

## 2×Taq plus PCR Master Mix

含染料	PT302-01	PT302-02
2×Taq plus PCR Master Mix	1 ml	1 ml×5
diH <sub>2</sub> O	1 ml	1 ml×5

不含染料	PT303-01	PT303-02
2×Taq plus PCR Master Mix	1 ml	1 ml×5
diH <sub>2</sub> O	1 ml	1 ml×5

### ●储存条件

-20°C长期保存；反复冻融16次不影响使用效果；

如果频繁使用，建议储存于4°C。

上海莱枫生物科技有限公司

www.lifefeng.com

电话：021-64810180 传真：021-54252754

技术支持：13817902990(上海)

### ●产品简介

2×Taq plus PCR Master Mix是一种优化的两倍浓度的PCR预混合液。适用于保真性要求高、模板GC含量高和扩增片段长的PCR，简单模板可以扩增长达15kb，复杂模板可达10 kb。

PCR增强剂和蛋白稳定剂协同提高了PCR效率和灵敏度，非常适合低拷贝模板扩增。

产品使用方便，只需要取0.5倍PCR体系体积的2×Taq plus PCR Master Mix，加入引物和模板，以diH<sub>2</sub>O补足体积，可减少加样误差。产品分为含染料（目录号：PT302）和不含染料（目录号：PT303）两种，含染料的产品反应结束后可以直接电泳。

### ●产品主要成分

0.1 U/μl Taq plus DNA Polymerase
0.4 mM each dNTPs
2×Taq plus Buffer
红色和黄色两种指示染料(目录号：PT302)
PCR增强剂和蛋白稳定剂

### △Taq plus DNA Polymerase

是Taq和pfu DNA Polymerase按照一定比例混合的酶，具有双链DNA特异性的5'→3'外切酶活性和3'→5'外切酶活性。其PCR产物为部分A末端，可直接连接到T/A克隆载体；或者纯化后加A末端再连接，以提高连接效率。

### △2×Taq plus Buffer

2×Taq plus Buffer含KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4mM MgSO<sub>4</sub>, Tris-HCl, pH 8.8(25°C)。

### △指示染料

目录号：PT302含红色和黄色两种电泳指示染料。两者不会抑制PCR，也不会抑制酶切和连接等下游酶反应，不会影响EB显色，其电泳相对迁移距离见表1：

表1：琼脂糖凝胶浓度与染料相对迁移距离

凝胶浓度	红色染料	黄色染料
0.8%	2000bp	~80 bp
1.0%	1500bp	~40 bp
1.5%	1000bp	~20 bp
2.0%	500bp	<10 bp
2.5%	350bp	<10 bp
3.0%	200bp	<10 bp

染料会干扰OD检测。如果PCR产物不做纯化而直接检测OD，请使用目录号：PT303。

### ●质量控制

经检测无外源核酸酶活性，PCR方法检测无宿主DNA残留，能有效扩增人类基因组中的单拷贝基因。

### ●使用方法

#### 1. PCR成分准备

将2×Taq plus PCR Master Mix、模板DNA和引物室温解冻，置于冰上。**Mix解冻后需上下翻转混合均匀。**

#### 2. PCR反应液配制(以50 μl PCR体系为例)

在冰上将以下各成分加入PCR反应管：

模板DNA	*
Primer1 (10 μM)	1 μl
Primer2 (10 μM)	1 μl
2×Taq plus PCR Master Mix	25 μl
diH <sub>2</sub> O	补充至50 μl

\*请参考●PCR体系成分△模板DNA用量。

**注意：尽可能使用合适精度的加样器，并且避免加样体积小于1 μl (可适当比例稀释后加样)。**

#### 3. 手指轻弹PCR反应管充分混匀，简短离心。

#### 4. PCR反应循环设置举例

94°C	3 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
55°C※	30 sec	
72°C	1 min §	

72°C 5 min

4°C soak

※以实际最佳退火温度为准。§以1 kb/min计算。

### ●PCR体系成分

#### △模板DNA的纯度

很多残留的核酸提取试剂会影响PCR反应，包括蛋白酶、蛋白变性剂(比如SDS、胍盐、苯酚)、高浓度盐(KAc、NaAc、辛酸钠等)和高浓度EDTA等。这些杂质可通过乙醇或异丙醇沉淀后用66-70%乙醇洗涤两次去除，大部分商品化的核酸纯化试剂盒可有效去除这些杂质。

