



0 2 5 - 8 5 6 5 3 5 2 5

www.atgbiotechnology.com

南京市栖霞区江苏生命科技园 D 6 幢 710 室

2 × Proofast[®] Master Mix (Dye)

P201-3



产品说明书
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

目录 Product Manual

产品简介.....	1
产品组成.....	1
储存条件.....	1
质量控制.....	1
实验方案.....	2
引物设计注意事项.....	3

产品简介

Proofast[®] Super-Fidelity DNA Polymerase 是一种基于 Pfu DNA Polymerase 改造而成的新一代超保真 DNA 聚合酶，具有极高的扩增效率和广泛的模板适应性，可用于几乎所有 PCR 反应。经过对 Pfu DNA Polymerase 的分子酶学改造和结构模块组装，Proofast[®] Super-Fidelity DNA Polymerase 的行进性、耐热性和保真性都得到了大幅度提升，即使是非常复杂的模板，也能准确快速的完成反应。其保真度是普通 Taq 酶的 52 倍，是 Pfu 酶的 6 倍；酶液中添加了独特的延伸因子，扩增速度可以达到 15 sec/kb。高保真性以及卓越的扩增效率使得 Proofast[®] Super-Fidelity DNA Polymerase 成为高保真 PCR 的首选用酶。

本产品包含 Proofast[®] Super-Fidelity DNA Polymerase，dNTP 以及优化的缓冲体系，只需加入引物和模板即可进行扩增，减少了移液操作，提高了通量和结果的重现性。体系中加入的保护剂使得 Master Mix 经过反复冻融后仍可保持稳定的活性。扩增产物为平端，适用于 CloneUFO[®]快速克隆试剂盒。

产品组成

组 分	P201-3 (1 ml)	P201-3 (5 ml)	P201-3 (15 ml)
2 × Proofast [®] Master Mix (Dye)	1 ml	5 ml	15 ml

储存条件

-20°C 保存，于 -20 ~ 0°C 运输。▲ 避免反复冻融。

质量控制

核酸外切酶残留检测：20 U 本品和 0.6 μg λ-Hind III 在 74°C 下孵育 1 h，DNA 的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测：20 μl 反应体系，10 U 本品和 1 μg λDNA，37°C 温育 4 h，DNA 的电泳谱带无变化。

RNase 残留检测：20 U 本品和 1 μg HeLa 细胞总 RNA 在 37°C 下孵育 30 min，RNA 的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌残留 DNA 残留检测：50 μl 体系中，以 ddH₂O 为模板，扩增 *E. coli* 16 s rDNA 基因。30 个循环后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，染色，无扩增条带。

功能检测：以 10 ng λDNA 为模板扩增 30 个循环，1% 琼脂糖凝胶电泳，染色，可见各自单一的目的条带。

实验方案

1. 反应体系配制:

组分	用量
ddH ₂ O	to 50 μ l
2 \times Proofast [®] Master Mix (Dye)	25 μ l
模板 DNA*	optional
引物 1 (10 μ M)	2 μ l
引物 2 (10 μ M)	2 μ l

*不同模板最佳反应浓度有所不同, 下表为 50 μ l 反应体系推荐模板使用量:

模板种类/扩增长度	< 1 kb	1 kb ~ 10 kb	> 10 kb
基因组 DNA	50 ng ~ 250 ng	100 ng ~ 300 ng	150 ng ~ 400 ng
质粒或病毒 DNA	10 pg ~ 20 ng	10 pg ~ 20 ng	1 ng ~ 30 ng
cDNA	1 ~ 5 μ l (不超过 PCR 反应总体积的 1/10)		

2. 一般 PCR 反应条件设置:

步骤	温度	时间	阶段	循环数
预变性*1	95°C	30 sec ~ 3 min	Stage 1	Reps: 1
变性*2	95°C	5 ~ 10 sec		
退火*3	45°C ~ 72°C	10 ~ 30 sec	Stage 2	Reps: 25 ~ 35
延伸*4	72°C	15 ~ 30 sec/kb		
彻底延伸	72°C	5 ~ 10 min	Stage 3	Reps: 1

