



2×UKOD Master Mix（含蓝色染料）

产品组成：

产品名称	MT220	MT220-01
2×UKOD Master Mix（含蓝色染料）	100 μl	1 ml
ddH ₂ O	1 ml	1 ml

保存：-20℃ 保存

产品简介：

UKOD 酶是在 KOD 酶基础上进行改良的高保真酶，在具有高保真性·高扩增效率的改良型 UKOD 中，通过引入延伸增强技术，在维持高保真性的同时，实现了延伸时间 **5 sec./ kb** 的高速 PCR。此外，在兼具高成功率的同时，对粗样品、含尿嘧啶的模板以及使用含次黄苷（dI）或尿嘧啶（dU）引物的模板也可以进行扩增。本品含有能抑制 Polymerase 活性与 3'→5' Exonuclease 活性的两种抗体，可进行高特异性的热启动 PCR。

2×UKOD Master Mix（含蓝色染料）是一款含有 Loading Dye 预混液，其中已包含 UKOD DNA Polymerase、dNTP 和 Mg²⁺等 PCR 反应的必需组分。只需加入模板和引物，即可进行扩增，从而减少移液步骤，便于操作。本产品扩增产物为平末端产物。

产品特点：

1. 可进行高速 PCR

扩增 1 kb 以下的目的片段时，延伸时间可设为 1 sec.。扩增 1~10 kb 的目的片段时，延伸时间可设为 5 sec./1 kb。相比以往试剂可大幅度缩短 PCR 的反应时间。也可将延伸时间设得更长，从而可以在同一循环内扩增多种长度的目的片段。

2. 简便

本试剂中包含所有除引物、模板以外的其他 PCR 组分，便于操作的同时也提高了实现结果的重现性。另外，2×UKOD Master Mix（含蓝色染料）中已含有 Loading Dye，反应结束后，可直接点样进行凝胶电泳。

3. 高保真性

UKOD DNA Polymerase 的保真性约为 Taq DNA polymerase 的 80 倍。长目的片段也可以迅速且高保真性地扩增。以人基因组 DNA 为模板可扩增 40 kb 的片段，扩增产物可用于多种用途。

4. 可扩增粗样品

因添加了延伸增强剂，提高了扩增效率，对于含有 PCR 抑制物的粗样品（组织样品、土壤提取物、食品等）可以省去核酸提取步骤，直接进行目的基因的扩增。

5. 含有次黄苷、尿嘧啶的引物和模板

常规高保真性 PCR 酶会将次黄苷或尿嘧啶识别为碱基的错配，并且阻碍反应进行。本品使用不受次黄苷或尿嘧啶影响的改良型 UKOD DNA polymerase，可以进行该种类型的扩增。

PCR 扩增方法：

1. 体系配制

组分	体积	终浓度
2×UKOD Master Mix（含蓝色染料）	25 μl	1×
引物 F（10）	1.5 μl	0.3 μM
引物 R（10）	1.5 μl	0.3 μM
模板	X μl	基因组 DNA：0.1 ng~200 ng 质粒 DNA：1 pg~50 ng cDNA(RNA 当量)：1 ng~750 ng 活体样本-粗抽提液：1 μl~5 μl
ddH ₂ O	To 50 μl	

注：（1）组分加入完成需混合均匀后再放置于 PCR 仪。

（2）引物浓度推荐 0.3 μM（终浓度），但扩增 10 kb 以上的片段时，引物浓度为 0.15 μM（终浓度）时可提高扩增产物量。另外，检测灵敏度较差时，将引物浓度提高至 0.5 μM（终浓度）可能会有改善。

2. PCR 循环

为验证合适的退火温度，推荐使用三步法循环：

变性	98℃	10 sec.	25-45 cycle
退火	(T _m -5) °C	5 sec.	
延伸	68℃	1-10 sec./kb	

延伸时间请根据目的片段长度参考以下方法进行设定：

目的片段长度	建议延伸时间
1 kb 以下	1 sec
1~10 kb	5 sec / kb
10 kb	10sec / kb

注：（1）有些 PCR 仪器可能无法设定为 1 sec.的延伸时间。扩增量少时，请设定为 5 sec。

（2）如果模板起始量较少或用粗样品进行扩增时，请按 10 sec./kb 进行设定。

退火（Annealing）温度请按引物的 T_m - 5 °C 进行设定。T_m - 5 °C 超过 68℃ 时，请按 68℃ 设定。

DNA 变性（Denaturation）推荐 98℃, 10 sec.。94℃ 进行变性时，请设为 15 sec.。

三步法循环有非特异性条带或弥散时，请尝试两步法或 Step down 方法。可能会提高扩增特异性和检测灵敏度。

两步法循环：

变性	98℃	10 sec.	25-45 cycle
延伸	68℃	5-10 sec./kb	

Step down 循环：

变性	98℃	10 sec.	5 cycle
延伸	74℃	5-10 sec./kb	
变性	98℃	10 sec.	5 cycle
延伸	72℃	5-10 sec./kb	
变性	98℃	10 sec.	5 cycle
延伸	70℃	5-10 sec./kb	
变性	98℃	10 sec.	15-30 cycle
延伸	68℃	5-10 sec./kb	

进行两步法或 Step down 方法时，延伸时间请参考三步法进行设定，目的片段长度在 1 kb 以下时，请设定为 5 sec。

3. 模板使用量

（1）使用提纯的模板、cDNA 时，请按照下表进行添加。（50 μl 反应体系）

模板来源	添加量范围	推荐的模板量
真核生物的 gDNA	1~200 ng	50 ng
原核生物的 gDNA	0.1~200 ng	10 ng
Plasmid DNA	1 pg~50 ng	10 ng
cDNA	1 ng~750 ng (RNA 相当量)	50 ng (RNA 相当量)
λDNA	10 pg~10 ng	1 ng

模板的长度或纯度对 PCR 结果有很大的影响。模板起始量多时，推荐预先进行电泳确认模板质量。RNA 混入量较多时，可能会抑制 PCR 反应。

使用逆转录反应液为模板时，逆转录反应液中过剩的 RNA 会抑制 PCR 反应。请确保 50 μl PCR 反应液中 RNA 的量小于 750 ng。