

Version 1

Cat No. AG11107
AG11111

2X Pro Taq 预混液 Ver. 2

2X Pro Taq Master Mix Ver. 2

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

本品为即用型 *Pro Taq* Enzyme PCR 反应 2 倍浓度的预混液，包含 *Pro Taq* DNA Polymerase、dNTPs 以及优化的 Buffer 体系，进行 PCR 反应时，只需向预混液中加入模板、引物和水即可进行扩增。这种预混液方案操作简便，可最大限度的减少人为误差，减少多步操作可能带来的污染，在较短时间内即可获得检测结果。其中的 *Pro Taq* enzyme 是利用本公司性能优越的 *Accurate Taq* enzyme 中添加了高保真酶，使其具有部分 3' → 5' Exonuclease 活性（Proof reading 活性），非常适合 10 kb 以上 DNA 片段的扩增，并且具有较好的保真性能。PCR 产物的 3' 端带有一个 A 碱基，可直接克隆于 T 载体。

➤ 产品组成

组分名称	AG11107 (120 rxns / 50 μl)	AG11111 (960 rxns / 50 μl)
2X <i>Pro Taq</i> Master Mix Ver. 2	500 μl X 6 pc	1 ml X 24 pc
RNase free water	1 ml X 3 pc	/

➤ 保存

保存温度：-20°C

运输温度：干冰或者-20°C冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本制品为 2X 的预混液，只需向预混液中加入模板、引物和水即可进行扩增，操作简便，可最大限度的减少人为误差，减少多步操作可能带来的污染，在较短时间内即可获得检测结果。
2. 2X *Pro Taq* Master Mix Ver. 2 热稳定性较好，以 λ DNA 为模板可扩增 ~ 40 kb 的 DNA 片段，以 Human 基因组 DNA 为模板可扩增 ~ 17.5 kb 的 DNA 片段。
3. 本品中添加了高保真酶，相对于 *Accurate Taq* Master Mix 具有更高的保真性。在普通的 PCR 扩增条件下，具有扩增效率高、错配率低的特点。

➤ 实验原理

PCR 扩增原理

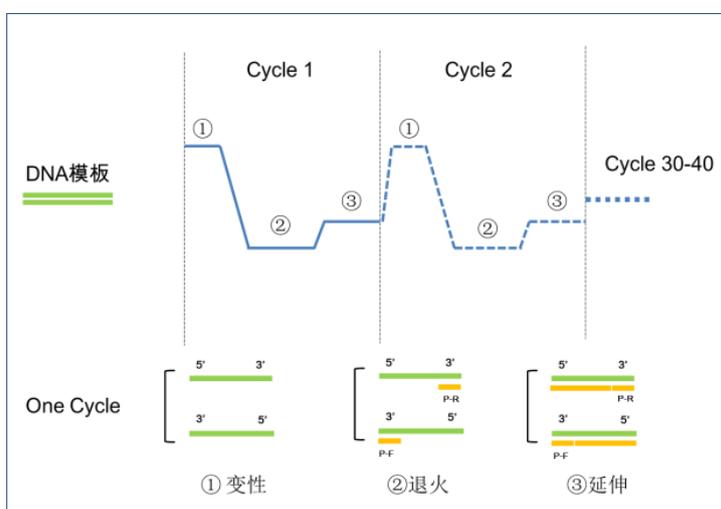
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

扩增详情如下，一般将步骤①②③称为一个循环，每次进行 DNA 扩增时以此循环 30-40 次。进行 PCR 扩增时，可根据引物的不同调整退火温度，进而获得最优 PCR 扩增反应条件。

步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

步骤②：引物与单链 DNA 进行退火；

步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下进行延伸，与单链 DNA 形成互补链。



➤ 使用注意事项

1. 2X Pro Taq Master Mix Ver.2 需要溶液融化后离心，将所有的溶液收集至离心管底部，然后再进行使用，减少损失；使用时应轻柔混匀（避免起泡），缓慢吸取。
2. 反应体系需要在冰上配制，最后将配制好的反应液放置于 PCR 仪中反应。
3. 本制品避免反复冻融，以免降低酶活性。

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材：

Primer、DNA 模板、PCR 管、枪头、冰浴或冰盒。

2. 仪器：

PCR 仪、移液器、旋涡振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪。

➤ 操作方法

1. 配制 PCR 反应液

- 1) 首先按照下表所示配制 PCR 反应液，反应体系需要在冰上配制。
- 2) 将配制好的溶液轻轻的涡旋混匀。

组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
2X <i>Pro Taq</i> Master Mix Ver.2	1X	25 μl
Template ^{*1}	< 500 ng	-
Primer F (10 μM) ^{*2}	0.2 μM	1 μl
Primer R (10 μM) ^{*2}	0.2 μM	1 μl
RNase free water	-	Up to 50 μl