*1 推荐大多数模板的预变性温度为 95°C, 时间为: 质粒或病毒 DNA, 30 sec, 基因组 2 min, cDNA 3 min; 对于高 GC 含量模板, 预变性温度需提升至 98°C, 变性时间为 2 ~ 4 min; 对于超过 10 kb 的扩增子, 预变性温度需降低至 92°C, 变性时间不超过 2 min。

*2 对于大多数模板在 95°C 变性时间设为 5 ~ 10 sec 即可。对于高 GC 含量模板, 变性温度需提升至 98°C; 对于超过 10 kb 的扩增子, 变性温度需降低至 92°C, 并延长变性时间至 15 sec。

*3 Proofast[®] Super-Fidelity DNA Polymerase 能够促进模板和引物高效退火。一般来说, 退火温度设置为引物 T_m 值 \pm 3°C 范围内之间即可。如果需要, 可以建立一个温度梯度反应去寻找引物模板结合的最适温度。退火时间太长可能导致扩增产物在胶上呈现弥散状。因此, 推荐退火时间设置为 10 sec 即可。对于一些困难模板, 退火时间可在 10 ~ 30 sec 之间调整。

*4 对于大多数扩增反应, 延伸过程可在 72°C 进行。对于超过 10 kb 的扩增片段, 需降低延伸温度至 68°C。延伸时间取决于扩增片段的长度和模板的复杂性。使用质粒等复杂程度较低的 DNA 做模板时, 可使用 15 sec/kb 的延伸时间; 使用基因组, cDNA 等复杂程度较高的 DNA 做模板时, 延伸时间应为 30 sec/kb。太长的延伸时间会导致非特异性扩增增加, 因此延伸时间请勿超过 30 sec/kb。

3. 长片段 PCR 指南:

*使用高质量的模板;

*使用长引物时, 可将引物加长至 T_m 值 $68 \sim 72^\circ\text{C}$, 把退火/延伸温度合并为 68°C , 这样可以显著提高扩增特异性;

*推荐反应条件设置:

步骤	温度	时间	阶段	循环数
预变性	92°C	2 min	Stage 1	Reps: 1
变性	92°C	15 sec	Stage 2	Reps: 5
延伸	74°C	60 sec/kb		
变性	92°C	15 sec	Stage 3	Reps: 5
延伸	72°C	60 sec/kb		
变性	92°C	15 sec	Stage 4	Reps: 5
延伸	70°C	60 sec/kb		
变性	92°C	15 sec	Stage 5	Reps: 25
延伸	68°C	60 sec/kb		
彻底延伸	68°C	5 min	Stage 6	Reps: 1

4. 高 GC 含量模板 PCR 指南:

*使用高质量的模板;

*提高变性温度至 98°C ;

*推荐反应条件设置:

步骤	温度	时间	阶段	循环数
预变性	98°C	3 min	Stage 1	Reps: 1
变性	98°C	10 sec	Stage 2	Reps: 25 ~ 35
退火	$45^\circ\text{C} \sim 72^\circ\text{C}$	10 ~ 30 sec		
延伸	72°C	15 ~ 30 sec/kb		
彻底延伸	72°C	5 ~ 10 min	Stage 3	Reps: 1

引物设计注意事项

引物 3'端最后一个碱基选择 C 或 G;

引物 3'端最后 8 个碱基应避免出现连续错配;

引物 3'端尽量避免出现发夹结构;

引物 T_m 值控制在 $55^\circ\text{C} \sim 65^\circ\text{C}$ 之间;

引物额外附加序列, 即与模板非配对序列, 不应参与引物 T_m 值计算;

引物 GC 含量控制在 $40\% \sim 60\%$ 之间;

正向引物和反向引物 T_m 值以及 GC 含量尽可能一致。