

## 2 × FastTaq Premix (with dye)

#21411

Version 15.1.1

### ■ 产品简介

2 × FastTaq Premix (with dye)是一种包含 PCR 反应所需 FastTaq DNA 聚合酶、buffer、dNTP Mixture 以及稳定剂等组分的预混液。使用时,只需在本产品中加入模板和引物即可进行 PCR 反应,大大简化了操作过程,降低了 PCR 操作过程中污染的风险。针对片段长度不超过 1.5 kb 的目标 PCR 产物,本产品支持 1 sec 超快 PCR 延伸程序 (72°C 延伸程序仅需设置为 1 sec)。

### ■ 产品组成

组分	21411-01	21411-02	21411-03
2 × FastTaq Premix (with dye)	5 × 1 mL	2 × 21411-01	10 × 21411-01

- 预混液置于-20°C 保存,避免反复冻融。
- 组分中已包含染料,扩增产物可直接用于电泳检测。

### ■ 保存条件

-20°C 储存, ≤ 0°C 运输。

### ■ 实验流程

#### 1. 冰上配制反应体系

组分	体积
2 × FastTaq Premix (with dye)	25 μL
Primer 1 (10 μM)	2 μL
Primer 2 (10 μM)	2 μL
Template DNA <sup>a</sup>	x μL
ddH <sub>2</sub> O	Up to 50 μL

- FastTaq DNA 聚合酶在室温下也有一定的反应活性,在冰上配制可以减少准备过程中发生的非特异扩增,提高反应的特异性。

a. 针对不同来源或类型的模板,所需的反应浓度不同,下表为 50 μL 反应体系推荐模板使用量:

模板种类	推荐模板使用量
动植物基因组 DNA	0.1-1 μg
大肠杆菌基因组 DNA	10-100 ng
cDNA	1-5 μL (不超过 PCR 反应总体积的 1/10)
质粒 DNA	0.1-10 ng
λDNA	0.5-10 ng

## 2. 反应程序

Stage	程序	温度	时间	循环数
Stage 1	预变性	95°C	5 min	1 cycle
Stage 2	循环反应	95°C	30 sec	30-35 cycles
		56°C	30 sec	
		72°C	30 sec/kb 或 1 sec(1 sec 延伸仅适用于 ≤1.5 kb 的目标片段)	
Stage 3	彻底延伸	72°C	5 min	1 cycle

• 退火温度需根据引物和模板实际的 GC 含量调整。

### ■ 引物设计

1. 引物长度约 15-30 个碱基，引物 3'端最后一个碱基最好为 G 或者 C。
2. 引物的 GC 含量控制在 40%-60%之间，Tm 值调整至 55-65°C 为佳，若模板本身 GC 含量过高或过低，30%-80%也可。
3. 上下游引物 GC 含量不宜相差过大，Tm 值相差不超过 1°C 为佳，引物与模板非配对序列，不应参与引物 Tm 值计算。
4. 引物中四种碱基 (A、G、C、T) 随机分布，可降低引物与模板相似性，避免出现聚嘌呤或聚嘧啶。
5. 引物自身及引物之间不应存在连续的互补序列 (5 个碱基)，引物 3'端避免出现发夹结构。
6. 引物设计好后，可对其进行 blast 检测确定是否有非特异性扩增，NCBI 或 SnapGene 等可实现该功能。
7. 各种模板的引物设计难度不一，对于模板本身比较复杂的 (如 GC 含量或 AT 含量过高)，引物设计应退而求其次，尽量满足以上条件即可。