

## 2×Phusion PCR Master Mix

**KM105 1ml**

### 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KM105
2×Phusion PCR Master Mix	- 20°C	1ml

本试剂储存于 - 20°C内 12 个月不影响使用效果。

### 产品介绍:

2×Phusion PCR Master Mix是用高保真聚合酶Phusion DNA聚合酶配制而成的2倍PCR预混液, 包含了PCR反应中除引物和模板以外的其它所有组分, 特别适合高GC模板和长距离PCR扩增。

### 产品特点:

1. Mix 扩增的 PCR 产物为平末端, 可以直接克隆平末端载体。
2. Phusion DNA 聚合酶是一种高保真的热稳定 DNA 聚合酶, 保真性是 Taq DNA 聚合酶的至少 50 倍, 为 Pfu DNA 聚合酶的 6 倍, 更快的 DNA 合成速度 (15-30sec/kb) 和更强的扩增能力。
3. Mix 中含有高 GCbuffer, 对高 GC 模板扩增有效。

### PCR反应举例:

1. PCR 以下举例仅供参考。(实际反应条件因模板、引物等的结构不同而各异, 需根据实际情况, 设定最佳反应条件。)
2. 用 2×Phusion PCR Master Mix 产品, 以人基因组 DNA 为模板, 扩增 1 kb 的片段, 反应体系为 25  $\mu$ l (如反应体系不同, 可按此比例增加或减少用量)。

Components	25微升体系
Template (模板)	<0.5 µg
Forward primer(10µM )	0.5-1 µl
Reverse primer(10µM )	0.5-1µl
2*Phusion PCR Master Mix	12.5 µl
ddH <sub>2</sub> O to final volume	Add to 25µl

- a. 低复杂基因组模板 (质粒、病毒、λ和 BAC DNA 等) ,25µl体系中添加 2.5-15 ng。为获得更高保真性的扩增产物, 高浓度模板和少量PCR循环数组合是一个较好的方法。
- b. 高复杂基因组模板, 25µl反应体系中, DNA模板的使用量应该在50-250ng, 如果扩增的片段较长, 最好用琼脂糖电泳检测DNA的完整性。DNA的完整性越好, 长距离PCR的成功率越高。
- c. cDNA模板的添加量不要超过PCR反应体系的1/10,25µl PCR 反应体系中RT产物的加入量为 1-2µl, 不要超过3µl。

3. PCR 反应循环的设置:

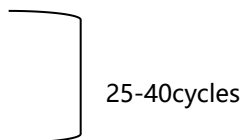
98°C: 1min

98°C: 5-10 sec

50-72°C: 10-20sec

72°C: 10-30sec/KB

72°C: 5min



4. 结果检测: 反应结束后取 5 µl-10 µl 反应产物, 琼脂糖凝胶电泳检测。

**注意事项:**

- a. Phusion DNA 聚合酶具有的很高热稳定性, 可以用 98°C 预变性, 对于大多数模板, 98°C 预变性 60 秒就足够了, 预变性不要超出 3 min。当然也可以按照常规方法使用 94°C 变性 2-5 min。血液直接扩增时, 预变性可设置 95°C 10 min, 让细胞裂解并释放 DNA。
- b. 在循环扩增时, 98°C 变性持续时间可以设定 5-10sec, 简单模板 5sec, 复杂模板 10sec。
- c. 一般条件下, 可以采用如上表所列的三温度梯度循环的 PCR 扩增方法, 引物的退火温度为两条引中较低  $T_m - 5$ , 引物的退火持续时间可以设定 10-20 sec。当两条引物的  $T_m$  值都大于等于 70°C 时, 而且都使用了长引物, 可以使用两步法来扩增, 两步法中退火温度和延伸温度都为 72°C。
- d. Phusion DNA 聚合酶的最佳延伸温度是 72°C。延伸所需要的时间依赖于扩增产物的长度和复杂度。对于质粒, BAC 这类简单模板, 可以使用 15 sec/kb 延伸速度, 对于高复杂性的基因组 DNA, 可以使用 30sec/kb 延伸速度。扩增 1kb 以下的产物时, 延伸时间不要超过 40 sec。