



2x Taq Ultra PCR mix (蓝色)

产品货号: T0214

存储条件: -20°C

产品说明

2x Taq Ultra PCR mix 的浓度为 2x, 使用方便快捷, 能减少 PCR 操作过程中的污染, 使用时只需取适量 2x Taq Ultra PCR mix 蓝色, 加入模板和引物, 并加入 ddH₂O 补足体积, 使反应体系浓度为 1x, 即可进行 PCR 反应。PCR 产物 3'端带突出 A 碱基, 纯化后可直接用于 T/A 克隆。

本产品中含有 Taq DNA 聚合酶和一种含有 3'→5'外切活性的蛋白, 能够高效扩增≤7 kb 的 DNA 片段, 扩增产量高, 配合优化后的反应缓冲液, 可实现对不同 GC 含量(30%~70%)的高效扩增。此外相较于普通 Taq PCR Mix (CAT: T0211) 延伸速度提高了 2~4 倍, 可有效缩短反应时间。

本 PCR Mix 中包含两种染料, PCR 产物无需添加 Loading Buffer 可直接点样电泳, 且电泳过程中会出现蓝色和红色两个指示条带。该染料不影响 PCR 扩增效率, 但对于需要对 PCR 产物进行吸光度、荧光等光学分析的实验, 建议在分析前对 PCR 产物进行纯化。

质量控制

核酸内切酶活性检测

将 25 μl 2x Taq ultra PCR Mix 与 200 ng 超螺旋质粒 DNA 配制成 50 μl 反应体系, 在 37°C 下, 共同温育 4h 后, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 少于 10% 的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

非特异性核酸酶活性检测

将 25 μl 2x Taq Ultra PCR Mix 与 15 ng 双链 DNA 片段配制成 50 μl 反应体系, 在 37°C 下温育 16 h, 使用琼脂糖凝胶电泳检测双链 DNA 底物无变化。

使用方法

1. 常规 PCR 反应体系 (冰上操作)

试剂	使用量	终浓度
2x Taq Ultra PCR mix	25 ul	1x
正向引物(10uM) ^b	1~2 ul	0.2~0.4uM
反向引物(10uM) ^b	1~2 ul	0.2~0.4uM
模板 DNA ^c	X ul	
ddH ₂ O	Up to 50 ul	

a. 需融解完全后使用, 防止离子浓度不均匀;

b. 引物推荐终浓度为 0.2~0.4 μM, 效果不佳时可以在 0.1~1 μM 浓度范围内进行调整;

c. 不同模板最佳反应浓度有所不同, 以 50 μl 体系为例: 模板为基因组 DNA 时一般推荐的使用量为 10~200 ng; 当模板为质粒或病毒 DNA 时, 一般推荐的使用量为 10 pg~5 ng。模板量过多时容易造成非特异性扩增。

2. 三步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环
预变性 ^d	95°C	3~5 min	
变性	95°C	30 s	30-35cycles
退火 ^e	55~65°C	30 s	
延伸	72°C	15~30 s/kb	
终延伸	72°C	5 min	

3. 二步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环
预变性 ^d	95°C	3~5 min	
变性	95°C	30 s	30-35cycles
退火和延伸 ^e	60~65°C	30 s/kb	
终延伸	72°C	5 min	

d. 菌落 PCR 时预变性 10 min, 可充分破壁细胞, 大肠杆菌或酵母菌均可高效扩增。

e. 退火温度请根据引物 T_m 值设置。如果需要, 推荐通过建立温度梯度寻找引物与模板结合的最适温度。此外, 退火温度直接决定扩增特异性, 如发现扩增特异性差, 可适当提高退火温度。

f. 目的片段长度 < 3 kb, 延伸时间可缩短至 15 s/kb; 目的片段长度 > 3 kb, 延伸时间建议 30 s/kb。若要达到最佳扩增效果或较高产量, 推荐统一使用 30s/kb 速度延伸。





注意事项

一、引物设计

1. 引物 3' 端最后一个碱基最好为 G 或者 C。
2. 引物 3' 端最后 8 个碱基应避免出现连续错配，同时也避免出现发夹结构。
3. 正向引物和反向引物的 Tm 值相差不超过 1°C 为佳，Tm 值调整至 55~65°C 为佳(引物 Tm 值推荐使用 Primer Premier5 进行计算)。
4. 引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物 Tm 值计算；引物的 GC 含量控制在 40%~60% 之间。
5. 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。
6. 引物内部或者两条引物之间避免有 5 个碱基以上的互补序列，两条引物的 3' 端避免有 3 个碱基以上的互补序列。
7. 引物设计完毕请使用 NCBI BLAST 功能检索引物特异性，以避免产生非特异性扩增。

二、产物电泳与染色

建议使用泡染法进行电泳后染色，胶染法会导致红色指示条带发生弥散，不利于条带指示，对蓝色指示条带无影响。蓝色条带在 1% TAE 缓冲液中迁移速率约等于 1500 bp，红色条带在 1% TAE 缓冲液中迁移速率约等于 100 bp。

