杭 州 新 景 生 物 试 剂 开 发 有 限 公 司
地址：浙江省杭州市西湖科技经济园西园一路 8 号 4 幢 5F
邮编：310030 电话：0571-87381295 传真：0571-87381297

2×Fast Taq PCR Master Mix 说明书

产品组成

Cat. No.	7009001	7009005
2×Fast Taq PCR Master Mix	1 ml	1 ml×5
ddH_2O	1 ml	1 ml×5
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

- 20℃保存，有效期两年。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

2×Fast Taq PCR Master Mix 是一种优化的两倍浓度的 PCR 预混合液，选用了改造过的 Taq DNA Polymerase，扩增速度是普通 Taq DNA Polymerase 的 4 倍，可达 15 sec/kb，适合用于常规 PCR，可以从复杂基因组 DNA 中扩增出长达 4 kb 的片段或者从λDNA 中扩增出长达 5 kb 的片段。产品使用方便，只需要取 0.5 倍 PCR 体系体积的 2×Fast Taq PCR Master Mix，加入引物和模板，以 ddH_2O 补足体积即可。扩增得到的目的产物 3′端附有一个 A 碱基，可以直接克隆于 T-Vector 中。产品含有蓝色电泳指示染料，扩增产物可直接进行琼脂糖电泳检测。

PCR 体系成分

1. 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)、高浓度盐(KAc、NaAc、辛酸钠等)和高浓度 EDTA 等。纯度不高的模板（比如煮沸法获取的模板）用量请勿超过 PCR 反应体系的 1/10（比如 50 µl 反应体系中加入模板的体积不应超过 5 µl）。如果模板 DNA 纯度太差，可使用 Simgen DNA 纯化试剂盒（Cat. No.2101050）对模板 DNA 进行纯化及浓缩，纯化后的模板使用量可多至 PCR 反应体系体积的 1/2。
2. 模板 DNA 用量：极微量的 DNA 也可以作为 PCR 摸板，但为保证反应的稳定性，50 µl 体系建议使用 10^4 拷贝的靶序列作为模板。模板 DNA 的推荐使用量：

   人基因组DNA： 50 ng~500 ng/50 µl PCR反应体系
   大肠杆菌基因组DNA： 10 ng~100 ng/50 µl PCR反应体系
   λDNA： 0.5 ng~5 ng/50 µl PCR反应体系
   质粒DNA： 0.1 ng~10 ng/50 µl PCR反应体系

   如需用扩增产物作为模板再扩增，应至少将扩增产物稀释 1,000 至 10,000 倍后再作为模板使用。
3. 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，引物过少则可能会降低扩增效率。

PCR 参数设置

1. 预变性：一般预变性为 94℃，1~5 min。变性温度过高或时间过长都会损失 Taq 酶的活性。
2. 退火：退火温度是 PCR 的关键 ，温度过高可能降低产量，温度过低可能产生引物二聚体或非特异性扩增。初次尝试 PCR 扩增建议直接选用 55℃作为退火温度，或者尝试使用低于 Tm 5℃ (如果两条引物 Tm 不同，参考较低的 Tm)的温度作为退火温度。一般引物合成公司会提供所合成引物的 Tm，也可以根据此公式估算引物 Tm：Tm = 2℃×(A+T) + 4℃× (G+C)。最佳退火温度需要进行梯度 PCR 确定。
3. 延伸：延伸温度通常为 72℃，延伸时间长短取决于目的 DNA 片段长度，以 15 sec/kb 计算所需延伸时间，时间过长可能会导致非特异性增加。循环结束后，继续延伸 3~5 min，以获得完整的双链产物。
4. 循环数：一般使用 25~35 个循环，低拷贝模板可适当增加循环数。过多的循环数可能会增加非特异性扩增，减少特异性产物。

操作步骤：

1. 将 2×Fast Taq PCR Master Mix、ddH_2O、模板 DNA 和引物室温解冻，置于冰上。
2. 将解冻后各个组分上下翻转混合均匀，按下列组成配制 PCR 反应液：

2×Fast Taq PCR Master Mix	25 µl
Primer 1（10 µM）	1 µl
Primer 2（10 µM）	1 µl
模板	n µl
ddH_2O	(23-n) µl
Total	50 µl*

* 注意：上述例子为 50 µl 反应体系所加的组分，如果需要其他体积的反应体系，请按比例增减各组分。

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℃ 3 min
94℃ 20 sec
※55℃ 20 sec } 30 Cycles
§ 72℃ 1 min
72℃ 5 min

※以实际最佳退火温度为准。

§ 以15 sec/kb计算。

5. 结果检测：取5-10 µl扩增产物直接进行琼脂糖凝胶电泳检测。

琼脂糖凝胶浓度与线形 DNA 最佳分辨范围的关系：

琼脂糖浓度	最佳线形 DNA 分辨范围
0.5%	1,000~30,000
0.7%	800~12,000
1.0%	500~10,000
1.2%	400~7,000
1.5%	200~3,000
2.0%	50~2,000