



1.1×KT4 Fidelity PCR Mix(dye-)

目录号

MG-PR-02

产品组成

组分	规格
1.1×KT4 Fidelity PCR Mix(dye-)	5×1.125 mL

保存条件

-20℃保存 24 个月。

产品简介

本产品为 1.1×即用型快速 PCR 预混液，内含 KT4 Fidelity DNA polymerase、dNTPs 以及优化的缓冲体系，只需添加引物和模板即可进行扩增，可有效扩增 5 kb 以内的 DNA 片段。该酶具有 5' → 3' 聚合酶活性和 3' → 5' 外切酶活性，扩增产物为平末端，可直接用于平末端克隆。

产品特点

- ◇ 操作简单：1.1×即用型预混液，无需添加 ddH₂O，最大程度地减少实验步骤；
- ◇ 极快的延伸速度：10~15 s/kb；
- ◇ 超高的耐热性能：98℃热处理 1 h 后聚合酶活性无明显变化。
- ◇ 高保真：保真度为野生型 Taq 酶的 30 倍；

适用范围

本产品适用于以试剂盒提取的基因组 DNA、cDNA 和质粒 DNA 的 PCR 扩增，如基因鉴定、基因克隆等实验。

注意事项

1. 本产品为 1.1×PCR 预混液，无需额外添加 ddH₂O。每次反应中该产品用量至少应占到总反应体积的 85%，50 μL 体系至少使用 43 μL PCR Mix，25 μL 至少使用 21 μL PCR Mix；
2. PCR Mix 应避免反复冻融，短期内多次使用可置于 4℃保存；
3. 请使用高质量的模板进行扩增，如试剂盒提取的基因组 DNA。请勿使用 dUTP 或含尿嘧啶的引物与模板。

使用方法

本产品仅供科研使用



操作示例

按下表配制 PCR 反应体系（冰上操作）

组分	25 μL 体系	50 μL 体系	终浓度
1.1×KT4 Fidelity PCR Mix(dye-) ^a	21~22 μL	43~45 μL	1×
Primer 1 (10 μM) ^b	1.0 μL	2.0 μL	0.4 μM
Primer 2 (10 μM) ^b	1.0 μL	2.0 μL	0.4 μM
Template DNA ^{*c}	1~2 μL	1~3 μL	

- a. 当需要加入较多的模板时，可相应调整本产品用量，但本产品占比不可低于总体系的 85%，Mix 含量过低会降低扩增效率。本产品推荐 45 μL/50 μL 扩增体系；
- b. 引物终浓度范围为 0.2~0.8 μM，推荐 0.4 μM，过少的引物会导致扩增失败或产量极低，过量的引物会增加错配的可能性，导致非特异性扩增；
- c. 模板推荐量：
试剂盒提取的基因组 DNA：50~500 ng；
质粒、噬菌体 DNA：0.05~1 ng；
cDNA：推荐将反转录产物原液稀释 5~10 倍后，取 1~2 μL 作为模板。
(注：过量的模板会导致非特异性扩增，过少的模板易导致 PCR 扩增效率低。)

建议的 PCR 条件

步骤	温度	时间	循环数
预变性 ^a	98℃	2 min	1
变性	98℃	10 s	30~35 cycles ^f
退火	Tm ^b	10~15 s ^c	
延伸	72℃ ^d	10~15 s/kb ^e	
终延伸	72℃	1~5 min	1
	4℃	Hold	-

- a. 预变性：扩增较长的片段时，建议使用 95℃ 5 min 预变性处理防止对 DNA 造成额外的损伤；
- b. 退火温度：参考引物 Tm 值，最适退火温度与引物间的平均 Tm 值相近，若引物间 Tm 值偏差较大，建议退火温度设置为引物中 Tm 较小值+1~2℃；
(注意：若引物上添加有与模板不匹配的碱基序列，如酶切位点、同源臂等，PCR 程序设置 退火温度时，仅需计算与模板特异性匹配的引物序列的 Tm 值。)
- c. 退火时间：对于含兼并引物、复杂模板的扩增，建议退火时间延长至 30 s；
- d. 延伸温度：通常为 72℃，可根据实际需求在 68~75℃范围内调整；
- e. 延伸时间：常规模板推荐设置为 10~15 s/kb，复杂模板可以将延伸速度增加至 20~30 s/kb；略微增加延伸时间有利于提高长片段、低浓度、复杂模板的 PCR 产量，但总延伸速度不超过 30 s/kb；
- f. 循环数：30 个循环可满足大部分扩增需要，循环数过多易导致非特异性扩增，若扩增条带较弱，可将 循环数增加至 35~40 个。

常见问题与解决办法

本产品仅供科研使用



Q1：扩增无产物或产物量少？

A1：

- 1) 模板降解或模板纯度差。电泳检测模板质量，使用高质量模板；
- 2) 模板浓度过低。适当增加模板用量；
- 3) 引物不合适。优化引物设计；
- 4) 退火温度不合适。设置退火温度梯度，摸索合适的退火温度；
- 5) 循环数过少。适当增加 5~10 个循环；
- 6) 延伸时间不足。复杂模板可适当增加延伸速度至 20~30 s/kb。

Q2：扩增出现非特异条带或弥散带？

A2：

- 1) 引物特异性差。优化引物，避免非特异性条带以及引物二聚体的扩增；
- 2) 引物浓度过高。降低引物浓度；
- 3) 模板过量或纯度差。减少模板量，使用高质量模板；
- 4) 退火温度过低。适当提高退火温度或使用 Touchdown PCR 程序；
- 5) 循环数过多。减少循环数至 25~30 cycles。