

2× pfu PCR Master Mix

含染料	PT202-01	PT202-02
2× pfu PCR Master Mix	1 ml	5×1 ml
diH ₂ O	1 ml	5×1 ml

不含染料	PT203-01	PT203-02
2× pfu PCR Master Mix	1 ml	5×1 ml
diH ₂ O	1 ml	5×1 ml

● 储存条件

-20°C长期保存；反复冻融16次不影响使用效果；如果频繁使用，建议储存于4°C。

上海莱枫生物科技有限公司

www.lifefeng.com

电话：021-64810180 传真：021-54252754

技术支持：13817902990(上海)

● 产品简介

2× pfu PCR Master 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和模板GC含量高和扩增片段较短（小于2kb）的PCR。

PCR增强剂和蛋白稳定剂协同提高了PCR效率和灵敏度，非常适合低拷贝模板扩增。

产品使用方便，只需要取0.5倍PCR体系体积的2× pfu PCR Master Mix，加入引物和模板，以diH₂O补足体积，可减少加样误差。产品分为含染料（目录号：PT202）和不含染料（目录号：PT203）两种，含染料的产品反应结束后可以直接电泳。

● 产品主要成分

0.1 U/μl pfu DNA Polymerase
0.4 mM each dNTPs
2× pfu Buffer
红色和黄色两种指示染料(目录号：PT202)
PCR增强剂和蛋白稳定剂

△ pfu DNA Polymerase

具有3'→5'外切酶活性，能切除延伸过程中嵌入的错配碱基。其PCR产物为平末端，可直接连接到平末端克隆载体，或者末端加A处理后再与TA载体连接。

△ 2× pfu Buffer

2× pfu Buffer含KCl, (NH₄)₂SO₄, 4mM Mg SO₄, Tris-HCl, pH 8.8(25°C)。

△ 指示染料

目录号：PT202含红色和黄色两种电泳指示染料。两者不会抑制PCR，也不会抑制酶切和连接等下游酶反应，不会影响EB显色，其电泳相对迁移距离见表1：

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

染料会干扰OD检测。如果PCR产物不做纯化而直接检测OD，请使用目录号：PT203。

● 质量控制

经检测无外源核酸酶活性，PCR方法检测无宿主DNA残留，能有效扩增人类基因组中的单拷贝基因。

● 使用方法

1. PCR成分准备

将2× pfu PCR Master Mix、模板DNA和引物室温解冻，置于冰上。**Mix解冻后需上下翻转混合均匀。**

2. PCR反应液配制(以50 μl PCR体系为例)

在冰上将以下各成分加入PCR反应管：

模板DNA	*
Primer1 (10 μM)	1 μl
Primer2 (10 μM)	1 μl
2× pfu PCR Master Mix	25 μl
diH ₂ O	补充至50 μl

* 请参考● PCR体系成分△ 模板DNA用量。

注意：尽可能使用合适精度的加样器，并且避免加样体积小于1 μl (可适当比例稀释后加样)。

3. 手指轻弹PCR反应管充分混匀，简短离心。

4. PCR反应循环设置举例

94°C	3 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
55°C※	30 sec	
72°C	2 min §	
72°C	5 min	

4°C soak

※以实际最佳退火温度为准。

§以0.5 kb/min计算。

● PCR体系成分

△ 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、苯酚)、高浓度盐(KAc、NaAc、辛酸钠等)和高浓度EDTA等。这些杂质可通过乙醇或异丙醇沉淀后用66-70%乙醇洗涤两次去除，大部分商品化的核酸纯化试剂盒可有效去除这些杂质。

磷酸盐能螯合Mg²⁺，DNA提取和纯化过程中很难彻底去除，因此不推荐使用PBS等磷酸盐缓冲液作为模板DNA提取试剂。

来源于样品的难以去除的PCR抑制剂，包括肝素、腐植酸、植物酸性多糖等，应使用合适的提取和纯化方法。

高纯度、高浓度的DNA作为PCR模板是最理想的。高浓度DNA可通过稀释减少干扰PCR的成分。

cDNA作为模板时，应考虑模板中高浓度盐离子(尤其是缓冲体系和游离Mg²⁺)，一般不超过PCR体积的10%。

关于模板DNA溶解或者洗脱使用去离子水或者TE：

去离子水为弱酸性，不利于DNA的洗脱，也不利于DNA的稳定保存。

TE常见的组成成分为：10 mM Tris, pH 8.0(25°C), 0.1 mM EDTA，有利于DNA的长期稳定保存，其中EDTA能螯合Mg²⁺，通常模板用量不超过PCR体积的20%，不用考虑EDTA对PCR的干扰。如果模板用量占PCR体积比例较大，建议将TE稀释10倍后溶解或者洗脱DNA。

