

M5 “长又亮” 超高难度长片段扩增套装（含 10x, 5x, 2x buffer） 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 “长又亮” 超高难度长片段扩增套装（含 10x, 5x, 2x buffer）	100U	MF381-01
M5 “长又亮” 超高难度长片段扩增套装（含 10x, 5x, 2x buffer）	5x100U	MF381-05

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 24 个月。经常使用，可置于 4°C 保存至少六个月。

【产品简介】

M5 “长又亮” 超高难度长片段扩增套装（含 10x, 5x, 2x buffer）在 Magic 超保真酶系列技术基础上，应用了聚合美特制的<延伸增强剂>，抑制<PCR 停滞现象>，增加了 2 种不同浓度的 buffer，让客户在不同扩增难度情况下尝试不同的 buffer，从而提高扩增成功率。增加了 2 种 buffer，不仅保持了 Magic 超保真酶的高保真性，更明显提高了对**粗样品**模板的扩增效率。本产品具有 5' 到 3' DNA 聚合酶活性和 3' 到 5' 的外切酶活性(即校读活性)，能够纠正 DNA 扩增过程中产生的碱基错配现象，在标准缓冲液中其保真度约相当于普通 Taq DNA Polymerase 的 50 倍、Pfu DNA Polymerase 的 6 倍。同时该酶还具有快速的 DNA 合成速度，约相当于普通 Taq DNA Polymerase 的 4-6 倍、Pfu DNA Polymerase 的 8-12 倍。该酶合成能力很强，即使是复杂的模板，也能快速准确的完成反应，尤其适用于对保真性要求高的 DNA 长片段的快速扩增，如基因克隆、测序、定点突变、SNP 分析等，也可用于 DNA 片段的末端补平。使用该聚合酶扩增得到的 PCR 产物无 3' 端突出碱基，不可直接用于 TA 克隆，可以用聚合美特制的平末端 TOPO 克隆（货号 MF021 和 MF022）。

【单位定义】

用大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物，在 74°C、30 分钟内，摄入 10 nmol 的全核苷酸为酸性不溶物所需的酶量。

【产品组份】

M5 Magic Neo High-Fidelity DNA Polymerase (1U/μl)	100 μl
2× Magic Neo PCR Buffer	1.7 ml
5× Magic Neo PCR Buffer	1.0 ml
10× Magic Neo PCR Buffer	1.0 ml
25mM MgSO ₄	1.0 ml
2mM dNTPs	2×1.0 ml

【质量控制】

以λ DNA 为模板，能有效扩增 20 kb 的 DNA 片段；以基因组 DNA 为模板，能有效扩增单拷贝基因；无内切酶和外切酶污染。

【适用范围】

高保真扩增，长片段的快速扩增，如基因克隆、定点突变等；长含量、具有二级结构的复杂模板的扩增；**粗样品的直接扩增**。

【操作示例】

一、使用 2× Magic Neo PCR Buffer, 按下表配制 PCR 反应体系:

2×Magic Neo PCR Buffer	12.5 μl
2mM dNTPs	2.5 μl
Primer 1 (10 μM)	0.5 μl
Primer 2 (10 μM)	0.5 μl
Template DNA*	10-200ng
Magic Neo High-Fidelity DNA Polymerase	0.5μl
ddH ₂ O 补足至	25 μl

建议的 PCR 条件:

95°C	2 min.
32-36 cycles of:	
95°C	25 sec.
53-64°C	20-25 sec.
68°C	15-30sec./1 kb
68°C	5 min.
保持 4°C forever	

二、使用 10×或者 5x Magic Neo PCR Buffer, 按下表配制 PCR 反应体系:

10×Magic PCR Buffer	2.5 μl
25mM MgSO ₄	2.5 μl
2mM dNTPs	2.5 μl
Primer 1 (10 μM)	0.5 μl
Primer 2 (10 μM)	0.5 μl
Template DNA*	10-200ng
Magic Neo High-Fidelity DNA Polymerase	0.5μl
ddH ₂ O 补足至	25 μl

建议的 PCR 条件:

95°C	2 min.
32-36 cycles of:	
95°C	15-25 sec.
53-64°C	15-25 sec.
68°C	15-30sec./1kb
68°C	5 min.
保持 4°C forever	

*模板量: 10~200 ng 基因组 DNA, 10~30 ng 质粒, 或 1~2 μl RT-PCR 反应后的 cDNA。以上举例为常规 PCR 反应系统, 仅供参考。实际反应条件因模板、引物等的结构不同而各异, 需根据模板、引物、目的片段的特点设定最佳反应条件, 并根据比例放大或缩小反应体系。

注意: 设置退火温度时, “长又亮”超保真酶为 Tm+3, 不是 Taq 酶的 Tm-5!

【常见问题解答 (FAQ)】

Q1: 我以 cDNA 做模板, 为何扩增不到条带?

A1: 以 cDNA 做模板, 扩增不到条带的可能原因如下:

- 1) 提取的 RNA 质量不好, 部分或者完全降解, 导致反转录得到的 cDNA 模板也是部分截断序列或者完全没有序列。模板质量不好, PCR 扩增自然就失败了。
- 2) 目标基因在所提取组织中没有表达, 或者表达量极低, 导致反转录得到的 cDNA 中没有或者极微量的模板, 在常规 PCR 循环数比如 35 个循环的条件下, 扩增不到能够检测的条带。

解决方案: 以基因组 DNA 做模板, 做个正对照 (如果有内含子, 要适当加大延伸时间)。

如果正对照能扩增出来, 就说明超保真酶和引物没有问题, 是 cDNA 模板的问题, 需要重新提取 RNA 做反转录。

如果正对照也没有扩增出来, 那有可能是引物降解或者引物失效的原因, 重新合成引物。

Q2: 我的片段比较特殊, 局部区域 GC 含量>80%, 用了很多品牌的超保真酶都没有扩增出来, 怎么办?

A2: 对于长片段的扩增, 除了做好正对照, 排除引物和模板的原因, 更需要摸索退火温度和 PCR 程序, 采用 touchdown 程序有时会有改善, PCR 体系中额外添加 DMSO 或者甜菜碱可能会有改善。

Q3: 如果我的粗提样本做模板, 怎么办?

A3: 对于粗提物做模板, 需要将 PCR 速度降下来, 比如正常是 4-6kb/min, 现在要降到 1-2kb/min, 对 PCR 成功率有很大改善。

Q4: 如果我的片段很长 (>10kb), PCR 程序该怎么设置?

A4: 对于超长片段扩增, PCR 程序其他地方不需特别注意, 只要注意**延伸速度**比正常稍微慢点, 但是比粗提物做模板要快点, 一般 2-3kb/min 为宜。过慢的速度导致 PCR 反应的整体所需时间太长而导致超保真酶失活, 过快的速度, 不利于扩增长片段中可能存在的 GC 岛。

Q5: “长又亮” Neo 超保真酶的保真性如何?

A5: 其保真度约相当于普通 Taq DNA Polymerase 的 50 倍、Pfu DNA Polymerase 的 6 倍。其实所有品牌超保真酶的保真性都差不多, 不要被某些品牌说是 Taq 酶的 200 多, 500 多倍所迷惑, 都是宣传噱头, 因为大部实验, Taq 酶的保真性就能满足。

Q6: “长又亮” Neo 超保真酶有 mix 形式吗?

A6: 其对应的 mix 货号是 MF743。mix 形式和单酶形式扩增能力差不多, 只是在个别难扩的样本中, 单酶可以添加 DMSO 或者甜菜碱来改善扩增。



【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。