

2×E-Taq PCR Master Mix 说明书

产品组成

Cat. No.	7007001	7007005	7007025	7007040
2×E-Taq PCR Master Mix	1 ml	1 ml×5	5 ml×5	1 ml×40
ddH ₂ O	1 ml	1 ml×5	5 ml×5	1 ml×40
说明书	1 份	1 份	1 份	1 份

注意：2×E-Taq PCR Master Mix 含有 3 mM Mg²⁺。

产品储存与有效期

- 20°C保存，有效期为 2 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×E-Taq PCR Master Mix 是一种优化的两倍浓度的 PCR 预混合液。适合用保真性要求高、扩增片段长的 PCR，可以从复杂基因组 DNA 中扩增出长达 10 kb 的片段。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×E-Taq PCR Master Mix，加入引物和模板，以 ddH₂O 补足体积即可。

2×E-Taq PCR Master Mix 中含 E-Taq DNA Polymerase，扩增得到的大部分目的产物 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

- 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，可使用新景（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。
- 模板 DNA 用量：极微量的 DNA 也可以作为 PCR 模板，但为保证反应的稳定性，50 μl 体系建议使用 10⁴ 拷贝以上的靶序列作为模板。模板 DNA 的推荐使用量如下：

基因组 DNA:	50 ng ~ 500 ng/50 μl PCR 反应体系
λ噬菌体 DNA:	0.5 ng~5 ng/50 μl PCR 反应体系
质粒或病毒 DNA:	0.1 ng ~ 50 ng/50 μl PCR 反应体系
cDNA:	1-5 μl (不超过 PCR 反应总体积的 1/10)

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，否则可能会出现涂抹条带或无特异性条带。

- 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，可以在 0.2~1.0 μM 范围内调整引物浓度。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

- 预变性：一般预变性为 94°C，1~5 min。变性温度过高或时间过长都会损失 E-Taq 酶的活性。
- 退火：退火温度是 PCR 的关键，温度过高可能降低产量，温度过低可能会产生引物二聚体或非特异性扩增。初次尝试 PCR 扩增建议尝试低于 Tm 5°C (如果两条引物 Tm 不同，参考较低的 Tm)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： $Tm = 2^{\circ}\text{C} \times (A+T) + 4^{\circ}\text{C} \times (G+C)$ 。最佳退火温度需要进行梯度 PCR 确定。
- 延伸：延伸温度通常为 72°C，延伸时间长短取决于目的 DNA 片段长度，以 1 kb/min 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 5~15 min，以获得完整的双链产物。
- 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

- 将 2×E-Taq PCR Master Mix、ddH₂O、模板 DNA 和引物室温解冻，置于冰上。
- 将解冻后的各个组分上下翻转混合均匀，按下表配制 PCR 反应体系：

2×E-Taq PCR Master Mix	25 μl
Primer 1 (10 μM)	1 μl
Primer 2 (10 μM)	1 μl
模板	n μl ^{*1}
ddH ₂ O	(23-n) μl
Total	50 μl ^{*2}

*1 请仔细阅读“PCR 体系成分”内容，按推荐用量添加模板。

*2 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。

- 手指轻弹 PCR 反应管充分混匀，低速离心数秒使溶液沉降到管底。
- PCR 反应程序设置举例（请仔细阅读“PCR 参数设置”内容）：

常规程序（三步法程序）：

94°C	3 min
94°C	30 sec
55°C ^{*1}	30 sec
72°C	1 min ^{*2}
72°C	5 min

*1 以实际最佳退火温度为准。

*2 以 1 kb/min 计算。

4 kb 以上目的片段推荐用两步法程序：

94°C	3 min
94°C	20 sec
65°C ^{*3}	10 min ^{*4}
72°C	15 min

*3 温度可在 60~68°C 之间调整，以实际最佳温度为准。

*4 以 1 kb/min 计算。

- 结果检测：取 5~10 μl 扩增产物直接进行琼脂糖电泳检测。

琼脂糖凝胶浓度与线形 DNA 最佳分辨率范围的关系

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