*1: 模板用量一般 < 500 ng; 同时, 可根据实际需要调整模板用量;

*2: 引物通常使用终浓度为 0.2 μM; 同时, 可根据实际需要 0.2 - 1.0 μM 范围内调整。

2. 反应条件 (以三步法扩增 1 kb DNA 片段为例^{*5})

溶液混匀之后, 将 Tube 放置于 PCR 仪中, 然后按照下表条件进行 PCR 反应:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	30 sec ^{*1}	1
变性	98°C	10 sec ^{*2}	} 25-35
退火	55°C	30 sec ^{*3}	
延伸	72°C	1 min / kb ^{*4}	
最终延伸	72°C	2 min	1

*1: 一般建议将预变性设置为 94°C 30 sec~1 min; 对于复杂模板, 如高 GC 或者长片段, 可尝试延长预变性时间。

*2: 变性条件的设定可根据设备进行调整, 一般 98°C 5~10 sec 或 94°C 30 sec。

*3: 退火温度主要取决于上下游引物的 T_m 值, 通常可按照 T_m ± 5°C 设定。

*4: 延伸温度一般设定为 72°C, 延伸速度 1 min / kb; 同时, 可在 30 sec / kb ~1 min / kb 范围内进行调整。

*5: 可根据具体实验情况选择两步法进行 PCR 扩增。

1) 结果检测

反应结束后, 取适量反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

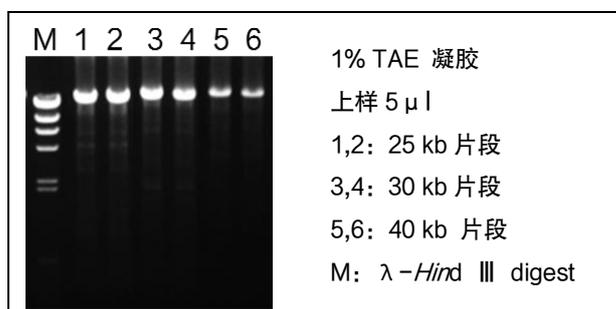
➤ **实验例**

1. 以 λ DNA 为模板，能够很好地扩增出长达 40 kb 的 DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	5 sec	} 30
68°C	15 min	
72°C	10 min	1

电泳结果如下:

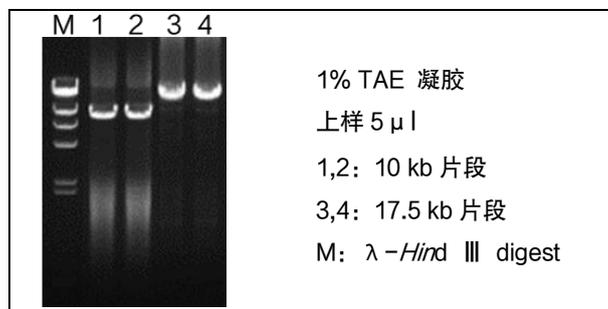


2. 以 Human 的基因组 DNA 为模板，能够很好地扩增出长达 17.5 kb 的 DNA 片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	10 sec	} 30
68°C	1 min / kb	
72°C	10 min	1

电泳结果如下:

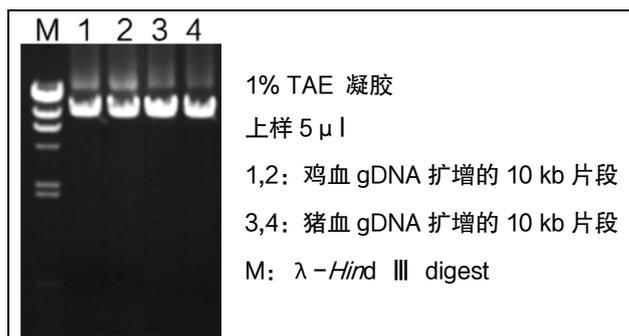


3. 以鸡血、猪血的 gDNA 为模板，分别扩增 10 kb 的 DNA 片段，能够很好地扩增出目的片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	10 sec	} 30
68°C	1 min / kb	
72°C	10 min	1

电泳结果如下:

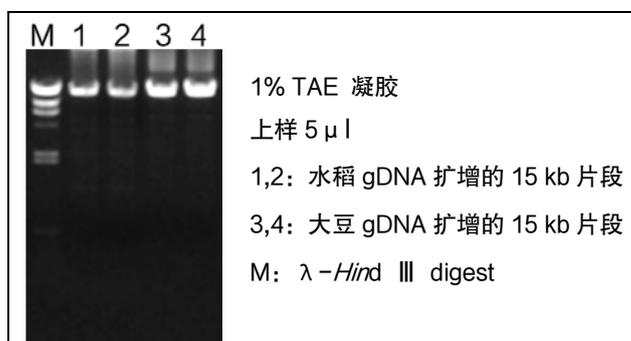


4. 以水稻、大豆的 gDNA 为模板，分别扩增 15 kb 的 DNA 片段，能够很好地扩增出目的片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	1 min	1
98°C	10 sec	} 30
68°C	1 min / kb	
72°C	10 min	1

