

## PCR 教学试剂盒

Cat. #: P8021, P8022

### 产品简介

本试剂盒是按照教学实验内容设计的,符合标准扩增流程的,教学用 PCR 反应试剂盒。本试剂盒所提供的模板为插入特定大小 DNA 片段的 PBluescript SK (+) 重组质粒;引物为根据所插入 DNA 序列和扩增片段大小不同设计的上下游引物。PCR 结果可获得特定大小 (500 bp 或 1,000 bp) 的 PCR 产物。

### 产品组成

Component	P8021 (500 bp, 30 次)	P8022 (1,000 bp, 30 次)
DNA 模板	150 $\mu$ l, 500 bp	150 $\mu$ l, 1,000 bp
上游引物 (10 $\mu$ M)	75 $\mu$ l	75 $\mu$ l
下游引物(10 $\mu$ M)	75 $\mu$ l	75 $\mu$ l
dNTP 混合物(2.5 mM)	150 $\mu$ l	150 $\mu$ l
Taq DNA 聚合酶(2.5 U/ $\mu$ l)	40 $\mu$ l	40 $\mu$ l
10 $\times$ PCR 缓冲液	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l
超纯水	1 ml	1 ml
说明书	1 份	1 份

### 活性定义

一个活性单位 (U) 指用活化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物,在 72 $^{\circ}$ C、30 min 内,摄入 10 nmol 全核苷酸所需的酶量。

### 保存条件

10 $\times$ PCR 缓冲液保存于 4 $^{\circ}$ C, 其他成分-20 $^{\circ}$ C 保存。

### 质量控制

纯度检测: 经质量检测, 产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测: PCR 方法检测本试剂盒无宿主残余 DNA, 也无其他 DNA 污染, 能有效完成 PCR 扩增。

### 应用举例

#### 1. 配制反应体系

请于冰上配置反应体系, 体系大小与组分用量与添加顺序可调整:

Ordina	Component	Volume (25 $\mu$ l reaction volume)	Volume (50 $\mu$ l reaction volume)	Volume (50 $\mu$ l reaction volume, n 管)
1	10 $\times$ PCR 缓冲液 (Mg <sup>2+</sup> Plus)	2.5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\times$ (n+1) $\mu$ l
2	dNTPs (2.5mM)	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\times$ (n+1) $\mu$ l
3	上游引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\times$ (n+1) $\mu$ l或 a $\mu$ l $\times$ (n+1)
4	下游引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\times$ (n+1) $\mu$ l或 a $\mu$ l $\times$ (n+1)
5	Taq DNA 聚合酶(2.5U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\times$ (n+1) $\mu$ l或 a $\mu$ l $\times$ (n+1)
6	template DNA	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\times$ (n+1) $\mu$ l或 a $\mu$ l $\times$ (n+1)
7	超纯水	16 $\mu$ l	32 $\mu$ l	32 $\times$ (n+1) $\mu$ l
8	石蜡油	如不能设置顶盖温度, 需适量加入石蜡油。		

- 加入各组分后, 请用枪头反复吸吹几次, 充分混匀。

- 在一次配制多管需分装时建议按 (n+1) 的反应液量配制，以确保分配时的耗损不会影响实验，同时选择大于总体积的离心管便于混匀。
- 如需使用其他体积的PCR反应体系，请按各组分比例缩减或增加各组分量。
- 组分中引物、DNA模板、Taq DNA聚合酶常用于梯度实验，如有调整，请注意调超纯水的用量至相应的体系。
- 将混匀的各管短暂离心，置于PCR仪中。

## 2. 设定反应程序进行 PCR 反应

Stage	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	94℃	3 min	1
Denaturation	94℃	30 sec	30
Annealing	55℃	30 sec	
Extension	72℃	30 sec or 45 sec	
Final Extension	72℃	5 min	1

- 设定PCR程序时，请根据目的片段大小决定延伸时间，如果目的片段大小为500 bp时，延伸时间为30 sec，目的片段为1 kb时，延伸时间为45 sec。

## 3. 分析结果

反应结束后取 2-5  $\mu$ l 反应产物与 loading buffer 混匀后进行琼脂糖凝胶电泳，通过凝胶成像设备观察目的条带的扩增情况。

- 500 bp产物建议电泳条件为1.7%琼脂糖凝胶，0.5×TBE，7 V/cm，20-40 min，建议Marker为 DSTM 2000 (M1101)。
- 1 kb产物建议电泳条件为1.0%琼脂糖凝胶，1×TAE，7 V/cm，20-40 min，建议Marker为 DSTM 5000 (M1111)。

### 注意事项

请严格按照说明书提供的实验体系及实验条件进行试验。

室温下 Taq DNA 聚合酶有一定的活性，为避免发生非特异性扩增，请于冰上配置反应体系，并且最后添加 Taq DNA 聚合酶或模板 DNA。

挑取菌落时，应选择单菌落，不要挑取太多菌体，以免影响 PCR 结果。