



珀罗汀生物
PLD TECHNOLOGY

线性模板构建试剂盒 (适用于 pET 质粒)

苏州珀罗汀生物技术有限公司
Suzhou PLD Technology, Co., Ltd.

修订日期: 2024 年 2 月 23 日

目录

试剂盒组成、贮存、稳定性	2
注意事项	2
实验准备	2
实验操作步骤	3
实验可能出现的问题及解决方案	5

一. 试剂盒组成、贮存、稳定性

名称	体积 (10 次)
PCRMix1	90 μ L
PCRMix2	90 μ L

储存条件: -20 度, 避免反复冻融;

PCRMix1: 从 pET 质粒上扩增目的基因。

PCRMix2: 构建完整的线性表达模板。

二. 注意事项

操作时要带乳胶手套和眼镜, 避免沾染皮肤、眼睛和衣服, 谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时, 要立即用大量清水或生理盐水冲洗, 必要时寻求医疗咨询。

三. 实验准备

- 1、准备无核酸和核酸酶污染的 Tip 头、离心管。
- 2、将作为模板的 pET 质粒稀释至 1~10ng/uL 备用。

四. 实验操作步骤

A. 第一轮 PCR

第一轮 PCR, 取 9 μ L PCRMix1, 添加 1 μ L 含目的基因的 pET 质粒模板, 按标准程序进行 PCR 扩增 (延伸时间按目的基因大小加 100bp 计算), 扩增后的产物作为第二轮 PCR 的模板备用;

体系配制:

试剂	添加量
PCRMix1	9 μ L
模板质粒	1 ng (1 μ L)

- 注: PCR 的模板添加量为 2pg~2ng 质粒每 10 μ L PCR 体系;

PCR 扩增程序:

温度	时间	
98 $^{\circ}$ C	10s	
98 $^{\circ}$ C	10s	
55 $^{\circ}$ C	15s	30 cycles
72 $^{\circ}$ C	(1kb/min)	
72 $^{\circ}$ C	1min	
4 $^{\circ}$ C	forever	

B. 第二轮 PCR

第二轮 PCR，取 9 μ L PCRMix2，添加 1 μ L 第一轮 PCR 扩增后的产物（不用纯化），按标准程序进行 PCR 扩增（延伸时间按目的基因大小加 700bp 计算），扩增后的产物可直接作为 CFPS 反应的模板（加入量为无细胞蛋白表达反应终体积的 1/10），不需要额外纯化；

体系配制：

试剂	添加量
PCRMix2	9 μ L
第一轮 PCR 产物	1 μ L

PCR 扩增程序：

温度	时间	
98 $^{\circ}$ C	10s	
98 $^{\circ}$ C	10s	
55 $^{\circ}$ C	15s	30 cycles
72 $^{\circ}$ C	(1kb/min)	
72 $^{\circ}$ C	1min	
4 $^{\circ}$ C	forever	

五. 实验可能出现的问题及解决方案

问题	可能原因	解决方式
没有条带或条带很弱	扩增时间不够； 模板添加量不合适	按 1kb1 分钟设置延伸时间； 添加合适的模板浓度；



苏州珀罗汀生物技术有限公司

苏州工业园区界浦路69号维力医疗科创园1号楼302室

☎ 0512-67900128 ✉ sz_protein@163.com 🌐 www.cellfreeprotein.cn