电泳结果如下:

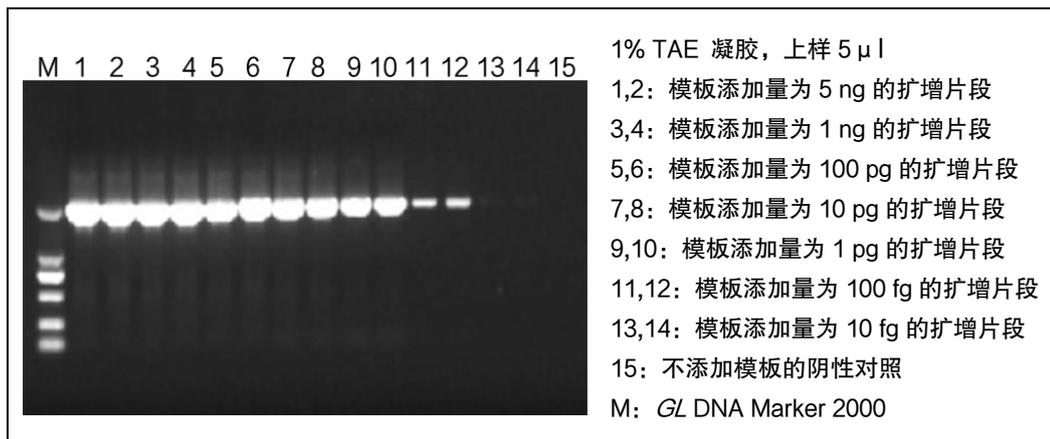


5. 以 λ DNA 为模板，添加不同模板量 (5 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg、10 fg) 采用本试剂盒扩增 2 kb DNA 片段，模板低至 100 fg 时，可以扩增出目的片段。

反应程序:

温度	时间	循环数
94°C	30 sec	1
98°C	10 sec	}
55°C	30 sec	
72°C	1 min / kb	
72°C	2 min	30
		1

电泳结果如下:



➤ 产品注意事项

1. 合适的模板

- ❖ 模板加入量降低时, 扩增效率降低, 产物量减少, 扩增特异性升高; 模板加入量升高时, 扩增效率升高, 扩增特异性降低; 可根据实际情况调整模板加入量。
- ❖ 模板的纯度及完整性影响 PCR 反应, 采用高质量高纯度的 DNA 模板, 可提高 PCR 反应的成功率, 降低外源污染。模板不纯、降解或模板中含有抑制 PCR 反应的物质等, 都可能会导致 PCR 反应扩增效率降低, PCR 反应产物产量减少, 建议更换模板, 重新实验。

2. 合适的引物

- ❖ 引物一般是 15-30 个碱基的寡核苷酸, GC 含量在 40-60%之间。
- ❖ 建议正反向引物 Tm 值在 50-70°C, 两引物 Tm 值相差不超过 5°C。
- ❖ 引物 A、T、C、G 整体分布要尽量均匀, 避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
- ❖ 引物 3' 端避免出现发夹结构。减少正反向引物之间的互补序列, 最好不要超过 4 个连续互补序列。
- ❖ 合适的引物浓度为 0.2 ~1.0 μ M。引物浓度降低时, 扩增效率降低, 反应特异性升高。引物浓度升高时, 扩增效率升高, 反应特异性降低。

3. 合适的变性温度及时间

- ❖ 一般建议将预变性设置为 94°C 30 sec~1 min；对于复杂模板，如高 GC 或者长片段，可尝试延长预变性时间，但时间过长，可能会影响 DNA 聚合酶活性。
- ❖ 变性时间过长或温度过高，可能导致非特异性扩增、DNA 聚合酶活性降低等问题发生；变性时间过短或温度过低，可能导致扩增效率低，电泳条带弥散。

4. 合适的退火温度及时间

- ❖ 退火温度越高，扩增特异性越高，但一定程度上扩增效率会降低。
- ❖ 退火温度过低，可能导致反应特异性不好，并且可能出现引物二聚体。

5. 扩增循环数

- ❖ 扩增循环数取决于模板的初始拷贝数。如果模板的初始拷贝数少于 10 个，则需要大约 40 个循环。对于初始拷贝数较高的模板，一般推荐 25-35 个循环。

6. 防止污染措施

- ❖ 配制反应液与添加 DNA 模板的区域最好分开，避免交叉污染。
- ❖ 每次实验设置不添加模板的阴性对照，以检查是否存在污染。