

## 2 × MegaPfu Premix (with dye)

#21809

Version 19.1.0

### ■ 产品简介

2 × MegaPfu Premix (with dye)是一种即用型高保真PCR预混液,含有MegaPfu DNA polymerase、buffer、dNTP Mixture 以及稳定剂等。使用时,只需在制品溶液中加入模板和引物便可进行PCR反应,大大简化了操作过程,降低了PCR操作过程中污染的风险。本产品中使用的MegaPfu DNA Polymerase具有5'→3'方向的DNA聚合酶活性和3'→5'的DNA外切酶活性,能纠正DNA扩增过程中产生的碱基错配,是一款高保真PCR快速反应酶。使用本品扩增得到的PCR产物为平末端,若做TA克隆需加A处理后再与T载体连接。本产品扩增产物可适用于2 × Ezmax® Universal CloneMix (ToloBio #24305)。产品中已添加染料,扩增产物可直接用于电泳检测。

### ■ 产品组成

组分	21809-01	21809-02	21809-03
2 × MegaPfu Premix (with dye)	1 mL	5 × 1 mL	3 × 21809-02

- 预混液置于-20℃保存,避免反复冻融。
- 组分中已包含染料,扩增产物可直接用于电泳检测。

### ■ 保存条件

-20℃储存, ≤0℃运输。

### ■ 实验流程

#### 1. 冰上配制反应体系

组分	体积
2 × MegaPfu Premix (with dye)	25 μL
Primer 1 (10 μM)	2 μL
Primer 2 (10 μM)	2 μL
Template DNA <sup>a</sup>	x μL
ddH <sub>2</sub> O	Up to 50 μL

a. 针对不同来源或类型的模板,所需的反应浓度不同,下表为50 μl反应体系推荐的模板使用量:

模板种类	模板起始量
动植物基因组 DNA	0.1-1 μg
大肠杆菌基因组 DNA	10-100 ng
cDNA	1-5 μL (不超过PCR反应总体积的1/10)
质粒 DNA	0.1-10 ng
λDNA	0.5-10 ng

## 2. 反应程序

Stage	程序	温度	时间	循环数
Stage 1	预变性	95°C	2 min	1 cycle
		95°C	15 sec	
Stage 2	循环反应	56°C	15 sec	30-35 cycles
		72°C	30 sec/kb	
Stage 3	彻底延伸	72°C	5 min	1 cycle

- 退火温度需根据引物和模板实际的 GC 含量来作调整；如果需要，可以设置温度梯度摸索引物与模板结合的最适温度。
- 适当延长延伸时间有助于提高扩增产量。

### ■ 引物设计

1. 引物长度约 15-30 个碱基，引物 3'端最后一个碱基最好为 G 或者 C。
2. 引物的 GC 含量控制在 40%-60%之间，Tm 值调整至 55~65°C 为佳，若模板本身 GC 含量过高或过低，30%-80%也可。
3. 上下游引物 GC 含量不宜相差过大，Tm 值相差不超过 1°C 为佳，引物与模板非配对序列，不应参与引物 Tm 值计算。
4. 引物中四种碱基（A、G、C、T）随机分布，可降低引物与模板相似性，避免出现聚嘌呤或聚嘧啶。
5. 引物自身及引物之间不应存在连续的互补序列（5 个碱基），引物 3'端避免出现发夹结构。
6. 引物设计好后，可对其进行 blast 检测确定是否有非特异性扩增，NCBI 或 SnapGene 等可实现该功能。
7. 各种模板的引物设计难度不一，对于模板本身比较困难的（如 GC 含量或 AT 含量过高），引物设计应退而求其次，尽量满足以上条件即可。