

2 × MegaPfu Premix

#21808

Version 18.1.0

■ 产品简介

2 × MegaPfu Premix 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)。

■ 产品组成

组分	21808-01	21808-02	21808-03
2 × MegaPfu Premix	1 mL	5 × 1 mL	3 × 21808-02

- 预混液置于-20℃保存，避免反复冻融。

■ 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	25 μL
Primer 1 (10 μM)	2 μL
Primer 2 (10 μM)	2 μL
Template DNA ^a	x μL
ddH ₂ 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，T_m 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，T_m 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 T_m 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。