2× Taq PCR Aurora Mix

REF: EG25104-M/L

储存条件

-20℃保存 2 年

产品组成

组分	规格 M	规格 L
2× Taq PCR Aurora Mix	5×1 ml	100×1 ml

产品简介

Taq PCR Aurora Mix 的浓度为 2×，使用方便快捷，能减少 PCR 操作过程中的污染，使用时只需取适量 2× Taq PCR Aurora Mix (+Dye)，加入模板和引物，并加入 ddH_2O 补足体积，使反应体系浓度为 1×，即可进行 PCR 反应。PCR 产物 3' 端带突出 A 碱基，纯化后可直接用于 T/A 克隆。

该 Mix 中含有 Taq DNA 聚合酶和一种含有 3' → 5' 外切活性的蛋白，能够高效扩增 ≤7 kb 的 DNA 片段，扩增产量高，配合优化后的反应缓冲液，可实现对不同 GC 含量（30%~70%）的高效扩增。此外，相较于 WT-Taq，Taq PCR Aurora Mix 延伸速度提高了 2~4 倍，可有效缩短反应时间。

本 PCR Mix 中包含两种染料，PCR 产物无需添加 Loading Buffer 可直接点样电泳，且电泳过程中会出现蓝色指示条带。该染料不影响 PCR 扩增效率，但对于需要对 PCR 产物进行吸光度、荧光等光学分析的实验，建议在分析前对 PCR 产物进行纯化。

质量控制

核酸内切酶活性检测

将 25 μl 2× Taq PCR Aurora Mix 与 200 ng 超螺旋质粒 DNA 配制成 50 μl 反应体系，在 37℃下，共同温育 4 h 后，使用琼脂糖凝胶电泳检测，少于 10% 的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

非特异性核酸酶活性检测

将 25 μl 2× Taq PCR Aurora Mix 与 15 ng 双链 DNA 片段配制成 50 μl 反应体系，在 37℃下温育 16 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测双链 DNA 底物无变化。

使用方法

1. 常规 PCR 反应体系（冰上操作）

试剂	使用量	终浓度
2× Taq PCR Aurora Mix[a]	25 μl	1×
正向引物 (10 μM)[b]	1~2 μl	0.2~0.4 μM
反向引物 (10 μM)[b]	1~2 μl	0.2~0.4 μM
模板 DNA[c]	x μl	
ddH_2O	To 50 μl	

a. 需融解完全后使用，防止离子浓度不均匀；
b. 引物推荐终浓度为 0.2~0.4 μM，效果不佳时可以在 0.1~1 μM 浓度范围内进行调整；
c. 不同模板最佳反应浓度有所不同，以 50 μl 体系为例：模板为基因组 DNA 时，一般推荐的使用量为 10~200 ng；当模板为质粒或病毒 DNA 时，一般推荐的使用量为 10 pg~5 ng。模板量过多时容易造成非特异性扩增。

2. 三步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	
预变性[d]	95℃	3~5 min	
变性	95℃	30 s	30~35 Cycles
退火[e]	55~65℃	30 s	
延伸[f]	72℃	15~30 s/kb	
终延伸	72℃	5 min	

3. 二步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	
预变性[d]	95℃	3~5 min	
变性	95℃	30 s	30~35 Cycles
退火和延伸[e]	60~65℃	30 s/kb	
终延伸	72℃	5 min	

d. 大肠杆菌菌落 PCR：建议将预变性调整 10 min，无需预裂解即可高效扩增；酵母菌菌落 PCR：无需调整预变性时间，但需要对酵母菌进行预裂解。建议使用以下预裂解方式：向酵母菌中添加终浓度 20 mM 的 NaOH 后 95℃预裂解 10 min，或将酵母菌使用液氮反复冻融 2~5 次。

e. 退火温度请根据引物 Tm 值设置。如果需要，推荐通过建立温度梯度寻找引物与模板结合的最适温度。此外，退火温度直接决定扩增特异性，如发现扩增特异性差，可适当提高退火温度。

f. 目的片段长度＜ 3 kb，延伸时间可缩短至 15 s/kb；目的片段长度＞ 3 kb，延伸时间建议 30 s/kb。若要达到最佳扩增效果或较高产量，推荐统一使用 30 s/kb 速度延伸。

江苏愚公生物科技有限公司 / 江苏百时美生物科技有限公司
Yugong Biotech Co., Ltd. / BestEnzymes Biotech Co., Ltd
Tel: 0518-8558 6628 • E-mail:support@best-enzymes.com • www.best-enzymes.com
最终解释权所有 © 江苏愚公生物科技有限公司，保留一切权利
ISO 13485 高新技术企业
愚公生物微信公众号 愚公生物科研小助手 愚公生物微信视频号

注意事项

一、引物设计

1. 引物 3' 端最后一个碱基最好为 G 或者 C。
2. 引物 3' 端最后 8 个碱基应避免出现连续错配，同时也避免出现发夹结构。
3. 正向引物和反向引物的 Tm 值相差不超过 1℃为佳，Tm 值调整至 55 ~ 65℃为佳 (引物 Tm 值推荐使用 Primer Premier 5 进行计算)。
4. 引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物 Tm 值计算；引物的 GC 含量控制在 40%~60% 之间。
5. 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
6. 引物内部或者两条引物之间避免有 5 个碱基以上的互补序列，两条引物的 3' 端避免有 3 个碱基以上的互补序列。
7. 引物设计完毕请使用 NCBI BLAST 功能检索引物特异性，以避免产生非特异性扩增。

二、产物电泳与染色

胶染与泡染对蓝色指示条带无影响，蓝色条带在 1% TAE 缓冲液中迁移速率约等于 1500 bp。

常见问题

问题描述	可能原因	解决办法
无产物或产物量少	引物	优化引物设计
	退火温度	设置退火温度梯度，找到合适的退火温度
	引物浓度	适当提高引物浓度
	延伸时间	适当增加延伸时间至 30 s/kb
	循环数	增加循环数至 35~40 个循环
	模板纯度	使用高纯度模板
	模板使用量	粗提样品可能需要减少使用量； 其他样品使用量参照反应体系推荐量并适量增加
有杂带或弥散条带	引物	优化引物设计
	退火温度	尝试提高退火温度，可间隔 2°C设置温度至 65°C
	引物浓度	降低引物浓度至终浓度为 0.2 μM
	延伸时间	有大于目标条带的杂带时可减少延伸时间
	循环数	减少循环数至 25~30 个循环
	模板纯度	使用高纯度模板
	模板使用量	使用量参照反应体系推荐量调整

江苏愚公生物科技有限公司 / 江苏百时美生物科技有限公司
Yugong Biotech Co., Ltd. / BestEnzymes Biotech Co., Ltd
Tel: 0518-8558 6628 • E-mail:support@best-enzymes.com • www.best-enzymes.com
最终解释权所有 © 江苏愚公生物科技有限公司，保留一切权利