

2×GC Buffer

KM111 1ml

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KM111
2×GC Buffer	- 20°C	1ml

本试剂储存在 - 20°C内 12 个月不影响使用效果。

产品介绍:

1. 本产品能和各种 PCR 酶配合使用, 能够扩增具有复杂二级结构模板。
2. 使用 GC Buffer 进行扩增时, 建议使用 TM 值较高的引物。引物最好设计在 30mer 左右。
3. GC Buffer 对 DNA 变性效果较强, 一般 GC 含量低于 50%的目的片段, 不推荐使用 2*GC Buffer 进行扩增。

使用说明:

1. 按照下表在0.2ml PCR 管中制备反应体系:

成分	20 μ L 反应体系	25 μ L 反应体系	50 μ L 反应体系	终浓度
模板	0.05-0.5ug	0.05-0.5ug	0.1-1ug	
引物 1(10 μ M)	0.4 μ L	0.5 μ L	1 μ L	200nM
引物 2(10 μ M)	0.4 μ L	0.5 μ L	1 μ L	200nM
2*GC Buffer	10 μ L	12.5 μ L	25 μ L	
dNTP Mixture(10mM)	0.4 μ L	0.5 μ L	1 μ L	200 μ M
Taq (5U/ μ L)	0.2-0.5 μ L	0.25-0.5 μ L	0.5-1 μ L	2.5-5U
双蒸水	up to 20 μ L	up to 25 μ L	Up to 50 μ L	

2. 混匀后, 离心快用将反应液收集到管底。
3. PCR仪如果没有热盖的话, 补加25 μ L矿物油。
4. PCR仪上执行以下程序:

二步法:

步骤	温度	时间	循环数
初始变性	94 $^{\circ}$ C	5min	1
变性	94 $^{\circ}$ C	30 sec	25-40*
退火和延伸	68 $^{\circ}$ C	1min/kb	
最后延伸	72 $^{\circ}$ C	5min	1

PCR 反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。在实际操作中需根据模板、目的片段的大小、碱基序列和引物长短等具体情况, 设定最佳的反应条件 (温度、时间等)。

注意事项

1. GC 含量推荐使用 Oligo 软件分析片段的 GC 含量。
2. 2*GC Buffer 可以扩增 GC 含量正常的模板, 但有时可能会降低扩增效率。
3. 2*GC Buffer 可以兼容大多数 PCR 酶, 可以根据片段长度以及保真性要求选择不同的酶。
4. 由于片段 GC 含量高, 引物的 T_M 值往往会比较高, 在 PCR, 退火温度和延伸温度差距较小时, 比如退火温度超过 60 摄氏度时, 退火温度和延伸温度可以设成同一数值, 一般为 68 摄氏度。