



1×sPfu MasterMix (purple)

产品信息:

| 组成 \ 货号 | MT212-01 | MT212-02 | MT212-03 |
|------------------|----------|----------|----------|
| 1×sPfu MasterMix | 1ml | 1ml×5 | 1ml×100 |

储存条件: -20℃保存。

制品说明:

1×sPfu 预混液中包含 sPfu DNA 聚合酶 (super Pfu DNA polymerase, sPfu), dNTPs, 染料及 PCR 反应所需的缓冲液, 是一种即用型 PCR 扩增试剂。使用时, 只需加入引物和 DNA 模板即可进行 PCR 扩增, 引物和模板的加入总体积可以在 1-10μl 间变动, 具有很强的可调性。该 PCR 预混液能节省实验时间, 避免了常规 PCR 试剂多次加样造成的实验污染。预混液本身含有染料, 扩增完成后可直接上样, 进行电泳检测。sPfu DNA 聚合酶为高保真酶, 具有扩增速度快, 产量高等特点。扩增产物为平末端。

产品用途: 高保真 PCR 扩增, 菌落 PCR, 平末端 PCR 产物扩增, RT-PCR。

PCR 扩增体系:

| 组成成分 | 25 μl 体系 | 50 μl 体系 |
|------------------|----------|----------|
| 上游引物 (10 μM) | 0.5μl | 1μl |
| 下游引物 (10 μM) | 0.5μl | 1μl |
| 模板DNA | 1-4μl | 1-8μl |
| 1×sPfu MasterMix | 补体积到25μl | 补体积到50μl |

1. 单个样本扩增时, 按左表中所列顺序添加其它成分。充分混匀后, 离心数秒使反应混合物沉到管底, 将反应管置于 PCR 仪中进行扩增。

| 组成成分 | 50 μl 体系 | ×10 |
|------------------|----------|-------|
| 上游引物 (10 μM) | 1μl | 10μl |
| 下游引物 (10 μM) | 1μl | 10μl |
| 1×sPfu MasterMix | 43μl | 430μl |
| 模板 DNA | 5μl | 50μl |

2. 多个样本扩增时, 可在一个离心管中混合引物和 1×sPfu MasterMix, 然后按比例分装。例如需要做 10 个 50μl 体系的 PCR 扩增, 每个样本的模板量需加 5μl, 按左表中所列的量混合引物和 1×sPfu MasterMix, 然后分 45μl 到每个 PCR 管中, 最后一一对应加入 5μl 待扩增的模板 DNA。离心数秒使反应混合物沉到管底, 将反应管置于 PCR 仪中进行扩增。

PCR 循环设置

| 循环步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|-------|--------|-------------|---------|
| 预变性 | 98℃ | 2 分钟 | 1 次 |
| 变性* | 98℃ | 5-10 秒钟 | 25-40 次 |
| 退火** | 50-72℃ | 10 秒钟 | |
| 延伸*** | 72℃ | 10-30 秒钟/kb | |
| 后延伸 | 72℃ | 5 分钟 | 1 次 |

*PCR 扩增时, 98℃变性持续时间可以设定 5-10 秒钟, 简单模板 5 秒钟, 复杂模板 10 秒钟。

**一般条件下, 可以采用如左表所列的三温度梯度循环的 PCR 扩增方法, 引物的退火温度为两条引物中较低 T_m-5, 引物的退火持续时间可以设定 10 秒钟。当两条引物的 T_m 值都大于等于 70℃时, 而且都使用了长引物, 可用两步法来扩增, 两步法中退火温度和延伸温度都为 72℃。

***延伸时间依赖于扩增产物的长度和复杂度。对于质粒, BAC 这类简单模板, 可用 15 秒钟/kb 延伸速度, 对于高复杂性的基因组 DNA, 可用 30 秒钟/kb 延伸速度。扩增 1kb 以下的产物时, 延伸时间不要超过 40 秒钟。

扩增建议:

低复杂基因组模板 (质粒、病毒、λ 和 BAC DNA 等), 50μl 体系中添加 10-100ng; 高复杂基因组模板, 50μl 反应体系中, 模板的使用量应在 100-500ng; cDNA 模板的添加量不要超过 PCR 反应体系的 1/10, 50μl PCR 反应体系中 RT 产物的加入量为 2-3μl, 不要超过 5μl。

结果检测:

PCR 反应结束后, 5-10μl 扩增产物用含 0.5μg/ml 溴化乙锭 (或合适浓度的其它 DNA 染色试剂), 合适浓度的琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳完成后在紫外透射仪下观察并记录结果。