磷酸盐能螯合Mg<sup>2+</sup>，DNA提取和纯化过程中很难彻底去除，因此不推荐使用PBS等磷酸盐缓冲液作为模板DNA提取试剂。

来源于样品的难以去除的PCR抑制剂，包括肝素、腐植酸、植物酸性多糖等，应使用合适的提取和纯化方法。

高纯度、高浓度的DNA作为PCR模板是最理想的。高浓度DNA可通过稀释减少干扰PCR的成分。

cDNA作为模板时，应考虑模板中高浓度盐离子(尤其是缓冲体系和游离Mg<sup>2+</sup>)，一般不超过PCR体积的10%。

#### 关于模板DNA溶解或者洗脱使用去离子水或者TE：

去离子水为弱酸性，不利于DNA的洗脱，也不利于DNA的稳定保存。

TE常见的组成成分为：10 mM Tris, pH 8.0(25°C), 0.1 mM EDTA，有利于DNA的长期稳定保存，其中EDTA能螯合Mg<sup>2+</sup>，通常模板用量不超过PCR体积的20%，不用考虑EDTA对PCR的干扰。如果模板用量占PCR体积比例较大，建议将TE稀释10倍后溶解或者洗脱DNA。

#### △模板DNA用量

**为保证反应的效率和特异性，模板DNA终浓度应小于10 ng/μl。**引物与模板DNA(尤其是低拷贝模板)有很多非特异性结合位点，不一定会产生非特异性扩增产物，但在PCR初期会大量消耗引物，因此降低PCR效率。

PCR产物作为模板，包括二次PCR和重叠PCR，不存在引物与模板的非特异性结合大量消耗有效引物的情况，因此PCR效率非常高，需大比例稀释后作为模板，并且需要严格控制循环数。

极微量的样品可以作为PCR模板，但**为了保证反应的灵敏性，25 μl体系使用10<sup>4</sup>拷贝的靶序列作为模板**；可参考表2计算需加入PCR体系的模板量。

表2：1 μg各种来源的DNA对应的摩尔数

1 μg DNA	mol
1 kb线性双链DNA	9.18×10 <sup>11</sup>
3 kb质粒DNA	2.9×10 <sup>10</sup>

Lambda (λ) DNA	1.9×10 <sup>10</sup>
E.coli基因组DNA	2.0×10 <sup>8</sup>
人类基因组DNA	3.0×10 <sup>5</sup>

例如：纯化的人类基因组DNA浓度为1 μg/μl，某基因在人类基因组中拷贝数为10，其单位体积拷贝数为：

$$3.0 \times 10^5 \text{ mol}/\mu\text{g} \times 1 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10 \text{ copy}/\text{mol} = 3.0 \times 10^6 \text{ copy}/\mu\text{l}$$

$$1 \times 10^4 \text{ copy}/(3.0 \times 10^6 \text{ copy}/\mu\text{l}) = 1/300 \mu\text{l}$$

即：1/300 μl浓度为1 μg/μl的人类基因组DNA(3.3 ng)中含10<sup>4</sup>拷贝该基因，稀释300倍后加1 μl至25 μl PCR体系。

表3：25 μl PCR体系特定模板用量

特定模板	25μl PCR体系用量
cDNA	<2.5 μl (<10%PCR体系体积)
PCR产物	用TE # 稀释100~10000倍后，1 μl
菌液	直接使用1 μl菌液
菌落	枪头接触菌落，在PCR管中吹打数次

#### △引物浓度

一般每条引物配制的浓度为10 μM(50×)，工作浓度为0.2 μM。引物过量可能会出现非特异性扩增，引物过少可能会降低扩增效率。

#### △dNTPs

dNTPs应少量分装，减少反复冻融。需特别注意dCTP会缓慢水解为dUTP，后者是pfu酶的抑制剂，还会导致A→G突变。dNTPs反复冻融和过多循环数(高温条件)都会加剧dCTP水解。

常规PCR中dNTPs使用终浓度为0.2 mM(each)，浓度过低会减少PCR产物的产量；浓度过高会因dNTP上的磷酸根螯合Mg<sup>2+</sup>降低游离Mg<sup>2+</sup>浓度而抑制PCR，如需调整dNTPs浓度，需同时调整Mg<sup>2+</sup>，使游离Mg<sup>2+</sup>为0.7 mM。

### ●PCR参数设置

#### △预变性

一般预变性温度为95°C，不同种类模板建议使用预变性时间见表4：

表4：各种模板建议使用的预变性时间

模板种类	预变性时间
直接PCR(比如菌液、毛囊)	10-15 min
超螺旋质粒DNA	5-10 min
基因组DNA	3-5 min
cDNA或者PCR产物	10秒

