

## 2 ×MegaPfu Premix

### 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<sup>®</sup> Universal CloneMix (ToloBio #243Q5)

### 产品组成

| 组分                | AO3503-01 | AO3503-02 | AO3503-03    |
|-------------------|-----------|-----------|--------------|
| 2 ×MegaPfu Premix | 1 mL      | 5 ×1 mL   | 3 ×AO3503-02 |

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 <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 ×MegaPfu Premix

|         |      |                  |           |              |
|---------|------|------------------|-----------|--------------|
| Stage 2 | 循环反应 | 95 <sub>°C</sub> | 15 sec    | 30-35 cycles |
|         |      | 56 <sub>°C</sub> | 15 sec    |              |
|         |      | 72 <sub>°C</sub> | 30 sec/kb |              |
| Stage 3 | 彻底延伸 | 72 <sub>°C</sub> | 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<sub>m</sub>值调整至 55~65<sub>°C</sub>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<sub>m</sub>值相差不超过 1<sub>°C</sub>为佳，引物与模板非配对序列，不应参与引物 T<sub>m</sub>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 SnapGen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。