

2×Fast Pfu PCR Master Mix

产品组成

Cat. No.	7008100	7008500
2×Fast Pfu PCR Master Mix	1 ml	1 ml×5
ddH ₂ O	1 ml	1 ml×5
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

- 20℃保存有效期为两年以上；2~8℃保存，有效期为6个月。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

2×Fast Pfu PCR Master Mix 是一种优化的两倍浓度的 PCR 预混合液，具有极高的扩增效率和广泛的模板适应性，几乎适用于所有 PCR 反应。产品使用方便，只需要取 0.5 倍 PCR 体系体积的 2×Fast Pfu PCR Master Mix，加入引物和模板，以 ddH₂O 补足体积即可。

2×Fast Pfu PCR Master Mix 中含快速 Pfu DNA Polymerase，其保真度是普通 Taq 酶的 52 倍，是 Pfu 酶的 6 倍，扩增速度可以达到 15 sec/kb，PCR 产物为平末端，可直接链接到平末端克隆载体，或者末端加 A 处理后再与 TA 载体连接。

PCR 体系成分

- 模板 DNA 的纯度：很多残留的核酸提取试剂会影响 PCR 反应，包括蛋白酶、蛋白变性剂(比如 SDS、胍盐)、高浓度盐(KAc、NaAc、辛酸钠等)和高浓度 EDTA 等。纯度不高的模板（比如煮沸法获取的模板）用量请勿超过 PCR 反应体系的 1/10（比如 50 μl 反应体系中加入模板的体积不应超过 5 μl）。如果模板 DNA 纯度太差，可使用新景（Simgen）DNA 纯化试剂盒（Cat. No.2101050）对模板 DNA 进行纯化及浓缩，纯化后的模板使用量可多至 PCR 反应体系体积的 1/2。
- 模板 DNA 用量：极微量的 DNA 也可以作为 PCR 模板，但为保证反应的稳定性，50 μl 体系建议使用 10⁴ 拷贝以上的靶序列作为模板。模板 DNA 的推荐用量：

人基因组 DNA:	0.05 μg~0.5 μg/50 μl PCR反应体系
大肠杆菌基因组 DNA:	10 ng~100 ng/50 μl PCR反应体系
λ DNA:	0.5 ng~5 ng/50 μl PCR反应体系
质粒DNA:	0.1 ng ~ 10 ng/50 μl PCR反应体系

如需用扩增产物作为模板再扩增，应至少将扩增产物稀释 1,000 至 10,000 倍后再作为模板使用，否则可能会出现涂抹条带或无特异性条带。
- 引物浓度：一般每条引物配制的浓度为 10 μM (50×)，工作浓度为 0.2 μM。引物过量可能会出现非特异性扩增，引物过少则可能会降低扩增效率。

PCR 参数设置

1. 预变性：一般预变性为 94°C，1~5 min。变性温度过高或时间过长都会损失快速 Pfu 酶的活性。
2. 退火：退火温度是 PCR 的关键，温度过高可能降低产量，温度过低可能会产生引物二聚体或非特异性扩增。初次尝试 PCR 扩增建议尝试低于 T_m 5°C (如果两条引物 T_m 不同，参考较低的 T_m) 作为退火温度。一般引物合成公司会提供所合成引物的 T_m，也可以根据此公式估算引物 T_m： $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A} + \text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G} + \text{C})$ 。最佳退火温度需要进行梯度 PCR 确定。
3. 延伸：延伸温度通常为 72°C，延伸时间长短取决于目的 DNA 片段长度，以 15 sec/kb 计算所需延伸时间，时间过长可能会导致非特异性增加。循环结束后，继续延伸 5~10 min，以获得完整的双链产物。
4. 循环数：一般使用 25~35 个循环，低拷贝模板可适当增加循环数。过多的循环数可能会增加非特异性扩增，减少特异性产物。

操作步骤

1. 将 2×Fast Pfu PCR Master Mix、ddH₂O、模板 DNA 和引物室温解冻，置于冰上。
2. 将解冻后的各个组分上下翻转混合均匀，按下列组成配制 PCR 反应体系：

2×Fast Pfu PCR Master Mix	25 μl
Primer 1 (10 μM)	1 μl
Primer 2 (10 μM)	1 μl
模板	n μl
ddH ₂ O	(23-n) μl
Total	50 μl

* 注意：上述例子为 50 μl 反应体系所加的组分，如果需要其他体积的反应体系，请按比例增减各组分。

3. 手指轻弹 PCR 反应管充分混匀，低速离心数秒使溶液沉降到管底。
4. PCR 反应循环设置举例

94°C 3 min
 94°C 20 sec }
 ※ 55°C 20 sec } 30 Cycles
 § 72°C 1 min }
 72°C 5 min

※以实际最佳退火温度为准。

§ 以15 sec/kb计算。

对于扩增10 kb以上的目的片段，需用两步法扩增：

94°C 3 min
 94°C 20 sec }
 ※ 65°C 5 min } 30 Cycles
 72°C 10 min

※温度可在60~68°C之间调整，以实际最佳温度为准，时间以15 sec/kb计算。

5. 结果检测：取 5-10 μl 扩增产物加入 DNA Loading Buffer 进行琼脂糖电泳检测。