变性温度过高或时间过长会造成模板DNA的断裂和水解，降低PCR效率。

#### △退火温度：PCR的关键参数

初次使用一对引物时可尝试低于Tm 5°C作为退火温

度(如果两条引物Tm不同, 参考较低的Tm)。

使用oligo软件计算引物的Td值, 以低于Td值4°C作为退火温度。Td值的计算方法考虑了引物邻近碱基组成和引物3'末端与模板配对的稳定性, 因此更具有参考意义。

退火温度偏高不利于引物与模板的结合, 会降低PCR效率。退火温度偏低, 会增加引物之间、引物与模板的非特异性结合, 降低了引物与模板特异性结合的概率, 从而降低了PCR效率, 最不利的情况是产生大量引物二聚体和非特异性扩增。

最佳退火温度需要进行梯度PCR确定。

如果最佳退火温度为68°C-78°C, 可以省略延伸步骤, 即合并退火和延伸步骤。

### △延伸

延伸温度通常为72°C, 延伸时间以1 kb/min计算, 时间过长可能会增加非特异性扩增。延伸时间过短, 相对有利于引物二聚体的扩增。

循环结束后, 继续延伸5~10 min, 以获得完整的双链产物。

### △循环数: 非常重要的PCR参数, 切勿盲目引用文献参数

循环数过多可能会减少目的产物。PCR过程中不完全延伸和高温断裂, 会缓慢积累随机3'末端。产生大量PCR产物后, 引物被大量消耗, PCR产物3'末端和随机3'末端与变性模板的非特异性结合相对占优势, 出现了随机扩增; dNTP大量消耗导致游离Mg<sup>2+</sup>浓度增高, 也加剧了随机扩增。随机扩增产物电泳为涂抹带, 随着循环数的增加随机扩增产物长度会不断延长, 甚至电泳时积累在加样孔, 而目的PCR产物会逐渐减少, 甚至消失。

循环数过多会产生大量气溶胶, 可能会污染同次PCR其他反应管, 造成假阳性。例如单独做空白对照无目的产物, 而与阳性样品平行PCR时, 空白对照出现了目的产物。

**莱枫PCR系列产品PCR效率通常会高于其他公司同类产品, 应特别注意控制循环数, 建议参考表5使用合适的循环数。**

最佳循环数与模板DNA种类、拷贝数、纯度和加样量, 退火温度, PCR试剂等各种因素有关。

摸索最佳循环数: 配制大体积PCR体系, 分装到3-5个PCR反应管, 使用较低的循环数取出一管(例如, PCR产物为模板进行10个循环), 预变性时间设为10秒, 再进行3-5个循环, 以此类推, 最后平行电泳。

表5: 各种模板建议使用的循环数

模板种类	循环数
1. PCR产物	10-20
2. 质粒DNA	15-25
3. 菌液、菌落PCR克隆鉴定	20-25
4. 高拷贝模板	15-20
5. 多拷贝模板	15-25
6. 低拷贝模板	25-35
7. 痕量模板	30-40

1. PCR产物: 二次PCR或者重叠PCR。
2. 质粒DNA: 通用引物建议使用15-25个循环, 如扩增高GC区需增加循环数。
3. 菌液、菌落: 通用引物建议使用20-25个循环。
4. 高拷贝模板: 基因组上高度重复序列, 几百-几百万个拷贝, 例如真核生物rRNA和某些tRNA基因。
5. 多拷贝模板: 基因组上轻度和中度重复序列, 例如真核生物actin、gloubin等内参基因, 原核生物rRNA和某些tRNA基因; 高丰度mRNA逆转录产物, 例如actin、gloubin等内参基因。
6. 低拷贝模板: 基因组上单一序列, 大部分功能基因为单拷贝。低丰度mRNA逆转录产物。
7. 痕量模板: 模板总量为ng级或更低; 因断裂或降解导致有效模板量少, 比如血浆游离DNA、石蜡包埋组织中单拷贝基因。

