

2×GC-Rich PCR Mix

产品组成

Cat. No.	7006100	7006500
2×GC-Rich PCR Mix	1 ml	1 ml×5
GC-Rich Buffer	0.5 ml	0.5 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℃保存有效期为两年以上；2~8℃保存，有效期为6个月。反复冻融16次不影响使用效果。

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×GC-Rich PCR Mix 是一种优化的两倍浓度的 PCR 预混合液。适用于保真性要求高、扩增片段长、GC 含量高的 PCR 扩增。特别配置的 GC-Rich Buffer 最高能扩增 GC 含量达 81%，长度达到 10 kb 的 DNA 片段。产品使用方便，只需要取 0.5 倍 PCR 体系体积的 2×GC-Rich PCR Mix 和适当 GC-Rich Buffer，加入引物和模板，以 ddH₂O 补足体积即可。

2×GC-Rich PCR Mix 中含 Taq 酶和一定比例的 Pfu 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。产品含红色和黄色两种电泳指示染料。两者不会抑制 PCR，也不会影响 EB 显色，其电泳相对迁移距离见表 1：

表 1：琼脂糖凝胶浓度与染料相对迁移距离

凝胶浓度	红色染料	黄色染料
0.8%	2000bp	~80 bp
1.0%	1500bp	~40 bp
1.5%	1000bp	~20 bp
2.0%	500bp	<10 bp
2.5%	350bp	<10 bp
3.0%	200bp	<10 bp

PCR 体系成分

1. 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) PCR 清洁试剂盒(Cat. No.2101050)对模板 DNA 进行纯化及浓缩。经新景(Simgen) PCR 清洁试剂盒纯化后的模板使用量可多至 PCR 反应体系体积的 1/2。
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：

人基因组 DNA：0.05 μg~0.5 μg/50 μl PCR 反应体系

大肠杆菌基因组 DNA：10 ng~100 ng/50 μl PCR 反应体系

λ DNA：0.5 ng~5 ng/50 μl PCR 反应体系

质粒 DNA：0.1 ng ~ 10 ng/50 μl PCR 反应体系

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。

3. 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。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

1. 预变性：一般预变性为 94℃，1~5 min。变性温度过高或时间过长都会损失 Taq 酶的活性。
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℃ (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： $Tm = 2^{\circ}C \times (A+T) + 4^{\circ}C \times (G+C)$ 。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 500 bp/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 5~10min，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。
5. GC-Rich Buffer 的用量：当 2×GC-Rich PCR Mix 和 GC-Rich Buffer 的使用比例在 2:1 时，可扩增 GC 含量达 81% 的 DNA 片段，但扩增物产量并非最高。用户可以根据扩增片段的 GC 含量适当减少 GC-Rich Buffer 的用量，以获得更高的扩增产物量。

操作步骤

1. 将 2×GC-Rich PCR Mix、GC-Rich Buffer、ddH₂O、模板 DNA 和引物室温解冻，置于冰上。
2. 将解冻后的各个组分上下翻转混合均匀，按下列组成配制 PCR 反应体系：

2×GC-Rich PCR Mix	20 μl
GC-Rich Buffer	10 μl
Primer 1 (10 μM)	1 μl
Primer 2 (10 μM)	1 μl
模板	n μl
ddH ₂ O	(8-n) μl
Total	40 μl

注意：

* 上述例子是 Hi-GC Buffer 的最大用量，用户可根据实际情况适当减少 Hi-GC Buffer 的用量。

* 上述例子为 40 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。

3. 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。
4. PCR 反应循环设置举例

94℃ 3 min

94℃ 30 sec
 ※55℃ 30 sec
 § 72℃ 1 min

30 Cycles

72℃ 5 min

※以实际最佳退火温度为准。

§ 以500bp/min计算。

5. 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