△ 模板DNA用量

为保证反应的效率和特异性，模板DNA终浓度应小于10 ng/μl。引物与模板DNA(尤其是低拷贝模板)有很多非特异性结合位点，不一定会产生非特异性扩增产物，但在PCR初期会大量消耗引物，因此降低PCR效率。

PCR产物作为模板，包括二次PCR和重叠PCR，不存在引物与模板的非特异性结合大量消耗有效引物的情况，因此PCR效率非常高，需大比例稀释后作为模板，并且需要严格控制循环数。

极微量的样品可以作为PCR模板，但**为了保证反应的灵敏性，25 μl体系使用10⁴拷贝的靶序列作为模板**；可参考表2计算需加入PCR体系的模板量。

表2：1 μg各种来源的DNA对应的摩尔数

1 μg DNA	mol
1 kb线性双链DNA	9.18×10 ¹¹
3 kb质粒DNA	2.9×10 ¹⁰
Lambda (λ) DNA	1.9×10 ¹⁰
E.coli基因组DNA	2.0×10 ⁸
人类基因组DNA	3.0×10 ⁵

例如：纯化的人类基因组DNA浓度为1 μg/μl，某基因在人类基因组中拷贝数为10，其单位体积拷贝数为：
3.0×10⁵ mol/μg × 1 μg/μl × 10 copy/mol = 3.0×10⁶ copy/μl
1×10⁴ copy/ (3.0×10⁶ copy/μl) = 1/300 μl
即：1/300 μl浓度为1 μg/μl的人类基因组DNA(3.3 ng)中含10⁴拷贝该基因，稀释300倍后加1 μl至25 μl PCR体系。

表3：25 μl PCR体系特定模板用量

特定模板	25μl PCR体系用量
cDNA	<2.5 μl (<10%PCR体系体积)
PCR产物	用TE # 稀释100~10000倍后，1 μl
菌液	直接使用1 μl菌液
菌落	枪头接触菌落，在PCR管中吹打数次

△ 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，引物过少可能会降低扩增效率。

△ dNTPs

dNTPs应少量分装，减少反复冻融。需特别注意dCTP会缓慢水解为dUTP，后者是pfu酶的抑制剂，还会导致A→G突变。dNTPs反复冻融和过多循环数(高温条件)都会加剧dCTP水解。

常规PCR中dNTPs使用终浓度为0.2 mM(each)，浓度过低会减少PCR产物的产量；浓度过高会因dNTP上的磷酸根螯合Mg²⁺降低游离Mg²⁺浓度而抑制PCR，如需调整dNTPs浓度，需同时调整Mg²⁺，使游离Mg²⁺为0.7 mM。

● PCR参数设置

△ 预变性

一般预变性温度为95°C，不同种类模板建议使用预变性时间见表4：

表4：各种模板建议使用的预变性时间

模板种类	预变性时间
直接PCR(比如菌液、毛囊)	10-15 min
超螺旋质粒DNA	5-10 min
基因组DNA	3-5 min
cDNA或者PCR产物	10秒

变性温度过高或时间过长会造成模板DNA的断裂和水解，降低PCR效率。

△退火温度：PCR的关键参数

初次使用一对引物时可尝试低于Tm 5°C作为退火温度(如果两条引物Tm不同，参考较低的Tm)。

使用oligo软件计算引物的Td值，以低于Td值4°C作为退火温度。Td值的计算方法考虑了引物邻近碱基组成和引物3'末端与模板配对的稳定性，因此更具有参考意义。

退火温度偏高不利于引物与模板的结合，会降低PCR效率。退火温度偏低，会增加引物之间、引物与模板的非特异性结合，降低了引物与模板特异性结合的概率，从而降低了PCR效率，最不利的情况是产生大量引物二聚体和非特异性扩增。

