

2× PCR SuperPfu Master Mix

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

使用前充分混匀, -20°C 稳定储存 24 个月, 避免反复冻融。

产品编号	产品名称	产品规格
YFXM0006	2× PCR SuperPfu Master Mix	1mL/ 5×1mL
YFXM0007	2× PCR SuperPfu Master Mix-Dye	1mL/ 5×1mL

产品简介

本产品为即用型 2×超保真 PCR 预混试剂, 含有 SuperPfu 超保真 DNA 聚合酶、dNTPs、Mg²⁺、缓冲液等成分。

SuperPfu 超保真 DNA 聚合酶是在 pfu 基础上优化的超保真 DNA 聚合酶。具有 5'→3' DNA 聚合酶活性和 3'→5'的外切酶活性(即校读活性), 其保真度约相当于普通 Taq DNA 聚合酶的 80 倍; 具有极高的扩增效率, 其反应速度视模板复杂程度约为 15-30 s/kb; 具有超强的模板适应能力和扩增能力, 对于λDNA 模板可以保证 20kb 的扩增长度, 基因组模板可达到 10kb。

2×SuperPfu 超保真 PCR 预混液内已添加扩增促进因子, 使用时只需加入 DNA 模板和引物, 并用水补足体积即可, 最大限度地减少人为误差和降低污染几率。具有快速简便、灵敏度高、稳定性好等优点。适用于超保真扩增, 快速扩增, 如基因克隆、高通量测序、定点突变等。

本产品包含预混红色染料(货号 YFXM0007)和不含染料(货号 YFXM0006)两种形式, 使用含染料的产品在 PCR 反应结束后, 不需添加上样缓冲液即可直接进行电泳, 也可经过纯化处理, 用于酶切、连接、荧光测序等后续操作。

注意事项

- 1、所有组分应仔细混匀并离心后开启, 所有 PCR 操作过程应在冰上进行。
- 2、从低温取出后, Mix 管底可能会析出沉淀, 属于正常现象, 请充分解冻混匀后使用。
- 3、本产品扩增后的 PCR 产物经过纯化后, 可直接与平末端载体连接, 如果需要与线性 T 载体连接, 可进行纯化后, 对 PCR 产物的 3' 端添加 A 碱基。
- 4、高质量的模板可以提高扩增的成功率和产量, 尤其当进行长片段扩增时, 建议使用新鲜的高质量模板。
- 5、如遇到扩增效率较低时, 可适量提高模板量; 长片段扩增可通过设计长引物进行。

使用方法

1、PCR 反应体系 (具体操作中可根据实际反应体系, 按比例进行缩减)

组分	20 μ L 体系	50 μ L 体系
DNA 模板	X μ L	X μ L
正向引物 (10 μ M)	1 μ L	2.5 μ L
反向引物 (10 μ M)	1 μ L	2.5 μ L
2 \times PCR SuperPfu Master Mix	10 μ L	25 μ L
Nuclease-Free Water	补足至 20 μ L	补足至 50 μ L

注: 模板推荐用量如下 (20 μ L 和 50 μ L 反应体系的模板用量均在此范围内):

1) 目的 DNA \leq 10kb, 质粒或 λ DNA 的模板量为 1pg-10ng; 基因组 DNA 的模板量为 20ng-300ng; cDNA 的使用量为 1 μ L-2 μ L (不超过 PCR 反应体积的 1/10)。

2) 目的 DNA \geq 10kb, 质粒或 λ DNA 的模板量为 100pg-20ng; 基因组 DNA 的模板量为 100ng-500ng; cDNA 的使用量为 1 μ L-2 μ L (不超过 PCR 反应体积的 1/10)。

2、反应条件设置:

流程	温度	时间	循环数
预变性 ^a	98 $^{\circ}$ C	3-5min	
变性	98 $^{\circ}$ C	15s	
退火 ^b	50-72 $^{\circ}$ C	15s	25-35
延伸 ^c	72 $^{\circ}$ C	30s/kb	
终延伸	72 $^{\circ}$ C	5-10min	

在进行更长片段或者更复杂模板扩增时, 如上述程序仍不能有效扩增, 推荐使用下述梯度温度退火程序:

流程	温度	时间	循环数
预变性 ^a	98 $^{\circ}$ C	3-5min	
变性	98 $^{\circ}$ C	20s	
梯度退火	70-55 $^{\circ}$ C	30s	15 循环, 每循环降 1 $^{\circ}$ C。
延伸 ^c	72 $^{\circ}$ C	30s/kb	
变性	98 $^{\circ}$ C	20s	
退火	55 $^{\circ}$ C	30s	20
延伸 ^c	72 $^{\circ}$ C	30s/kb	
终延伸	72 $^{\circ}$ C	5-10min	

注:

a. 变性: 对于大多数模板, 推荐使用的初始预变性温度为 98 $^{\circ}$ C, 预变性时间为 3 min。当扩增目的片段 \geq 10 Kb 时, 可降低预变性温度至 95 $^{\circ}$ C, 并延长预变性时间至 5-10 min。

b. 退火: 请根据引物 T_m 值设置退火温度。退火温度与扩增特异性相关, 可通过适当地提高退火温度来提高扩增特异性。退火时间可在 10-30s 之间进行调节, 退火时间过长可能会导致琼脂糖凝胶电泳条带呈弥散状, 因此, 一般模板按照推荐的 15s 设置即可, 对于一些扩增困难的复杂模板可适当延长退火时间。

c. 延伸: 本聚合酶扩增时延伸速度约为 15-30s/kb, 可根据扩增产物的长度和模板的复杂性设置相应的延伸时间, 复杂性较低时 (例如: 质粒、 λ DNA) 可用 15 s/kb 的延伸时间; 复杂性较高的 DNA 模板, 延伸时间应为 30-60 s/kb; 有些 cDNA 模板, 延伸时间可以增加至 40s/kb。适当延长延伸时间可提高产物产量。

3、取 2-5 μ L 反应液电泳观察结果。