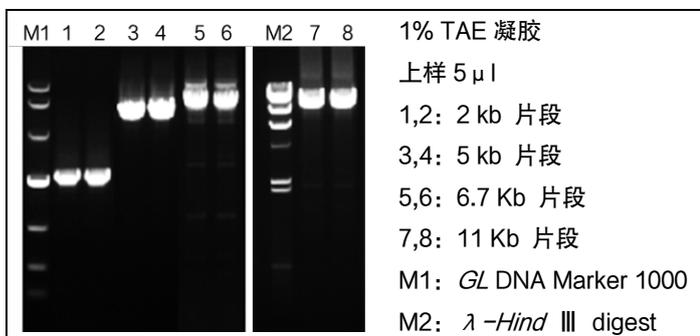
3. 挑取 *E.coli* 单菌落加入至 20 μ l RNase free water 中，混匀后取 1 μ l 菌液为模板，采用本产品扩增不同长度的 DNA 片段，能很好地扩增出 11 kb 的 DNA 片段。

反应程序如下：

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
94°C	30 sec	} 30
56°C	30 sec	
72°C	1 min / kb*	
72°C	2 min	1

*: 2 kb 延伸时间 2 min; 5 kb 延伸时间 5 min; 6.7 kb 延伸时间 7 min; 11 kb 延伸时间 11 min。

电泳结果如下：



➤ 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 反应扩增效率降低，PCR 反应产物产量减少。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。
- ❖ 引物浓度降低：可能会导致反应效率降低。可尝试提高 PCR 扩增引物反应浓度。
- ❖ 引物浓度升高：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，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、T、C、G 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或 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

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。

- ❖ 简单模板 PCR，进行 94°C，30 sec 的预变性。
- ❖ 困难模板的 PCR，如 GC-rich 序列，建议在 94°C 下进行 1~5 min 的预变性。
- ❖ 菌落 PCR，建议在 94°C 下进行 1~5 min 的预变性。
- ❖ 变性温度一般推荐 98°C，5~20 sec 或 94°C，30 sec。

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或出现引物二聚体。可适当提高退火温度。

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 25 ~ 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，避免交叉污染。
- ❖ 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

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	1 min	1
变性	98°C	10 sec	} 25~35
延伸	68°C	1 min / kb	
最终延伸	72°C	2 min	1