

2×Direct PCR Mix 说明书

产品组成

Cat. No.	7011001	7011005
2×Direct PCR Mix	1 ml	1 ml×5
ddH ₂ O	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×Direct PCR Mix 是一种优化的两倍浓度的 PCR 预混合液，选用了改造过的 DNA 聚合酶，对 PCR 抑制物具有较强的耐受性，同时保持了较高的扩增性能和扩增速度，扩增速度是普通 Taq DNA Polymerase 的 4 倍，可达 15 sec/kb，适合用于快速检测。

2×Direct PCR Mix 对常规模板、粗品模板（细菌、酵母、动植物裂解产物、全血样本等）均可兼容，同时对乙醇、血红素等 PCR 抑制物有更强的耐受性。产品使用方便，只需要取 0.5 倍 PCR 体系体积的 2×Direct PCR Mix，加入引物和模板，以 ddH₂O 补足体积即可。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 参数设置

1. 预变性：预变性为 98℃，5 min，可进一步促使样本裂解，释放可用于 PCR 扩增的 DNA。
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 T_m 5℃的温度作为退火温度（如果两条引物 T_m 不同，参考较低的 T_m）。一般引物合成公司会提供所合成引物的 T_m，也可以根据此公式估算引物 T_m：T_m = 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扩增增加。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. 不同样本类型的模板使用量及预处理方法参考下表：

样本类型	样本用量	处理方式
细菌	1-5 μl	直接吸取 1-5 μl 菌液或将单菌落用 100 μl 超纯水悬浮后吸取 1-5 μl 作为模板。
酵母	1-5 μl	直接吸取 1-5 μl 菌液或将单菌落用 100 μl 超纯水悬浮后吸取 1-5 μl 作为模板。
全血	1-5 μl	直接吸取 1-5 μl 全血作为模板。
血凝块	1-5 mg	直接取 1-5 mg 血凝块作为模板。
动物组织	5-20 mg	取 5-20 mg 组织用裂解液粗提后吸取 1-5 μl 作为模板。
植物组织	5-20 mg	取 5-20 mg 组织用裂解液粗提后吸取 1-5 μl 做为模板。

* 若因样本差异出现扩增效果不理想或者扩增较长片段时效果不理想，建议使用柱式试剂盒（推荐使用快速通用型基因组 DNA 提取试剂盒，Simgen Cat. No. 3105050）提取 DNA 后再扩增。

2. 将 2×Direct PCR Mix、ddH₂O、模板和引物室温解冻，置于冰上。

3. 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×Direct PCR Mix	25 μl
Primer 1 (10 μM)	2 μl ^{*1}
Primer 2 (10 μM)	2 μl ^{*1}
模板	n μl ^{*2}
ddH ₂ O	(21-n) μl
Total	50 μl^{*3}

*1 通常引物终浓度为 0.4 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0 μM 范围内调整引物浓度。

*2 样品使用量可根据实际情况调整；裂解法粗品模板单个反应使用量可在反应总体积的 2% - 20%之间调整，使用过多易导致扩增失败。

*3 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。

4. 手指轻弹 PCR 反应管充分混匀，简短离心。

5. PCR 反应循环设置举例

98°C	5 min	} 30 Cycles
94°C	20 sec	
※55°C	20 sec	
§ 72°C	15 sec	
72°C	5 min	

※以实际最佳退火温度为准。

§ 以 15 sec/kb 计算。

6. 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。