



025-85653525

www.atgbiotechnology.com

南京市栖霞区江苏生命科技园D6幢710室

2 × Proofast[®] ETL Master Mix (Dye)

P205-3



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
产品应用	1
储存条件	1
质量控制	1
实验方案	2
引物设计注意事项	4

产品简介

Proofast[®] ETL Super-Fidelity DNA Polymerase 是 Proofast[®] Super-Fidelity DNA Polymerase 的升级版。与普通版 Proofast[®] 相比, Proofast[®] ETL 中添加了独特的延伸因子, 并对反应体系进行了深度优化, 使其在长片段扩增能力、扩增特异性、扩增稳定性以及扩增产量方面都有大幅度提升。使用 λ DNA、质粒等简单模板, Proofast[®] ETL 可以有效扩增长达 40 kb 的片段; 使用基因组 DNA 等复杂模板, Proofast[®] ETL 可以扩增长达 20 kb 的片段; 使用 cDNA 模板, Proofast[®] ETL 可以有效扩增长达 10 kb 的片段。其保真度是普通 Taq 酶的 52 倍, 是 Pfu 酶的 6 倍。此外, Proofast[®] ETL 对 PCR 抑制剂具有良好的抵抗能力, 可用于细菌、真菌、植物组织、动物组织或全血样品的直接 PCR。

本产品包含 Proofast[®] ETL 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	P205-3 (1 ml)	P205-3 (5 ml)	P205-3 (15 ml)
2 × Proofast [®] ETL Master Mix (Dye)	1 ml	5 ml	15 ml

产品应用

本产品适用于以基因组 DNA、cDNA、Plasmid DNA、含尿嘧啶的 DNA 以及粗品为模板的 PCR 反应。

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 μ g 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 μ l 反应体系, 10 U 本品和 1 μ g λ DNA, 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 μ g 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 μ l 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 λ DNA 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 [®] ETL 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 $^{\circ}$ C	30 sec ~ 3 min	Stage 1	Reps: 1
变性 ^{*2}	95 $^{\circ}$ C	5 ~ 10 sec		
退火 ^{*3}	45 $^{\circ}$ C ~ 72 $^{\circ}$ C	10 ~ 30 sec	Stage 2	Reps: 25 ~ 35
延伸 ^{*4}	72 $^{\circ}$ C	15 ~ 30 sec/kb		
彻底延伸	72 $^{\circ}$ C	5 ~ 10 min	Stage 3	Reps: 1

*1 推荐大多数模板的预变性温度为 95 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C, 变性时间不超过 2 min。

*2 对于大多数模板在 95 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C; 对于超过 10 kb 的扩增子, 变性温度需降低至 92 $^{\circ}$ C, 并延长变性时间至 15 sec。

*3 Proofast[®] ETL 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 $^{\circ}$ C 范围之内即可。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 $^{\circ}$ C 进行。对于超过 10 kb 的扩增片段, 需降低延伸温度至 68 $^{\circ}$ 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:

- (1) 使用高质量的模板;
- (2) 使用长引物。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;
- (3) 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 ;
- *添加 DMSO, 以 1% 的浓度递增, 调整范围为 $0\% \sim 8\%$;
- *添加 $5 \times$ PCR Enhancer;
- *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% ~ 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。