最佳退火温度需要进行梯度PCR确定。

如果最佳退火温度为68°C-78°C，可以省略延伸步骤，即合并退火和延伸步骤。

△延伸

延伸温度通常为72°C，延伸时间以0.5 kb/min计算，时间过长可能会增加非特异性扩增。延伸时间过短，相对有利于引物二聚体的扩增。

循环结束后，继续延伸5~10 min，以获得完整的双链产物。

△循环数：非常重要的PCR参数，切勿盲目引用文献参数。循环数过多可能会减少目的产物。PCR过程中不完全延伸和高温断裂，会缓慢积累随机3'末端。产生大量PCR产物后，引物被大量消耗，PCR产物3'末端和随机3'末端与变性模板的非特异性结合相对占优势，出现了随机扩增；dNTP大量消耗导致游离Mg²⁺浓度增高，也加剧了随机扩增。随机扩增产物电泳为涂抹带，随着循环数的增加随机扩增产物长度会不断延长，甚至电泳时积累在加样孔，而目的PCR产物会逐渐减少，甚至消失。

循环数过多会产生大量气溶胶，可能会污染同次PCR其他反应管，造成假阳性。例如单独做空白对照无目的产物，而与阳性样品平行PCR时，空白对照出现了目的产物。

莱枫PCR系列产品PCR效率通常会高于其他公司同类产品，应特别注意控制循环数，建议参考表5使用合适的循环数。

最佳循环数与模板DNA种类、拷贝数、纯度和加样量，退火温度，PCR试剂等各种因素有关。

摸索最佳循环数：配制大体积PCR体系，分装到3-5个PCR反应管，使用较低的循环数取出一管(例如，PCR

产物为模板进行10个循环)，预变性时间设为10秒，再进行3-5个循环，以此类推，最后平行电泳。

表5：各种模板建议使用的循环数

模板种类	循环数
1. PCR产物	10-20
2. 质粒DNA	15-25
3. 菌液、菌落PCR克隆鉴定	20-25
4. 高拷贝模板	15-20
5. 多拷贝模板	15-25
6. 低拷贝模板	25-35
7. 痕量模板	30-40

1. PCR产物：二次PCR或者重叠PCR。
2. 质粒DNA：通用引物建议使用15-25个循环，如扩增高GC区需增加循环数。
3. 菌液、菌落：通用引物建议使用20-25个循环。
4. 高拷贝模板：基因组上高度重复序列，几百-几百万个拷贝，例如真核生物rRNA和某些tRNA基因。
5. 多拷贝模板：基因组上轻度和中度重复序列，例如真核生物actin、globulin等内参基因，原核生物rRNA和某些tRNA基因；高丰度mRNA逆转录产物，例如actin、globulin等内参基因。
6. 低拷贝模板：基因组上单一序列，大部分功能基因为单拷贝。低丰度mRNA逆转录产物。
7. 痕量模板：模板总量为ng级或更低；因断裂或降解导致有效模板量少，比如血浆游离DNA、石蜡包埋组织中单拷贝基因。

●提高PCR特异性的方法

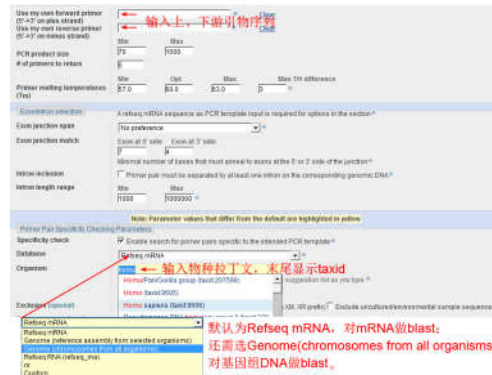
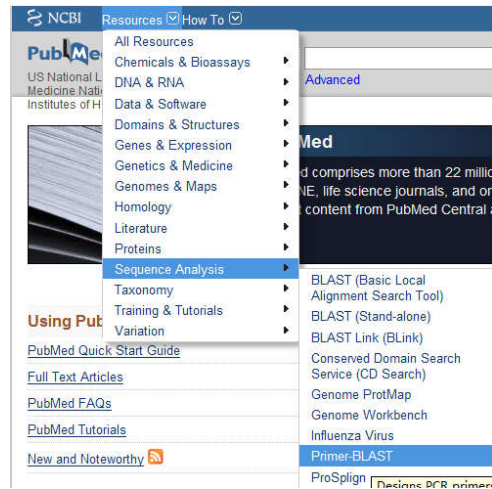
△使用适量的模板DNA