## ●提高PCR特异性的方法

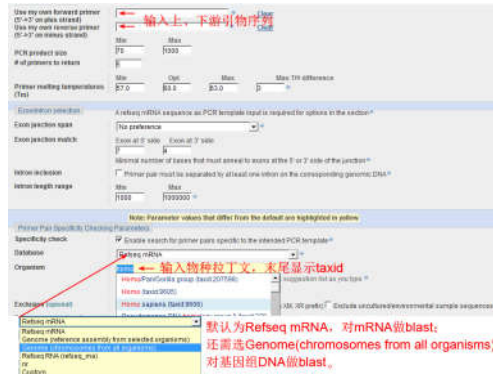
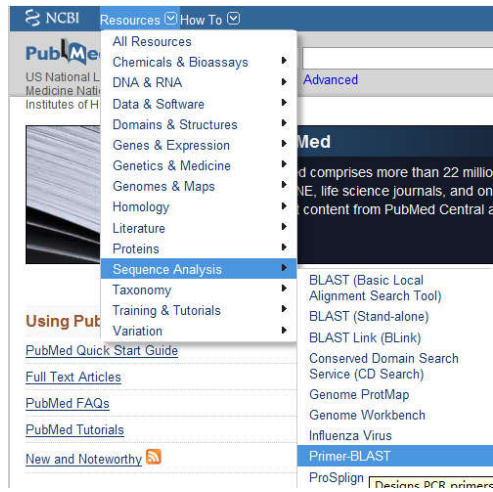
### △使用适量的模板DNA

模板量偏多或者偏少都可能产生非特异性扩增, 请参考●PCR体系成分△模板DNA用量。

### △Blast

对引物进行Blast验证是非常有必要的, 有时候非特异性扩增是因为引物设计不合理造成的。

cDNA除了对mRNA Blast之外, 还需要对Gemome做Blast, 没有任何RNA提取和纯化方法能彻底去除DNA, 非特异性扩增也可能是来自基因组DNA。



### △递减PCR(Touch Down PCR)

PCR起始的几个循环使用严紧的退火条件。虽然扩增效率低, 但靶序列特异性最高, 被优先扩增, 其产物在后续循环中继续占优势, 从而提高特异性。

退火温度从高于Tm(或者Td) 5°C开始, 每个循环递减, 直到低于Tm(或者Td) 5°C; 一般用10个循环, 每个循环降低1°C。之后用低于Tm(或者Td) 5°C作为退火温度, 再进行15-25个循环。

### △巢式PCR(Nested PCR)

用两对引物进行两次PCR。第一对引物(外引物)从多个靶位点扩增产生特异性和非特异性产物。第二对引物(巢式引物)位于第一对引物内侧, 只能与第一次PCR产生的特异性产物互补(因为同时能与两对引物互补的非特异序列极少)。即: 第一次PCR产生的特异性产物在第二次PCR中占绝对优势被扩增。

## ●常规PCR污染和防治

### 1. 气溶胶污染

PCR过程中会产生气溶胶, 即PCR产物从PCR管中蒸发污染同次PCR的其他反应管、PCR仪和局部空间。如果PCR仪盖热效果差、PCR管盖子密封性差或者PCR管在高温时变形, 气溶胶污染会更严重。

使用合适的循环数能避免同次PCR产生的气溶胶污染其他反应管, 例如某些高拷贝模板使用20个循环目的产物已经足够多, 空白对照和阴性样品未出现目的产物, 而使用30个循环目的产物的量没有明显的变化或者反而减少, 而空白对照和阴性样品出现目的产物(假阳性)。

使用同一种引物在同一台PCR仪连续进行PCR, 上一次PCR残留的气溶胶容易污染下一次PCR样品。高温条件下DNA会断裂和水解, 以此可以消除PCR仪内气溶胶污染; 使用不同的引物交叉进行PCR, 或将PCR仪空运行95-100°C半小时, 再进行PCR。

吸取PCR产物的移液器中有大量气溶胶污染, 因此配制PCR体系与PCR产物电泳需分别使用专用的移液器。

气溶胶也可能存在于PCR仪周围或电泳槽附近, 因此尽可能将PCR样品准备场所远离PCR仪和电泳槽。

### 2. 不良操作习惯造成的污染

应特别注意离心管开盖和使用枪头吸取样品或者试剂时造成的污染, 左图为1.5 ml普通离心管, 箭头所指处为可能的污染源。

使用螺口冻存管能避免离心管盖子上的污染; 使用加长的10-20 µl枪头能避免移液器带来的污染。

### 3. 加样器、实验器材和容器等去除污染的方法

A. 1%盐酸或者次氯酸浸泡半小时以上, 尤其是次氯酸的氧化性也会使DNA断裂。适合处理手术剪、刀片、玻璃和塑料容器等。

原理: DNA在酸性环境中水解、脱嘌呤  
B. 湿热高压。移液器和塑料器材需询问厂家能否高压。酒精灯炙烤。适合处理手术剪和刀片。  
原理: DNA在高温条件下水解、断裂

C. 紫外照射。去除DNA污染不彻底, 但适合处理房间或者操作台等空间场所。  
原理: 紫外照射下DNA形成嘧啶二聚体