模板量偏多或者偏少都可能产生非特异性扩增，请参考●PCR体系成分△模板DNA用量。

△Blast

对引物进行Blast验证是非常有必要的，有时候非特异性扩增是因为引物设计不合理造成的。

cDNA除了对mRNA Blast之外，还需要对Gemome做Blast，没有任何RNA提取和纯化方法能彻底去除DNA，非特异性扩增也可能是来自基因组DNA。



△递减PCR(Touch Down PCR)

PCR起始的几个循环使用严紧的退火条件。虽然扩增效率低，但靶序列特异性最高，被优先扩增，其产物在后续循环中继续占优势，从而提高特异性。

退火温度从高于Tm(或者Td) 5°C开始，每个循环递减，直到低于Tm(或者Td) 5°C；一般用10个循环，每个循环降低1°C。之后用低于Tm(或者Td) 5°C作为退火温度，再进行15-25个循环。

△巢式PCR(Nested PCR)

用两对引物进行两次PCR。第一对引物(外引物)从多个靶位点扩增产生特异性和非特异性产物。第二对引物(巢式引物)位于第一对引物内侧，只能与第一次PCR产生的特异性产物互补(因为同时能与两对引物互补的非特异序列极少)。即：第一次PCR产生的特异性产物在第二次PCR中占绝对优势被扩增。

●常规PCR污染和防治

1. 气溶胶污染

PCR过程中会产生气溶胶，即PCR产物从PCR管中蒸发污染同次PCR的其他反应管、PCR仪和局部空间。如果PCR仪盖热效果差、PCR管盖子密封性差或者PCR管在高温时变形，气溶胶污染会更严重。

使用合适的循环数能避免同次PCR产生的气溶胶污染其他反应管，例如某些高拷贝模板使用20个循环目的产物已经足够多，空白对照和阴性样品未出现目的产物，而使用30个循环目的产物的量没有明显的变化或者反而减少，而空白对照和阴性样品出现目的产物(假阳性)。

使用同一种引物在同一台PCR仪连续进行PCR，上一次PCR残留的气溶胶容易污染下一次PCR样品。**高温条件下DNA会断裂和水解，以此可以消除PCR仪内气溶胶污染**；使用不同的引物交叉进行PCR，或将PCR仪空运行95-100°C半小时，再进行PCR。

吸取PCR产物的移液器中有大量气溶胶污染，因此配制PCR体系与PCR产物电泳需分别使用专用的移液器。

气溶胶也可能存在于PCR仪周围或电泳槽附近，因此尽可能将PCR样品准备场所远离PCR仪和电泳槽。

2. 不良操作习惯造成的污染

手指或者手套污染离心管盖子 应特别注意离心管开盖和使用枪头吸取样品或者试剂时造成的污染，左图为1.5 ml普通离心管，箭头所指处为可能的污染源。

移液器插入离心管污染离心管内壁 使用螺口冻存管能避免离心管盖子上的污染；使用加长的10-20 μl枪头能避免移液器带来的污染。

3. 加样器、实验器材和容器等去除污染的方法

A. 1%盐酸或者次氯酸浸泡半小时以上，尤其是次氯酸的氧化性也会使DNA断裂。适合处理手术剪、刀片、玻璃和塑料容器等。

原理：DNA在酸性环境中水解、脱嘌呤

B. 湿热高压。移液器和塑料器材需询问厂家能否高压。酒精灯炙烤。适合处理手术剪和刀片。

原理：DNA在高温条件下水解、断裂

C. 紫外照射。去除DNA污染不彻底，但适合处理房间或者操作台等空间场所。

原理：紫外照射下DNA形成嘧啶二聚体